

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 910286 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 910286

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07K 14/62

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 20.07.1988

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 18.01.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 18.01.1991

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 20.07.1988 PCT/DK1988/000124
Internationell ansökan - International
application

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Novo Nordisk A/S, Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Hansen, Finn Benned, Danmark, TANSKA, (DK)

2 • Balschmidt, Per, Danmark, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

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

Ihmisen insuliinin analogit ja niitä sisältävät valmisteet

Analoger av humant insulin och preparat innehållande dessa

Ihmisen insuliinin analogit ja niitä sisältävät valmisteet

Tämä keksintö koskee uusia, erittäin spesifisen biologisen aktiivisuuden omaavia ihmisen insuliinin analogeja sekä insuliinivalmisteita, jotka sisältävät tämän keksinnön mukaisia ihmisen insuliinin analogeja.

Aina siitä asti, kun insuliini vuonna 1922 keksittiin, monia eri tyyppisiä insuliinivalmisteita on käytetty sokeritaudin (Diabetes mellitus) hoitamiseksi. Alussa käytettiin yksinomaan insuliiniliuoksia, joilla oli nopeasti alkava ja suhteellisen nopeasti loppuva insuliiniaktiivisuus, mutta myöhemmin on valmistettu insuliinivalmisteita, joilla on laajempi aktiivisuusprofiili, joka aikaansaadaan alentamalla insuliinin liukoisuutta lisäaineilla, kuten esim. sinkkisuolalla ja/tai protamiineilla. Syistä, jotka liittyvät insuliinin saatavuuteen, käytetty insuliini on tavallisesti otettu talteen kotieläinten haimasta, useimmiten härkien, sikojen ja lampaiden haimasta, kuitenkin viime aikoina markkinoille ovat tulleet myös valmisteet, jotka sisältävät bioteknologista alkuperää olevaa ihmisen insuliinia.

Vuosien mittaan on kuvattu suuri joukko ihmisen insuliinin keinotekoisesti valmistettuja analogeja, tavallisesti tarkoituksena on selventää, mikä vaikutus rakenteella on aktiivisuuteen, katso esim. Märke et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 360, s. 1619-1632 (1979). Tutkimukset, joiden kohteena ovat olleet insuliinin (B22-B26)-sekvenssin substituutioiden vaikutus aktiivisuuteen reseptorisitoutumisessa, ovat olleet erityisen kiinnostavia, koska mainitun sekvenssin arvellaan olevan insuliinireseptorin sitoutumisen pääalue ja koska on todettu luonnollisesti tapahtuneita mutaatioita, joissa mainitulla alueella esiintyy substituutioita. Katso esim. S. Shoelson et al. PNAS 80, s. 7390-7394 (1983) ja M.Kobayashi et al.: Biomed.Res.

5 (3) s. 267-272 (1984). Näin analogeilla, joissa Phe(B24) tai Phe(B25) on korvattu, on havaittu erittäin alhaiset aktiivisuudet ja tästä johtuen on päätelty, että näiden kahden aminohapon esiintyminen on ratkaisevan tärkeitä reseptorisitoutumiselle.

Insuliinimolekyylin korvausreaktioiden tarkoituksena voi olla myös insuliinin aktiivisuusprofiilin parantaminen diabeteksen hoitamiseksi. Näin esim. DK-patenttihakemuksessa nro 5457/86 esitetään, että korvaamalla insuliinimolekyyllissä yksi tai useampi Glu neutraalilla aminohappotähteellä tuloksena on insuliinin saostumisalueen siirtyminen siten, että injektion jälkeen saavutetaan hidas vapautuminen.

Lisäksi DK-patenttihakemus nro 4116/86 kuvaa insuliinianalogeja, jotka absorboituvat erityisen nopeasti injektion jälkeen. Tämä vaikutus on seurausta siitä, että hydrofiiliset substituuotit, erityisesti insuliinimolekyylin B9- ja B28-asemissa, aiheuttavat insuliinin aggregaatiokyvyn alentumisen niin, että se esiintyy pääasiallisesti monomeerina. Kuitenkin monilla näistä insuliinianalogeista on alentunut biologinen aktiivisuus.

Peptides 1980, Proceedings of the Sixteenth European Peptide Symposium Helsingør, Denmark, August 31 - September 6, 1980, s. 372-377, kuvaa [Tyr^{B25},Ala^{B30}]-ihmisen insuliinin valmistusta, jossa vastaava, suojattu oktapeptidi kytketään entsymaattisesti des-oktapeptidi-(B23-B30)-insuliiniin, jonka jälkeen suojaus poistetaan trifluorietikkahapolla. Biologisesta aktiivisuudesta ei ole esitetty mitään tietoja.

Biol.Chem.Hoppe-Seyler 1987, 368 (6), s. 709-716, kuvaa des-(B26-B30)-insuliini-B25-amidin analogien valmistamista, jossa Phe^{B25} korvataan Tyr^{B25}:llä tai His^{B25}:llä, jol-

loin saavutetaan aktiivisuuden lisääntyminen, joka on 230 % ja vastaavasti 370 %. Analogit ovat typistettyjä ja amidoituja B25-asemassa.

Nyt on yllättäen havaittu, että tietyt ihmisen insuliinin analogit, joissa Phe asemassa B25 on korvattu His:llä tai Tyr:llä ja mahdollisesti yksi tai useampi aminohappotähteistä asemissa A4, A8, A17, A21, B9, B10, B12, B13, B21, B26, B27, B28 ja B30 on korvattu jollain toisella aminohappotähteellä ja joissa lisäksi aminohappotähde asemassa B30 voi puuttua kokonaan tai olla suojattuna C-päässä esterin tai amidin muodossa, omaavat korkeamman biologisen aktiivisuuden kuin siinä tapauksessa, että Phe asemassa B25 on muuttumaton.

Näin ollen tämä keksintö koskee ihmisen insuliinin analogeja, joissa aminohappotähde asemassa B25 on His tai Tyr, aminohappotähde yhdessä tai useammassa asemista A4, A8, A17, A21, B9, B10, B12, B13, B21, B26, B27, B28 ja B30 on mahdollisesti korvattu jollain toisella aminohappotähteellä ja aminohappotähde asemassa B30 mahdollisesti puuttuu tai on suojattuna C-päässä esterin tai amidin muodossa, edellyttäen, että kun B25 on Tyr, silloin B30 on eri kuin Ala.

Esimerkkejä erityisen edullisista substituuutioista edellä esitetyissä asemissa ovat: A4:Gln, A8:His, A17:Gln, A21:Asp, B9:Asp, B10:Asp, B12:Ile, B13:Gln tai Arg, B21:Gln tai Ile, B26:Glu, B27:Arg, B28:Asp ja B30:Ala tai Ser, edellyttäen, että kun B25 on Tyr, silloin B30 on eri kuin Ala. Jos halutaan samanaikaisesti useita substituuutioita edellä esitetyissä asemissa, on edullista käytön kannalta, että ne esiintyvät ryhmässä: A4, A8, A17, B13, B21, B27 ja B30, tai ryhmässä: A8, A21, B9, B10, B12, B26, B28 ja B30, edellyttäen, että kun B25 on Tyr, silloin B30 on eri kuin Ala.

