



(11) Número de Publicação: PT 792290 E

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)
C07K014/62 A A61K038/28 B

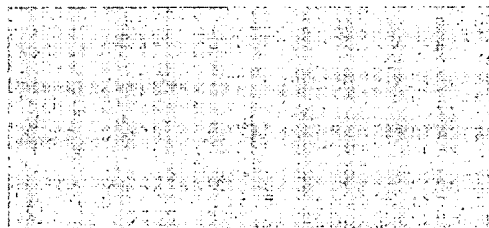
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1994.09.16	(73) Titular(es): NOVO NORDISK A/S. NOVO ALLÉ DK-2880 BAGSVAERD DK
(30) Prioridade: 1993.09.17 DK 104493 1994.02.02 US 190829	
(43) Data de publicação do pedido: 1997.09.03	(72) Inventor(es): JAN MARKUSSEN JOHN BROBERG HALSTROM IB JONASSEN SVEND HAVELUND ASSER SLOTH ANDERSEN DK DK DK DK DK
(45) Data e BPI da concessão: 2001.08.29	(74) Mandatário(s): MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA RUA D. JOÃO V, 9, 2º AND.-DTO. 1250 LISBOA PT

(54) Epígrafe: INSULINA ACILADA

(57) Resumo:

INSULINA ACILADA



MEMORIA DESCRITIVA

INSULINA ACILADA

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a novos derivados da insulina humana que são solúveis e que apresentam um perfil de acção prolongada, a um método para fabricar esses derivados, a composições farmacêuticas que os contém e ao uso de esses derivados insulínicos no tratamento contra a diabete.

Estado da técnica

Muitos pacientes diabéticos recebem tratamento por meio de múltiplas injeções de insulina diárias em um sistema que compreende uma ou duas injeções diárias de uma insulina de efeito prolongado para cobrir a necessidade basal complementada por meio de injeções com bolus de uma insulina de acção rápida para cobrir essa necessidade em relação com as comidas.

Os compostos com insulina de efeito prolongado são bem conhecidos na técnica. Em consequência, um dos tipos principais de compostos com insulina de efeito prolongado compreende as suspensões aquosas injectáveis de cristais de insulina ou de insulina amorfa. Nestas composições, os compostos com insulina utilizados tipicamente são a insulina protaminica, a insulina cínica ou a insulina cínica protamínica.

Alguns inconvenientes estão associados ao uso de suspensões de insulina. Deste modo, para garantir uma dosificação exacta, as partículas de insulina devem ser suspensas de forma homogénea agitando-as ligeiramente antes de extrair um volume definido dessa suspensão de uma via, ou antes, de que o cartucho as

injecte. Além disso, para armazenar as suspensões de insulina, a temperatura deve ser mantida dentro de uns limites mais restringidos que para as soluções de insulina para evitar a formação de grumos ou a coagulação.

Enquanto que no passado se acreditava que as protaminas não eram imunogénicas, hoje em dia se descobriu que as protaminas podem ser imunogénicas nos seres humanos e que seu uso com fins médicos pode ajudar a formação de anticorpos (Samuel et al., Studies on the immunogenicity of protamines in humans and experimental animals by means of a micro-complement fixation test, Clin. Exp. Immunol. 33, págs. 252-260 (1978)).

Além disso, também foram encontradas provas de que os complexos de insulina protamínica são em si mesmos imunogénicos (Kurtz et al., Circulating IgG antibody to protamine in patients treated with protamine-insulins. Diabetologica 25, págs. 322-324 (1983)). Em consequência, em alguns pacientes deve ser evitado o uso de composições com insulina de efeito prolongado que contenham protaminas.

Outros tipos de composições com insulina de efeito prolongado são aquelas que contém um valor de pH por debaixo do pH fisiológico a partir da qual a insulina se precipitará a causa do aumento no valor do pH quando se injecta a solução. Um inconveniente derivado destas soluções está em que a distribuição do tamanho das partículas do precipitado forma-se sobre o tecido durante a injeção e, deste modo, o momento em que se administra a medicação depende do fluxo sanguíneo no lugar da injeção, assim como de outros parâmetros que são bastante imprevisíveis. Outro dos inconvenientes consiste em que as partículas sólidas de insulina podem actuar como irritante local causando uma inflamação do tecido sobre o que se administra a injeção.

Na WO 91/12817 (Novo Nordisk A/S) se descrevem composições com insulina de efeito prolongadas solúvel que incluem complexos de insulina com cobalto (III). A dilação desses complexos é só intermédia e sua bio-disposição é reduzida.