Näin tämän keksinnön mukaiset ihmisen insuliinin analogit ovat edullisia diabeteksen hoitamiseksi, koska lisääntynyt biologinen aktiivisuus, joka on seurausta B25-asemassa tapahtuneista korvautumisista, merkitsee nopeampaa absorptiota verestä ja lisäksi se voi neutraloida biologisen aktiivisuuden vähenemistä, mikä voi muuten olla seurausta muista substituutioista ihmisen insuliinimolekyylissä.

Keksinnön erityistä suoritusmuotoa edustavat ihmisen insuliinin analogit, jotka sisältävät [His^{B25}]:n tai [Tyr^{B25}]:n ja ainakin yhden korvaavan aminohappotähteen, joka on [Gln^{A4}], [His^{A8}], [Gln^{A17}], [Asp^{A21}], [Asp^{B9}], [Asp^{B10}], [Ile^{B12}], [Gln^{B13}], [Arg^{B13}], [Gln^{B21}], [Pro^{B21}], [Glu^{B26}], [Arg^{B27}], [Asp^{B28}], [Ala^{B30}] tai [Ser^{B30}], edellyttäen, että kun B25 on Tyr, silloin B30 on eri kuin Ala.

Keksinnön toista erityistä suoritusmuotoa edustavat ihmisen insuliinin analogit, jotka sisältävät [His^{B25}]:n tai [Tyr^{B25}]:n ja ainakin kaksi korvaavaa aminohappotähdettä, joita ovat [Gln^{A4}], [His^{A8}], [Gln^{A17}], [Gln^{B13}], [Arg^{B13}], [Gln^{B21}], [Ile^{B21}], [Arg^{B27}], [Ala^{B30}] tai [Ser^{B30}], edellyttäen, että kun B25 on Tyr, silloin B30 on eri kuin Ala.

Vielä erästä keksinnön erityistä suoritusmuotoa edustavat ihmisen insuliinin analogit, jotka sisältävät [His^{B25}]:n tai [Tyr^{B25}]:n ja ainakin kaksi korvaavaa aminohappotähdettä, joita ovat [His^{A8}], [Asp^{A21}], [Asp^{B9}], [Asp^{B10}], [Ile^{B12}], [Glu^{B26}], [Asp^{B28}], [Ala^{B30}] tai [Ser^{B30}], edellyttäen, että kun B25 on Tyr, silloin B30 on eri kuin Ala.

Keksinnön mukaisia, edullisia ihmisen insuliinin analogeja ovat
 [Tyr^{B25}]-ihmisen insuliini,
 [Tyr^{B25}, Asp^{B28}]-ihmisen insuliini,
 [His^{B25}]-ihmisen insuliini,

[His^{B25}, Asp^{B28}]-des-[Thr^{B30}]-ihmisen insuliini,
 [Tyr^{B25}]-ihmisen insuliini-B30-amidi,
 [His^{B25}]-ihmisen insuliini-B30-amidi.

Kuvatut insuliinijohdannaiset voidaan valmistaa biosynteesistä hiivassa ilmentämällä DNA-sekvenssi, joka koodittaa annettua insuliiniprekursoria. Biosynteesin jälkeen tämä prekursori voidaan muuttaa insuliinijohdannaiseksi entsyymaattisesti katalysoidulla reaktiolla. Jotta saavutetaan erittyminen kasvatusalustaan, insuliiniprekursoria koodittava DNA-sekvenssi voidaan fuusioda toiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa hiivassa toimivaa signaalipeptidiä. Erittyminen voidaan aikaansaada inserttoimalla Saccharomyces cerevisiae'n ilmentymisplasmidiin MF α 1-johtosekvenssi (Kurjan & Herskowitz, Cell 30, 933-943 (1982). Edullisessa rakenteessa käytetään DNA-sekvenssiä, joka koodittaa koko MF α 1-johtosekvenssiä, mukaan lukien kaksimäksinen LysArg-kohta mutta pois sulkien peptidisekvenssi Glu-Ala-Glu-Ala, joka on substraatti hiivaproteaasille DPAP (dipeptidyyliaminopeptidaasi). Tällä tavalla saadaan oikean N-pään omaavien insuliiniprekursoreiden tehokas erittyminen.

Modifioituja insuliiniprekursoreita koodittavat DNA-sekvenssit rakennettiin lähtien ilmentymiskasetista, joka sisältyy ilmentymisplasmidin pYGABA BamHI-restriktiofragmenttiin, kuten kuviossa 1 on esitetty, ja joka on pituudeltaan 1103 emäsparia ja sisältää olennaisesti seuraavaa (lueteltu järjestyksessä alkaen 5'-päästä): GAPDH-promootori (Travis et al., J.Biol.Chem., 260, 4384-4389, 1985), jonka jälkeen koodittava alue, jonka muodostavat: MF α 1-johtosekvenssin 83 N-terminaalista aminohappoa, joita koodittaa villityyppinen hiiva-DNA-sekvenssi, kuten kuvaavat Kurjan & Herskowitz (viite esitetty edellä), jota seuraa kaksi kodonia AAA ja AGA, jotka koodittavat Lys:iä ja Arg:tä, ja vielä seuraa insuliiniprekursoria, yksiketjuis-

ta des[Thr^{B30}]-ihmisen insuliinia (SCI) koodittava alue, joka on synteettisesti rakennettu geeni, jossa on käytetty edullisia hiivakodoneja. Kahden lopetuskodonin jälkeen on SalI-restriktiokohta ja sekvenssin jäljelle jäävä osa koostuu MFal-sekvenssistä, joka sisältää terminaattori-alueen. Sekvenssi rakennetaan käyttäen yksinomaan standardimenetelmiä.

Käytetty menetelmä oli "oligonukleotidin avulla suoritettu paikkaan kohdistettu mutagenointi", jonka ovat kuvanneet Zoller & Smith, DNA, Vol. 3, No. 6, 479-488 (1984). Menetelmä on kuvattu lyhyesti seuraavassa ja perusteellisesti esimerkissä I. Ilmentymisplasmidista eristetään insuliiniprekursorisekvenssi, joka insertoidaan yksisäikeiseen, renkaanmuotoiseen M13-bakteriofaagivektoriin. Yksisäikeiseen perimään emäspariutetaan kemiallisesti syntetisoitu, komplementaarinen DNA-säie. DNA-säie sisältää halutun sekvenssin, jota ympäröivät sekvenssit ovat täydellisesti homologiset renkaanmuotoisen DNA:n insuliinisekvenssien kanssa. Aluke pidennetään sen jälkeen in vitro renkaanmuotoisen genomien koko pituuteen biokemiallisesti, käyttäen Klenow-polymeraasia. Tämä säie antaa alun yksisäikeisille faageille, jotka, kun niitä kasvatetaan E.coli'ssa, tekevät mahdolliseksi halutun sekvenssin omaavan kaksisäikeisen DNA:n eristämisen. Tästä kaksisäikeisestä DNA:sta restriktiofragmentti voidaan eristää ja insertoida uudelleen ilmentymisvektoriin.

Keksinnön mukaiset ihmisen insuliinin analogit, joissa mahdolliset substituuotit esiintyvät ainoastaan viimeisissä aminohappotähteissä lähinnä B-ketjun C-terminaalialueella, voidaan lisäksi sinänsä tunnetulla tavalla valmistaa puolisynnteettisesti esim. porsaan insuliinista, kuten kuvaavat K.Inouye et al.: JACS 101 (3), s. 751-752 (1979). Jolloin porsaan insuliini ensin katkaistaan trypsiinillä des-(B23-30)-ihmisen insuliiniksi, jonka jälkeen viimeksi mai-

nittu kytketään myös entsyymaattisesti halutun aminohapposekvenssin omaavaan synteettiseen peptidiin.

Keksintö koskee myös insuliinivalmisteita, jotka tavanomaisten apuaineiden, täyteaineiden ja/tai kantoaineiden lisäksi sisältävät ainakin yhden ihmisen insuliinianalogin, jossa aminohappotähde asemassa B25 on His tai Tyr, aminohappotähde yhdessä tai useammassa asemasta A4, A8, A17, A21, B9, B10, B12, B13, B21, B26, B27, B28 ja B30 on mahdollisesti korvattu ja aminohappotähde B30-asemassa mahdollisesti puuttuu tai on suojattuna C-päässä esterin tai amidin muodossa. Keksinnön mukaiset insuliinivalmisteet voidaan valmistaa tavanomaisten insuliinivalmisteiden valmistamiseksi olevien menetelmien mukaisesti.

Seuraavat esimerkit kuvaavat edelleen keksintöä.

ESIMERKKI I

Ilmentymisplasmidin, jota voidaan käyttää [Tyr^{B25}]-SCI:n ilmentämiseksi, rakentaminen

Ilmentymiskasetti, joka sisältyy ilmentymisplasmidiin pYGABA (esitetty kuviossa 1) BamHI-restriktiofragmentissa, eristettiin: Ilmentymisplasmidia inkuboitiin restriktioendonukleaaasin BamHI kanssa. Olosuhteet olivat seuraavat: 20 µg plasmidia, 50 yksikköä BamHI:tä, 100 mM NaCl:ää, 50 mM Tris-HCl:ää, pH 7,5, 10 mM MgCl₂:ta ja 1 mM DTT:tä reaktiotilavuuden ollessa 100 µl. Lämpötila oli 37 °C ja reaktioaika 2 tuntia. Kaksi DNA-fragmenttia erotettiin 1%:isella agarosigeelillä ja haluttu fragmentti eristettiin.

Ligointi M13-vektoriin M13mp18

Eristetty restriktiofragmentti ligoitiin bakteriofaagivektoriin M13mp18, joka myös oli leikattu restriktioendonukleaasilla BamHI, seuraavassa reaktioseoksessa: fragmenttia 0,2 μ g, vektoria 0,02 μ g, 50 mM Tris-HCl:ää, pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$:ta, 10 mM DTT:tä ja 1 mM ATP:tä tilavuuden ollessa 20 μ l. 5 μ l tätä seosta transformoitiin E.coli-kantaan JM101. Fragmentin esiintyminen vektorissa sekä fragmentin asema määritettiin restriktioentsyymikartoituksella kaksisäikeisellä M13-DNA:lla, joka eristettiin transformanteista.

JM101:n transformaatio

Edellä muodostettua reaktioseosta siirrettiin eri laimennuksina $CaCl_2$ -käsitelyihin E.coli JM101-soluihin, käyttäen standardimenetelmiä ja maljattiin 2 x YT top-agarille, 2 x YT agarmaljoille. (2 x YT = tryptonia 16 g/litra, hiivauutetta 10 g/litra, NaCl 5 g/litra. 2 x YT top-agar = 2 x YT, johon lisätty 0,4 % agaroosia ja autoklaavikäsitelty. 2 x YT agarmaljat = 2 x YT, johon lisätty 2 % agarria ja autoklaavikäsitelty.) Maljoja inkuboitiin 37 °C:ssa yön yli.

Positiivisten kloonien identifioiminen

Käytetty menetelmä oli "plaque-lift"-hybridisaatio, joka on kuvattu seuraavassa: nitroselluloosasuodatin asetettiin maljalle, jolla oli sopiva pesäketiheys, niin että suodatin kostui. Sen jälkeen suodatin kylvetettiin seuraavissa liuoksissa: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH 30 sekuntia, 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 1 minuutti, 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M natriumsitraatti) siihen saakka kun käytettiin. Suodatin kuivatettiin 3MM-paperilla ja pidettiin ainakin 2 tuntia 80 °C:n tyhjuunissa.

Mutagenointialuke, jonka sekvenssi oli 5'-TGGAGTGTAGTAGAA-ACCTCT-3', leimattiin radioaktiivisesti 5-päässä 30 μ l:ssa reaktioseosta, joka sisälsi 70 mM Tris-HCl:ää, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$:ta, 5 mM DTT:tä, 10 pmoolia oligonukleotidia ja 20 pmoolia γ - ^{32}P -ATP:tä ja 3,5 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia. Seosta inkuboitiin 37 °C:ssa 30 minuuttia ja sen jälkeen 5 minuuttia 100 °C:ssa.

Kuivattu suodatin esihybridisoitiin 2 tunnin ajan 65 °C:ssa 6 x SSC:ssä, jossa oli 0,2 % naudan seerumin albumiinia, 0,2 % Ficollia, 0,2 % polyvinyylipyrrolidonia, 0,2 % natrium-dodekyylisulfaattia (SDS) ja 50 μ g/ml lohenmaiti-DNA:ta. Sen jälkeen reaktioseos, joka sisälsi leimatun koettimen, lisättiin 15 ml:aan juuri valmistettua esihybridisaatioseosta ja suodatinta kylvetettiin tässä yön yli 31 °C:ssa samalla varovasti ravistellen. Hybridisaation jälkeen suodatin pestiin 3 kertaa, joka kerta 15 minuutin ajan 2 x SSC:ssä, joka sisälsi 0,1 % SDS:ää, ja autoradiografoitiin. Pestiin samassa liuoksessa mutta nyt 61 °C:ssa ja autoradiografoitiin taas, jonka jälkeen identifioitiin ne pesäkkeet, jotka sisälsivät mutagenointialukkeelle komplementaariset DNA-sekvenssit.

Positiivisten kloonien uudelleentestaus

Koska identifioitu kloni on tulos heterodupleksista, pesäke maljattiin uudestaan. Hybridisaatio ja identifiointi toistettiin.

Kaksisäikeisen M13-faasi-DNA:n puhdistaminen

Uudelleentestattua kloonia käytettiin *E.coli*-kannan JM101 infektoimiseen. Viljelmää, jossa oli noin 10^8 faagia ja 5 JM101-pesäkettä, kasvatettiin 5 tunnin ajan 5 ml:ssa 2 x YT-kasvatusalustaa 37 °C:ssa. Sen jälkeen kaksisäikeinen, renkaanmuotoinen DNA puhdistettiin pelletistä menetelmäl-

lä, jonka on esittänyt Birnboim & Doly, Nucleic Acids Res., 2, 1513 (1979).

Yksisäikeisen (single-stranded=ss) DNA:n eristäminen (templaatti)

Edellä kuvatusta transformantista eristettiin ss-DNA menetelmän mukaisesti, jonka on esittänyt Messing julkaisussa Gene, 19, 269-276 (1982).