A insulina humana apresenta três grupos amino primários: o grupo N-terminal da cadeia a e da cadeia B e o grupo α -amino de Lys^{B29}. A partir da técnica anterior se conhecem vários derivados insulínicos substituídos em um ou mais destes grupos. Deste modo, a patente US Nº 3,528,960 (Eli Lilly) se refere às insulinas de N-carboxiaroil nas que um, dois ou três grupos amino primários da molécula de insulina apresentam um grupo carboxiaroil. Não se descreve nenhuma insulina especificamente N^{B29}-substituída.

Segundo a patente GB Nº 1.492.997 (Nat. Res. Dev. Corp.), se descobriu que a insulina com uma substituição do carbamilo em N^{B29}-apresenta um perfil aperfeiçoado de efeito hipoglucémico.

A solicitude de patente pública JP Nº 1-254699 (Kodama Co., Ltd.) descreve uma insulina na que um ácido gorduroso é ligado ao grupo amino de Phe^{B1} ou ao grupo α -amino de Lys^{B29} ou a ambos grupos. O objectivo declarado da derivação é obter uma preparação de insulina estável farmacologicamente aceitável.

M. Hashimoto et al., Pharmaceutical Research, Vol. 6, Nº 2, 1989 descreve dois derivados de palmitoil de insulina bovina, insulina de B1-monopalmitoil e insulina de B1,B29-dipalmitoil e suas actividades biológicas. A figura 5 apresenta as mudanças no nível de glicose no sangue depois da injeção intravenosa de dois derivados insulínicos em 1 N HCl e a figura 6 mostra as mudanças depois a injeção intramuscular. Baseando-se nos resultados, os

autores concluíram que depois a injeção intramuscular só se observava um efeito hipoglucêmico leve no caso da insulina de B1-monopalmitoil e que o efeito da insulina de B1,B29-dipalmitoil era insignificante.

As insulinas que na sua posição B30 têm um aminoácido com ao menos cinco átomos de carbono que não têm porquê ser necessariamente codificados por uma terceira de nucleótidos aparecem descritas na solicitude da patente pública JP Nº 57-067548 (Shionogi). Em ela se reivindica que os análogos de insulina são úteis para tratar a diabete mellitus, particularmente em pacientes que são insulino-resistentes devido a geração de anticorpos da insulina bovina ou porcina.

O término "derivado insulínico" tal e como se emprega aqui faz referência a um composto que apresenta uma estrutura molecular semelhante a da insulina humana que inclui as pontes disulfúricas entre Cys^{A7} e Cys^{B7} e entre Cys^{A20} e Cys^{B19}, assim como uma ponte disulfúrica interna entre Cys^{A6} e Cys^{A11}, e que têm actividade insulínica.

Mas, ainda se necessitam composições de insulina injectável, com efeito, prolongado em forma de solução e que contenham insulinas que se mantêm em forma de solução depois a injeção, que causem uma inflamação mínima e possuam propriedades imunogénicas.

Um dos objectivos da presente invenção consiste em fornecer derivados da insulina humana, com um perfil de acção de efeito prolongado, que sejam solúveis a uns valores de pH fisiológicos.

Outro dos objectivos da presente invenção consiste em estabelecer uma composição farmacêutica que inclui os derivados da insulina humana segundo a invenção.

Outro objectivo mais da invenção consiste em fornecer um método para fabricar esses derivados da insulina humana segundo a invenção.

Resumo da invenção

Surpreendentemente, formando determinados derivados de insulina humana, nos que o grupo α -amino de Lys^{B29} tem um substituinte lipofílico, apresentam um perfil de acção de efeito prolongado e são solúveis a valores de pH fisiológicos.

Em consequência, no seu aspecto mais amplo, a presente invenção se refere a um derivado insulínico que apresenta a seguinte sequência:

Cadeia A S _____ S

7

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-

1 2 3 4 5 6 8 9 10 11 12

S

Cadeia B S

Xaa_Val-Xa__Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Cadeia A (cont.)

20

Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa (ID de SEC N°:1)

13 14 15 16 17 18 19 21

S

Cadeia B (cont.) S

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

13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

Cadeia B (cont.)

Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Xaa (ID de SEC N°:2)

25 26 27 28 29 30

onde

Xaa nos posições A21 e B3 são, independentemente, qualquer resíduo aminoácido que possa ser codificado pelo código genético, salvo Lys, Arg e Cys;

Xaa na posição B1 é Phe ou é suprimido;

Xaa na posição B30 é (a) um aminoácido lipofílico não codificável que tem entre 10 e 24 átomos de carbono, em cujo caso um grupo acilo derivado de um ácido carboxílico com até 5 átomos de carbono é ligado ao grupo α -amino de Lys^{B29}, (b) qualquer resíduo aminoácido codificado pelo código genético excepto Lys, Arg e Cys, em cujo caso o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico ou (c) é suprimido, em cujo caso o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico; e qualquer de seus complexos Zn²⁺ derivados, sempre que, quando Xaa se encontre na posição B30 seja Thr ou Ala, Xaa nos posições A21 e B3 serão ambos Asn, e Xaa na posição B1 será Phe; em consequência, o derivado insulínico é um complexo Zn²⁺.