Mutagenointialukkeen 5'-fosforylointi

Mutagenointialuke, jonka sekvenssi oli 5'-TGGAGTGTAGTA-GAAACCTCT-3', fosforyloitiin 5'-päästään 30 µl:n reaktio-tilavuudessa, jossa oli 70 mM Tris-HCl:ää, pH 7,0, 10 mM MgCl₂:ta, 5 mM DTT:tä, 1 mM ATP:tä, 100 pmoolia oligonukleotidia ja 3,6 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia. Reaktioaika oli 30 minuuttia 37 °C:ssa. Sen jälkeen entsyymi inaktivoitiin inkuboimalla seosta 10 minuuttia 65 °C:ssa.

Templaatin ja mutagenointialukkeen emäspariuttaminen

Templaatin ja alukkeen emäspariuttaminen suoritettiin 10 µl:ssa seosta, jossa oli 0,5 pmoolia templaattia, 4 pmoolia aluketta, 20 mM Tris-HCl:ää, pH 7,5, 10 mM MgCl₂:tä, 50 mM NaCl:ää ja 1 mM DTT:tä, kuumentamalla 65 °C:ssa 10 minuuttia ja jäähdyttämällä sen jälkeen 0 °C:seen.

Pidennys/ligointireaktio

Edellä saatuun reaktioseokseen lisättiin 10 µl seuraavaa seosta: 0,3 mM dATP:tä, 0,3 mM dCTP:tä, 0,3 mM dGTP:tä, 0,3 mM TTP:tä, 1 mM ATP:tä, 20 mM Tris-HCl:ää, pH 7,5, 10 mM MgCl₂:ta, 10 mM DTT:tä, 3 yksikköä T4-DNA-ligaasia ja 2,5 yksikköä Klenow-polymeraasia. Sen jälkeen reaktion annettiin tapahtua 16 tuntia 16 °C:ssa.

Modifioidun insuliiniprekursorin sisältävän restriktio-fragmentin eristäminen

Edellä eristetty DNA-valmiste (noin 5 μ g) katkaistiin 10 yksiköllä restriktioendonukleaasia BamHI 60 μ l:ssa seosta, jossa oli 100 mM NaCl:ää, 50 mM Tris-HCl:ää, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$:ta ja 1 mM DTT:tä, reaktioaika oli 2 tuntia 37 °C:ssa. DNA-tuotteet erotettiin agarosigeelillä ja fragmentti puhdistettiin geelistä.

Ligointi hiivavektoriin pAB24 (kuvio 2)

Eristetty restriktiofragmentti ligoitiin restriktioendonukleaasilla BamHI katkaistuun hiivavektoriin pAB24 seuraavassa reaktioseoksessa: fragmenttia 0,2 μ g, vektoria 0,02 μ g, 50 mM Tris-HCl:ää, pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$:ta, 10 mM DTT:tä, 1 mM ATP:tä kokonaistilavuus oli 20 μ l. 5 μ l tätä reaktioseosta käytettiin transformoimaan E.coli-kanta MC1061, jossa modifioitu ilmentymisplasmidi identifioitiin ja lisättiin. Plasmidi oli identtinen pYGABA:n kanssa muuttunutta kodonia lukuun ottamatta.

Hiivan transformaatio

Ilmentymisplasmidin transformaatio hiivakantaan Saccharomyces cerevisiae JC482 Δ pep Δ Leu2cir^O (α , his4, ura3, leu2, cir^O) suoritettiin kuten kuvaavat Ito et al., J.Bact., Vol. 153, No. 1, 163-168 (1983). Transformoidut solut maljattiin SC-ura-kasvatusalustalle (0,7 % hiiva-typpiästä, 2,0 % glukoosia, 0,5 % cas-aminohappoja, 2,0 % agaria) plasmidin sisältävien solujen selektioimiseksi.

ESIMERKKI II

Ilmentymisplasmidin, jota voidaan käyttää [His^{B25}, Asp^{B28}]-SCI:n tuottamiseksi, rakentaminen

Käytetty menetelmä oli olennaisesti sama kuin esimerkissä I kuvattu, paitsi että mutagenointialukkeella oli sekvenssi 5'ACAATACCTTGTCAGTGTAGTGGAACCTCTTT3' ja että hybridisaatiolämpötila oli 42 °C ja että pesulämpötila hybridisaation jälkeen oli 63 °C. Modifioidulla plasmidilla oli identtinen sekvenssi pYGABA:n kanssa lukuun ottamatta modifioituja kodoneja.

ESIMERKKI III

Prekursorin ilmentäminen ja eristäminen kasvatusalustasta

Hiivaa, joka oli transformoitu esimerkissä I tai II esitetyllä tavalla, viljeltiin petrimaljoilla, jotka sisälsivät minimikasvatusalustan, josta puuttui urasiili, 48 tunnin ajan 30 °C:ssa. 100 ml:n ravistelupullot, jotka sisälsivät minimialustan, josta puuttui urasiili, + 5 g/l cas-amino-happoja + 10 g/l meripihkahappoa + 30 g/l glukoosia, pH oli 5,0, ympättiin yhdellä pesäkkeellä, joka otettiin petrimaljalta. Pulloja ravisteltiin sen jälkeen 30 °C:ssa inkubaattorissa 72 tuntia.

Sentrifugoitiin, jonka jälkeen 1 litra yhdistettyä supernatanttia steriloidtiin suodattamalla ja pH säädettiin arvoon 4 - 4,5 ja johtokyky <10 mS:iin lisäämällä 5 M HCl:ää ja vettä. Sen jälkeen virtausnopeudella 120 ml/tunti supernatantti siirrettiin pylvääseen, joka oli 1,6 x 6 cm:n S-Sepharose® FF, joka oli etukäteen tasapainotettu 50 mM:lla etikkahappoa 50%:isessa (tilavuus) etanolissa, pH säädettiin NaOH:lla arvoon 4,0. Pylväs pestiin 60 ml:lla puskuria, jonka jälkeen prekursori eluoitiin lineaarisella

gradientilla, jossa oli NaCl:ää 0 M:sta - 35 M:iin 360 ml:ssa puskuria, virtausnopeus oli 10 ml/tunti. Eluaatti jaettiin 4 ml:n fraktioihin ja tutkittiin UV-absorbanssilla. Fraktiot, jotka sisälsivät prekursorin, identifioitiin RP-HPLC-analyysillä ja yhdistettiin. Poistettiin suola Sephadex®G25-pylväässä 1 M etikkahapossa, jonka jälkeen prekursori eristettiin lyofilisoimalla.

ESIMERKKI IV

[Tyr^{B25}]-des[Thr^{B30}]-ihmisen insuliinin valmistaminen prekursorista

450 mg [Tyr^{B25}]-SCI:tä, joka valmistettiin esimerkeissä I ja III kuvatuilla menetelmillä, liuotettiin 45 ml:aan 50 mM tris(hydroksimetyyli)aminometaania 20%:isessä (tilavuus) etanolissa, pH säädettiin HCl:llä arvoon 7,7 ja lisättiin 45 ml (laskeutunut tilavuus) Sepharose'a®, joka sisälsi 36 mg immobilisoitua trypsiiniä samassa puskurissa. Suspensio jätettiin 3 tunnin ajaksi 20 °C:n lämpötilaan, samalla sitä sekoitettiin varovasti, jonka jälkeen se suodatettiin. Geeli pestiin 40 ml:lla puskuria ja yhdistetyt suodokset siirrettiin 2,6 x 7,5 cm :n Q-Sepharose®FF-pylvääseen, joka oli etukäteen tasapainotettu 50 mM:lla tris(hydroksimetyyli)aminometaania 50%:isessä (tilavuus) etanolissa, pH säädettiin HCl:llä arvoon 8,0. Sen jälkeen pylväs eluointiin lineaarisella gradientilla, jossa oli NaCl:ää 0 M:sta - 0,15 M:iin samassa puskurissa, 6 tunnin kuluessa virtausnopeuden ollessa 225 ml/tunti. Eluaatti tutkittiin UV-absorbanssilla ja fraktiot, jotka sisälsivät pääasiallisen proteeiinipiikin, yhdistettiin.

Laimennettiin yhtä suurella tilavuudella vettä, jonka jälkeen yhdistetty liuos siirrettiin pylvääseen, joka oli 2,6 x 25 cm:n Lichroprep®RP-18 (25-40 µm) ja joka oli etukäteen tasapainotettu 10 mM:lla H₃PO₄:ää, 0,1 M:lla NaCl:ää

30%:isessa (tilavuus) etanolissa. Sen jälkeen pylväs elu-
oitiin virtausnopeudella 16 ml/tuntia käyttäen lineaarista
gradienttia, jossa oli etanolia 30 %:sta - 40 %:iin (ti-
lavuus), 20 tunnin kuluessa. Eluaatti tutkittiin UV-absor-
banssilla ja fraktiot, jotka sisälsivät pääasiallisen pro-
teiinipiikin, yhdistettiin. Poistettiin suola Sephadex®-
G25-pylväässä 1 M etikkahapossa, jonka jälkeen eristettiin
105 mg [Tyr^{B25}]-des[Thr^{B30}]-ihmisen insuliinia lyofilisoi-
malla.

Proteiini liuotettiin uudestaan seokseen, jossa oli 200 mg
treoniniimetyyliesteriä, 1,0 ml etanolia ja 0,4 ml vettä.
pH-arvo säädettiin etikkahapolla arvoon 6,3 ja lisättiin 2
ml (laskeutunut tilavuus) Sepharose'a®, joka sisälsi 1,6
mg immobilisoitua trypsiiniä. Seisotettiin 2 tuntia 20
°C:ssa samalla varovasti sekoittaen, jonka jälkeen geeli
poistettiin suodattamalla ja proteiini saostettiin lisää-
mällä 10 tilavuutta 2-propanolia. Ilmassa kuivattu sakka
liuotettiin uudestaan 20 mM:iin tris(hydroksimetyyli)ami-
nometaani/HCl:ää 60%:isessa (tilavuus) etanolissa, pH oli
8,25 ja siirrettiin pylvääseen, joka oli 1,6 x 20 cm:n
Q-Sepharose®FF ja joka oli etukäteen tasapainotettu maini-
tulla puskurilla, ja eluointi gradientilla samassa pusku-
rissa, jossa NaCl-pitoisuus kasvoi 0 M:sta - 0,1 M:iin 15
tunnin kuluessa, virtausnopeudella 50 ml/tunti. Etanoli
poistettiin tyhjössä yhdistetyistä fraktioista, jotka si-
sälsivät [Tyr^{B25}]-ihmisen insuliini-(B30-metyyliesterin)
ja proteiini saostettiin säätämällä pH arvoon 6,1. Senti-
fugoitiin ja lyofilisoitiin, jonka jälkeen metyyliesteriä
hydrolysoitiin 10 minuutin ajan kylmässä 0,1 M NaOH:ssa
proteiinikonsentraation ollessa 10 mg/ml. Reaktio pysäy-
tettiin säätämällä pH arvoon 8,5 ja lisättiin 2 tilavuutta
20 mM tris(hydroksimetyyli)aminometaani/HCl:ää, pH 8,5.
Sen jälkeen liuos siirrettiin pylvääseen, joka oli 1,6 x
20 cm:n Q-Sepharose®FF, ja eluointi edellä esitetyllä ta-
valla. Proteiini saostettiin pH-arvossa 5,5, sen jälkeen,

kun etanoli oli poistettu tyhjössä. Lyofilisoimisen jälkeen saatiin 40 mg [Tyr^{B25}]-ihmisen insuliinia.

Tuotteen identiteetti varmistettiin aminohappoanalyysillä ja erotettujen, vinyylipyridyloitujen A- ja B-ketjujen jaksollisella Edman-degradaatiolla.

ESIMERKKI V

[His^{B25},Asp^{B28}]-des[Thr^{B30}]-ihmisen insuliinin valmistamisen prekursorista

100 mg [His^{B25},Asp^{B28}]-SCI:tä, joka valmistettiin esimerkeissä II ja III kuvatuilla menetelmillä, liuotettiin 10 ml:aan 50 mM tris(hydroksimetyyli)aminometaania 20%:isessä (tilavuus) etanolissa, pH säädettiin HCl:llä arvoon 7,7 ja lisättiin 10 ml (laskeutunut tilavuus) Sepharose'a[®], joka sisälsi 8 mg immobilisoitua trypsiiniä samassa puskurissa. Suspensio jätettiin 3 tunnin ajaksi 20 °C:n lämpötilaan, samalla sitä sekoitettiin varovasti, jonka jälkeen se suodatettiin. Geeli pestiin 10 ml:lla puskuria ja yhdistetyt suodokset siirrettiin pylvääseen, joka oli 1,6 x 7,5 cm:n Q-Sepharose[®]FF, joka oli etukäteen tasapainotettu 50 mM:lla tris(hydroksimetyyli)aminometaania 50%:isessä (tilavuus) etanolissa, pH säädettiin HCl:llä arvoon 8,0. Sen jälkeen pylväs eluoiitiin lineaarisella gradientilla, jossa oli NaCl:ää 0 M:sta - 0,15 M:iin samassa puskurissa, 6 tunnin kuluessa virtausnopeuden ollessa 90 ml/tunti. Eluaatti tutkittiin UV-absorbanssilla ja fraktiot, jotka sisälsivät pääasiallisen proteeiinipiikin, yhdistettiin.

Laimennettiin yhtä suurella tilavuudella vettä, jonka jälkeen yhdistetty liuos siirrettiin pylvääseen, joka oli 1,6 x 25 cm:n Lichroprep[®]RP-18 (25-40 µm) ja joka oli etukäteen tasapainotettu 10 mM:lla H₃PO₄:ää, 0,1 M:lla NaCl:ää 30%:isessä (tilavuus) etanolissa. Sen jälkeen pylväs elu-

oitiin virtausnopeudella 6,5 ml/tunti käyttäen lineaarista gradienttia, jossa oli etanolia 30 %:sta - 40 %:iin (tilavuus), 20 tunnin kuluessa. Eluaatti tutkittiin UV-absorbanssilla ja fraktiot, jotka sisälsivät pääasiallisen proteiinipiikin, yhdistettiin. Poistettiin suola Sephadex®-G25-pylväässä 1 M etikkahapossa, jonka jälkeen eristettiin 39 mg [His^{B25}, Asp^{B28}]-des[Thr^{B30}]-ihmisen insuliinia lyofilisoimalla.