Numa forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido B30 é suprimido ou este é qualquer resíduo aminoácido codificado pelo código genético Lys, Arg e Cys; os resíduos aminoácidos A21 e o B3 são, independentemente, qualquer resíduo aminoácido que possa ser codificado pelo código genético salvo Lys, Arg e Cys; PheB1 pode ser suprimido; o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico que compreende, como mínimo, 6 átomos de carbono; e 2-4 iões Zn²⁺ podem ser ligados a cada hexâmero de insulina sempre e quando B30 seja Thr ou Ala e A21 e B3 sejam ambos Asn e não se suprima Phe^{B1}, então 2-4 iões Zn²⁺ são ligados a cada hexâmero do derivado insulínico.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido B30 é suprimido ou é qualquer resíduo aminoácido codificado pelo código genético excetuando Lys, Arg e Cys; os resíduos aminoácidos A21 e B3 são, independentemente, todos os resíduos aminoácidos codificados pelo código genético excetuando Lys, Arg e Cys, sempre e quando o resíduo aminoácido B30 seja Ala ou Thr, então ao menos um dos resíduos A21 e B3 será diferente a Asn; se pode suprimir PheB1; e o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico que compreende, como mínimo, 6 átomos de carbono.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido B30 é suprimido ou é qualquer resíduo aminoácido codificado pelo código genético excetuando Lys, Arg e Cys; os resíduos aminoácidos A21 e B3 são, independentemente, todos os resíduos aminoácidos codificados pelo código genético excetuando Lys, Arg e Cys; PheB1 pode ser suprimido; o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico que compreende, como mínimo, 6 átomos de carbono; e os 2-4 íões Zn^{2+} são ligados a cada hexâmero de insulina.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido B30 é suprimido.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido B30 é Asp.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido B30 é Glu.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido B30 é Thr.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é um aminoácido lipofílico que tem, como mínimo, 10 átomos de carbono.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é um α -aminoácido lipofílico que apresenta entre 10 e 24 átomos de carbono.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é um α -aminoácido alifático saturado de cadeia lineal que tem entre 10 e 24 átomos de carbono.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é D- ou L-Ne-dodecanoillisina.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é um ácido α -aminodecanoico.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é um ácido α -aminoundecanoico.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é um ácido α -aminododecanoico.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é ácido α -aminotridecanoico.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é um ácido α -aminotetradecanoico.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é um ácido α -aminopentadecanoico.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é um ácido α -aminohexadecanoico.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o aminoácido B30 é um α -aminoácido.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido A21 é Ala.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido A21 é Gln.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido A21 é Gly.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido A21 é Ser.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido B3 é Asp.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido B3 é Gln.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o resíduo aminoácido B3 é Thr.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico que é um grupo acilo derivado de um ácido carboxílico que tem, como mínimo, 6 átomos de carbono.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana nos que o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico que é um grupo acilo, simples ou ramificado, que se corresponde com um ácido carboxílico que tem um cadeia de átomos de carbono de entre 8 e 24 átomos de longitude.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico que é um grupo acilo derivado de um ácido gorduroso que tem, como mínimo, 6 átomos de carbono.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico que é um grupo acilo derivado de um ácido carboxílico lineal saturado que inclui entre 6 e 24 átomos de carbono.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico que é um grupo acilo derivado de um ácido carboxílico lineal saturado que inclui entre 8 e 12 átomos de carbono.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico que é um grupo acilo derivado de um ácido carboxílico lineal saturado que inclui entre 10 e 16 átomos de carbono.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico que é um grupo oligo oxietileno que inclui até 10 unidades de oxietileno, ainda que se prefere que seja de até 5.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico que é um grupo oligo oxipropileno que inclui até 10 unidades de oxipropileno, ainda que se prefere que seja de até 5.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde cada hexâmero de insulina liga 2 iões Zn^{2+} .

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde cada hexâmero de insulina liga 3 iões Zn^{2+} .

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a um derivado de insulina humana onde cada hexâmero de insulina liga 4 iões Zn^{2+} .