Tuotteen identiteetti varmistettiin aminohappoanalyysillä ja erotettujen, vinyylipyridyloitujen A- ja B-ketjujen jaksollisella Edman-degradaatiolla.

ESIMERKKI VI

Des-(B23-B30)-ihmisen insuliinin valmistaminen

1 g Na-kiteytettyä sian insuliinia (proteeinipaino) liuotettiin 40 ml:aan vettä ja lisättiin liuos, jossa oli 50 mg sian trypsiiniä 10 ml:ssa juuri valmistettua 0,25 M ammoniumvetykarbonaattiliuosta, jonka pH oli säädetty arvoon 9,0 ammoniakkivedellä. Sen jälkeen liuos jätettiin jääkaappiin 4 °C:n lämpötilaan. 48 tunnin kuluttua HPLC-analyysi osoitti reaktioasteeksi 65 %. Tämän jälkeen liuos geelisuodatettiin 4 °C:ssa käyttäen Sephadex®-G50 Superfine-pylvästä, joka oli 5 x 90 cm ja valmistettu 0,05 M ammoniumvetykarbonaattiin, virtausnopeus oli 90 ml/tunti. Fraktiot, jotka sisälsivät pääasiallisen proteiinipiikin, yhdistettiin ja lyofilisoitiin.

Saanto oli 520 mg des-(B23-30)-ihmisen insuliinia, jonka puhtaus oli 97,5 % mitattuna HPLC-analyysillä.

ESIMERKKI VIIPeptidien valmistaminen

Peptidit valmistettiin käyttäen Applied Biosystemsin peptidisynteesilaitetta, jossa rakentaminen suoritettiin PAM-hartsille suojattujen, symmetristen aminohappoanhydridien avulla. Kapasiteetti oli noin 0,1 mmoolia peptidiä. Lopuksi peptidi lohkaistiin hartsista reaktiolla vedettömän fluorivedyn kanssa 0 °C:ssa, jolloin samanaikaisesti jäljellä olevat suojaryhmät poistettiin.

ESIMERKKI VII[His^{B25}]-ihmisen insuliinin valmistaminen

200 mg des-(B23-30)-ihmisen insuliinia ja 400 mg Gly-Phe-His-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr:ää liuotettiin seokseen, jossa oli 2,40 ml dimetyyliformamidia ja 1,20 ml vettä, seoksen pH säädettiin trietyyliamiinilla arvoon 6,5.

Sen jälkeen liuos, jossa oli 10 mg sian trypsiiniä 0,20 ml:ssa vettä, lisättiin ja reaktioseos jätettiin 20 °C:n lämpötilaan. 4 tunnin kuluttua HPLC-analyysi osoitti reaktioasteeksi 60 % ja reaktio pysäytettiin saostamalla 25 ml:lla 2-propanolia. Sakka, joka eristettiin sentrifugomalla, liuotettiin uudestaan 10 ml:aan 1 M etikkahappoa ja siirrettiin 20 °C:ssa pylvääseen, joka oli 2,6 x 20 cm:n Lichroprep[®] RP-18 (25-40 μm) ja joka oli tasapainotettu puskurilla, jossa oli 0,5 mM kloorivetyä, 0,1 M natriumkloridia 30%:isessa (tilavuus) etanolissa. Sen jälkeen pylväs eluoitiin samalla puskurilla, virtausnopeus oli 20 ml/tunti, etanolipitoisuus nostettiin kuitenkin lineaarisesti 50 %:iin 24 tunnin kuluessa. Fraktiot, jotka sisälsivät pääasiallisen proteiiniä, yhdistettiin, jonka jälkeen proteiini saostettiin laimentamalla samalla tilavuudella

vettä ja säätämällä pH arvoon 5,5 natriumhydroksidiliuoksella. Seisotettiin 4 °C:ssa 1 tunti, jonka jälkeen suspensio sentrifugoitiin ja sakka jäädytyskuivattiin. Näin saatiin 90 mg [His^{B25}]-ihmisen insuliinia, joka identifioitiin kokonaisaminohappoanalyysillä ja erotettujen, viinyylipyridyloitujen A- ja B-ketjujen jaksollisella Edman-degradaatiolla.

ESIMERKKI IX

[Tyr^{B25}, Asp^{B28}]-ihmisen insuliinin valmistaminen

150 mg des-(B23-30)-ihmisen insuliinia ja 350 mg Gly-Phe-Tyr-Tyr-Thr-Asp-Lys-Thr:ää liuotettiin seokseen, jossa oli 2,0 ml dimetyyliformamidia ja 1,0 ml vettä, pH säädettiin arvoon 6,5 trietyyliamiinilla. Nyt liuokseen lisättiin 8 mg sian trypsiiniä 0,20 ml:ssa 1 M kalsiumasetaattiliuosta ja reaktioseos jätettiin 15 °C:n lämpötilaan. 3 tunnin kuluessa HPLC-analyysi osoitti reaktioasteeksi 50 % ja reaktio pysäytettiin lisäämällä 25 ml 2-propanolia. Sentrifugoitiin, jonka jälkeen sakka liuotettiin uudestaan 10 ml:aan 1 M etikkahappoa ja siirrettiin 20 °C:ssa pylvääseen, joka oli 2,6 x 20 cm:n Lichroprep[®]RP-18 (25-40 μm) ja joka oli tasapainotettu puskurilla, jossa oli 0,5 mM kloorivetyä, 0,1 M natriumkloridia 30%:isessa (tilavuus) etanolissa. Sen jälkeen pylväs eluoitiin samalla puskurilla virtausnopeudella 20 ml/tunti, etanolipitoisuus nostettiin kuitenkin 50 %:iin 24 tunnin kuluessa. Fraktiot, jotka sisälsivät pääasiallisen proteiiniä, yhdistettiin, jonka jälkeen proteiini saostettiin laimentamalla samalla tilavuudella vettä ja säätämällä pH arvoon 5,0 natriumhydroksidiliuoksella. Seisotettiin yön yli 4 °C:ssa, jonka jälkeen sakka eristettiin sentrifugoimalla ja jäädytyskuivattiin.

Saanto oli 60 mg [Tyr^{B25}, Asp^{B28}]-ihmisen insuliinia, joka identifioitiin kokonaisaminohappoanalyysillä ja erotettu-

jen, vinyylipyridyloitujen A- ja B-ketjujen jaksollisella Edman-degradaatiolla.

ESIMERKKI X

Biologisen aktiivisuuden arvioiminen

Biologinen aktiivisuus in vitro määritettiin mittaamalla sitoutumisaffiniteetti eristettyjen rotan adiposyyttien ja hepatosyyttien insuliinireseptoreihin olennaisesti, kuten kuvaavat J.Gliemann, S.Gammeltoft: Diabetologia 10, 105-113 (1974).

Insuliinianalogeja verrattiin puolisynteettiseen ihmisen insuliiniin, jonka tehokkuudeksi asetettiin 100 % ja tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

	adiposyytit	hepatosyytit
[Tyr ^{B25}]-ihmisen insuluuni	356 %	222 %
[Tyr ^{B25} , Asp ^{B28}]-ihmisen insuliini	201 %	138 %
[His ^{B25}]-ihmisen insuliini	150 %	142 %
[His ^{B25} , Asp ^{B28}]-des[Thr ^{B30}]- ihmisen insuliini	130 %	135 %

Patenttivaatimukset

1. Ihmisen insuliinin analogit, joilla on korkea biologinen aktiivisuus, tunnetaan siitä, että aminohappotähde asemassa B25 on His tai Tyr ja että aminohappotähde yhdessä tai useammassa asemista A4, A8, A17, A21, B9, B10, B12, B13, B21, B26, B27, B28 ja B30 on mahdollisesti korvattu jollain toisella aminohappotähteellä ja että aminohappotähde asemassa B30 puuttuu mahdollisesti kokonaan tai se on suojattuna C-päässä esterin tai amidin muodossa, edellyttäen, että kun B25 on Tyr, silloin B30 on eri kuin Ala.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset ihmisen insuliinin analogit, tunnetaan siitä, että ne sisältävät [His^{B25}]:n tai [Tyr^{B25}]:n ja ainakin yhden korvaavan aminohappotähteen, joka on [Gln^{A4}], [His^{A8}], [Gln^{A17}], [Asp^{A21}], [Asp^{B9}], [Asp^{B10}], [Ile^{B12}], [Gln^{B13}], [Arg^{B13}], [Gln^{B21}], [Pro^{B21}], [Glu^{B26}], [Arg^{B27}], [Asp^{B28}], [Ala^{B30}] tai [Ser^{B30}], edellyttäen, että kun B25 on Tyr silloin B30 on eri kuin Ala.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset ihmisen insuliinin analogit, tunnetaan siitä, että ne sisältävät [His^{B25}]:n tai [Tyr^{B25}]:n ja ainakin kaksi korvaavaa aminohappotähdettä, joita ovat [Gln^{A4}], [His^{A8}], [Gln^{A17}], [Gln^{B13}], [Arg^{B13}], [Gln^{B21}], [Ile^{B21}], [Arg^{B27}], [Ala^{B30}] tai [Ser^{B30}], edellyttäen, että kun B25 on Tyr, silloin B30 on eri kuin Ala.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset ihmisen insuliinin analogit, tunnetaan siitä, että ne sisältävät [His^{B25}]:n tai [Tyr^{B25}]:n ja ainakin kaksi korvaavaa aminohappotähdettä, jotka ovat [His^{A8}], [Asp^{A21}], [Asp^{B9}], [Asp^{B10}], [Ile^{B12}], [Glu^{B26}], [Asp^{B28}], [Ala^{B30}] tai [Ser^{B30}], edellyttäen, että kun B25 on Tyr, silloin B30 on eri kuin Ala.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen ihmisen insuliinin analogi, t u n n e t t u siitä, että se on [Tyr^{B25}]-ihmisen insuliini, [Tyr^{B25}, Asp^{B28}]-ihmisen insuliini, [His^{B25}]-ihmisen insuliini, [His^{B25}, Asp^{B28}]-des[Thr^{B30}]-ihmisen insuliini, [Tyr^{B25}]-ihmisen insuliini-B30-amidi tai [His^{B25}]-ihmisen insuliini-B30-amidi.

6. Insuliinivalmiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää ainakin yhden ihmisen insuliinin analogin, jossa aminohappotähde asemassa B25 on His tai Tyr, aminohappotähde yhdessä tai useammassa asemasta A4, A8, A17, A21, B9, B10, B12, B13, B21, B26, B27, B28 ja B30 on mahdollisesti korvattu jollain toisella aminohappotähteellä ja aminohappotähde asemassa B30 mahdollisesti puuttuu tai se on suojattuna C-päässä esterin tai amidin muodossa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen insuliinivalmiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää ainakin yhden ihmisen insuliinin analogin, jossa on [His^{B25}] tai [Tyr^{B25}] ja ainakin yhden korvaavan aminohappotähteen, joka on [Gln^{A4}], [His^{A8}], [Gln^{A17}], [Asp^{A21}], [Asp^{B9}], [Asp^{B10}], [Ile^{B12}], [Gln^{B13}], [Arg^{B13}], [Gln^{B21}], [Ile^{B21}], [Glu^{B26}], [Arg^{B27}], [Asp^{B28}], [Ala^{B30}] tai [Ser^{B30}].

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen insuliinivalmiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää ainakin yhden ihmisen insuliinin analogin, jossa on [His^{B25}] tai [Tyr^{B25}] ja ainakin kaksi korvaavaa aminohappotähdettä, joita ovat [Gln^{A4}], [His^{A8}], [Gln^{A17}], [Gln^{B13}], [Arg^{B13}], [Gln^{B21}], [Ile^{B21}], [Arg^{B27}], [Ala^{B30}] tai [Ser^{B30}].

9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen insuliinivalmiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää ainakin yhden ihmisen insuliinin analogin, jossa on [His^{B25}] tai [Tyr^{B25}] ja ainakin kaksi korvaavaa aminohappotähdettä, joita ovat [His^{A8}], [Asp^{A21}], [Asp^{B9}], [Asp^{B10}], [Ile^{B12}], [Glu^{B26}], [Asp^{B28}], [Ala^{B30}] tai [Ser^{B30}].

10. Patenttivaatimuksen 6 mukainen insuliinivalmiste, tunnettu siitä, että se sisältää [Tyr^{B25}]-ihmisen insuliinin, [Tyr^{B25},Asp^{B28}]-ihmisen insuliinin, [His^{B25}]-ihmisen insuliinin, [His^{B25},Asp^{B28}]-des[Thr^{B30}]-ihmisen insuliinin, [Tyr^{B25}]-ihmisen insuliini-B30-amidin tai [His^{B25}]-ihmisen insuliini-B30-amidin.

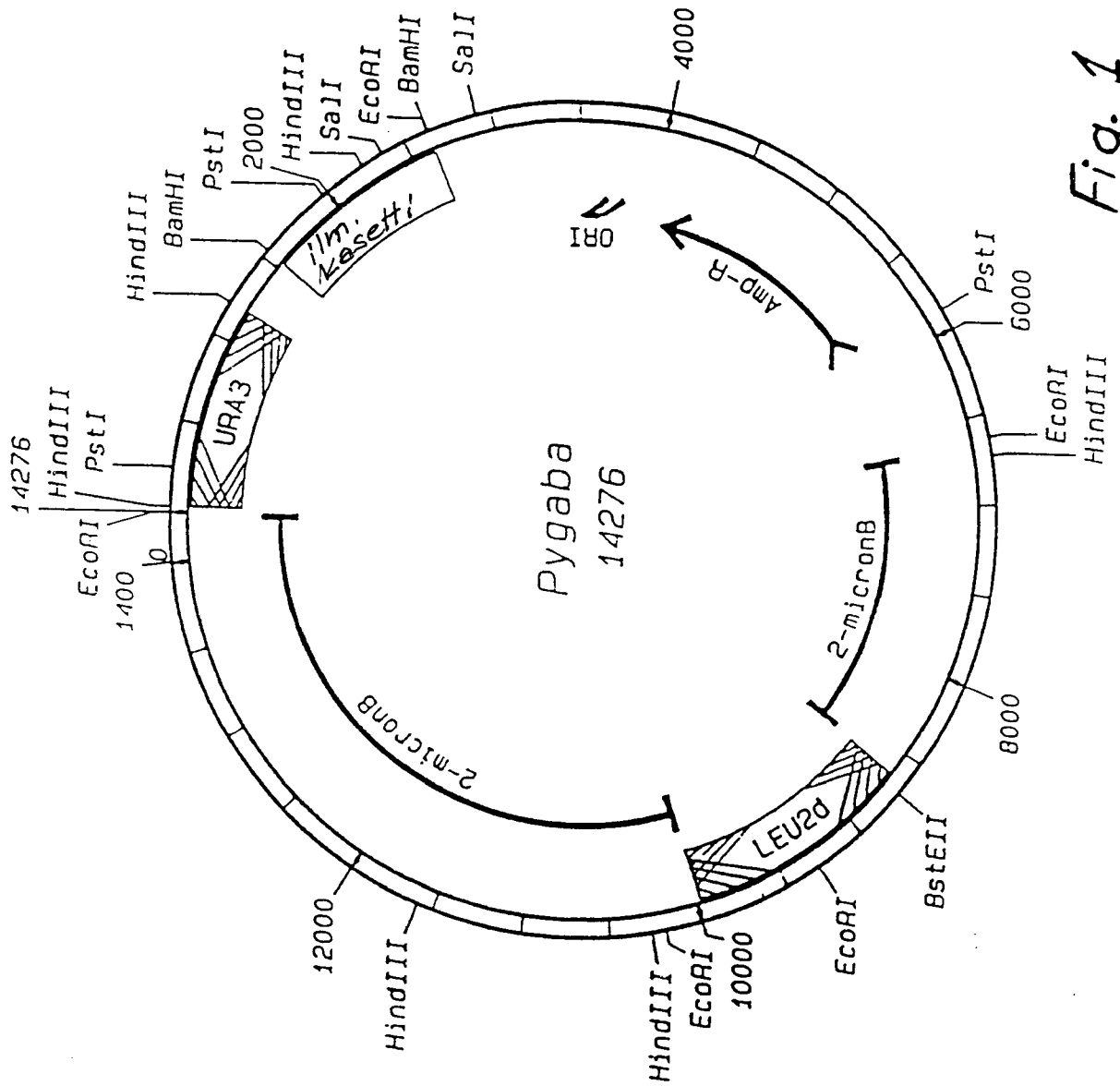


Fig. 1

100104 210008

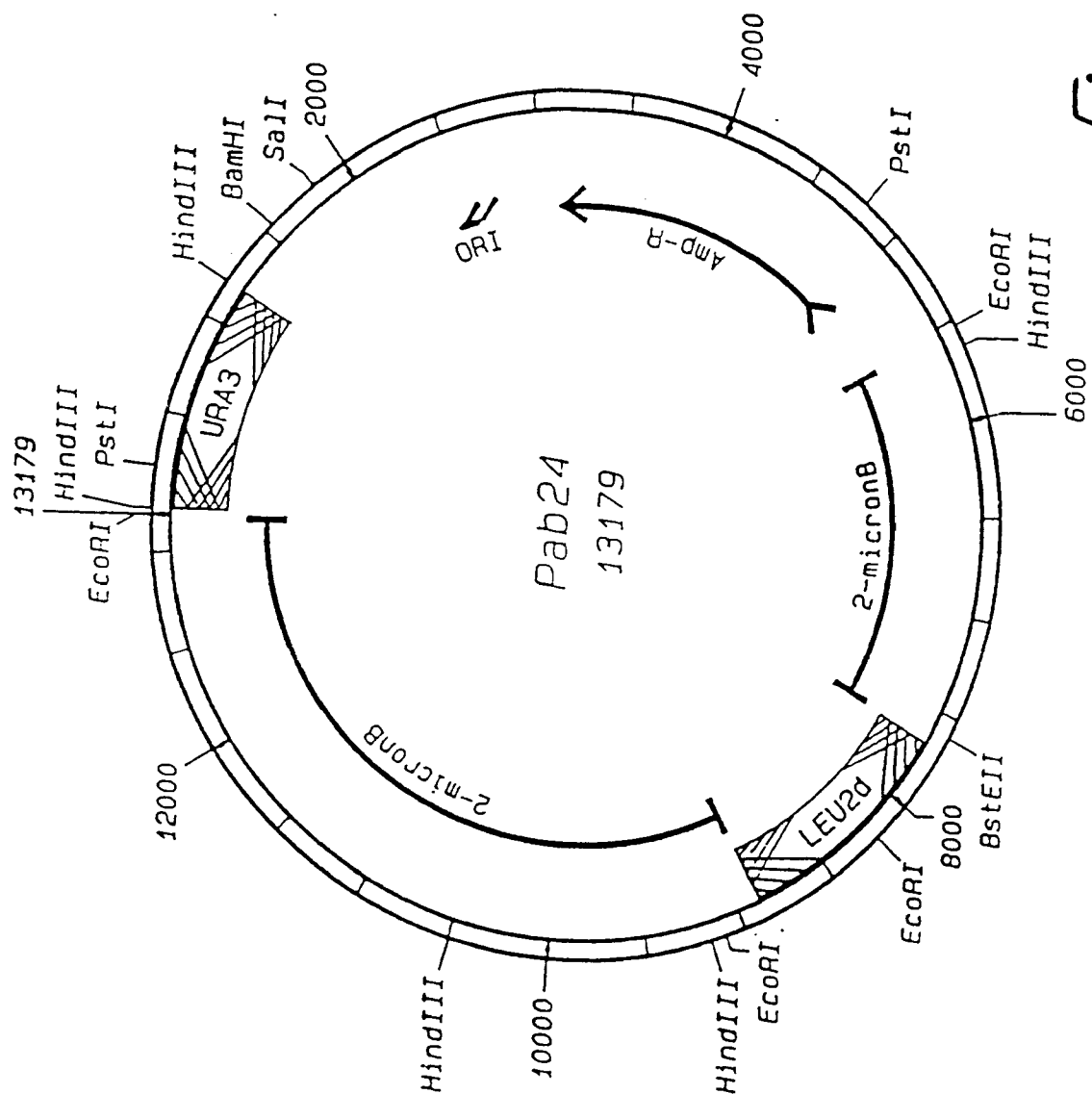


Fig. 2

**PATENTTI-JA REKISTERIHALLITUS
PATENTTIOSASTO**

TUTKIMUSRAPORTTI

PATENTTIHAK.NRO 910286	LUOKKA	TUTKIJA JAS	TUTKIMUSTUL. SAATU <table border="1" style="width: 100%; height: 40px; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> <td style="width: 12.5%;"></td> </tr> </table>								
TUTKITUT LUOKAT	TUTKITUT MAAT FI SE NO DK CH DE WO EP GB US		TUTK. KESK. *)								
PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!									
1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)											
*) TUTKIMUS KESKEYTETTY ESTEEN LÖYTYMISEN TAKIA KÄÄNNÄ!											

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		

MUITA JULKAISUJA / ON-LINE TUTKIMUS, JOS TEHTY (TIETOKANTA,
HAKUSANAT YM.)

J. Biol. Chem., 261 (16) 7332-7341 (1986)

-- 11 - 262 (1987)

Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 368 (1987) 709-716

HELSINKI

20.3.95

PÄIVÄYS

Julka Yrjö
ALLEKIRJOITUS