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere ao uso de um derivado de insulina humana segundo a invenção para a preparação de um medicamento para tratar a diabete.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a uma composição farmacêutica para o tratamento de diabetes em um paciente que precise esse tratamento que inclui uma quantidade terapeuticamente eficaz de um derivado de insulina humana segundo a invenção junto com um suporte farmaceuticamente aceitável.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a uma composição farmacêutica para tratar a diabete em um paciente que necessite esse tratamento que inclui uma quantidade terapeuticamente eficaz de um derivado de insulina humana segundo a invenção, misturada com uma insulina ou com um semelhante de insulina que tem um começo rápido de acção, junto com um suporte farmaceuticamente aceitável.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que inclui um derivado de insulina humana segundo a invenção que é solúvel a valores de pH fisiológicos.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que inclui um derivado de insulina humana segundo a invenção que é solúvel a valores de pH de entre aproximadamente 6.5 e aproximadamente 8.5.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a uma composição farmacêutica de efeito prolongado que inclui um derivado de insulina humana segundo a invenção.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que é uma solução que contém entre aproximadamente 120 nmol/ml e aproximadamente 1200 nmol/ml, preferivelmente perto de 600 nmol/ml, de um derivado de insulina humana segundo a invenção.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere ao uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um derivado insulínico segundo a presente invenção junto com um suporte farmacêuticamente aceitável para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento da diabetes.

Em outra forma de realização preferida, a invenção se refere ao uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um derivado insulínico segundo a presente invenção, junto com insulina ou com uma semelhante de insulina que apresenta um começo de acção rápida, junto com um suporte farmacêuticamente aceitável para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento da diabetes.

A continuação se mostra alguns exemplos de derivados de insulina humana preferidos segundo a presente invenção nos que os iões Zn^{2+} não são ligados:

insulina humana de N[□]B29-tridecanoil des(B30),

insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil des(B30),

insulina humana de N[□]B29-decanoil des(B30),

insulina humana de N[□]B29-dodecanoil des(B3),

insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 des(B30),

insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 des(B30),

insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 des(B30),

insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 des(B30),

insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 GlnB3 des(B30),

insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 GlnB3 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 GlnB3 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 GlnB3 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-dccanoil AlaA21 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 GlnB3 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 GlnB3 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21 GlnB3 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 GlnB3 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlnB3 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlnB3 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-decanoil GlnB3 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlnB3 des(B30),
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21,
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21,
insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21,
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21,
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 GlnB3,
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 GlnB3,
insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 GlnB3,
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 GlnB3,
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21,
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21,
insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21,

insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Ala^{A21},
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Ala^{A21} Gln^{B3},
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Ala^{A21} Gln^{B3},
insulina humana de N[□]B29-decanoil Ala^{A21} Gln^{B3},
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Ala^{A21} Gln^{B3},
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gln^{B3},
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gln^{B3},
insulina humana de N[□]B29-decanoil Gln^{B3},
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gln^{B3},
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-decanoil Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gly^{A21} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gly^{A21} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-decanoil Gly^{A21} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gly^{A21} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-decanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-tridecanoyl Ala^{A21} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Ala^{A21} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-dccanoil Ala^{A21} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Ala^{A21} Glu^{B30},
insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30},

insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30},
 insulina humana de N[□]B29-decanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30},
 insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30},
 insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gln^{B3} Glu^{B30},
 insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gln^{B3} Glu^{B30},
 insulina humana de N[□]B29-decanoil Gln^{B3} Glu^{B30}, e
 insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gln^{B3} Glu^{B30}.

A continuação mostra-se alguns exemplos de derivados insulínicos preferidos segundo a presente invenção nos que dois iões Zn²⁺ são ligados por hexâmero de insulina

(insulina humana de N[□]B29-tridecanoil des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gly^{A21} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gly^{A21} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Gly^{A21} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gly^{A21} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Gly^{A21} Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Ala^{A21} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Ala^{A21} des(B30))₆, 2Zn²⁺,

(insulina humana de N[□]B29-decanoil Ala^{A21} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoyl Ala^{A21} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Ala^{A21} Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gln^{B3} des(B30))₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil)₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil)₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil)₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil)₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gly^{A21})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gly^{A21})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Gly^{A21})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gly^{A21})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gly^{A21} Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gly^{A21} Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Gly^{A21} Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gly^{A21} Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Ala^{A21})₆, 2Zn²⁺,

9

(insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Ala^{A21})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Ala^{A21})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Ala^{A21})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Ala^{A21} Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Ala^{A21} Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Ala^{A21} Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Ala^{A21} Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gln^{B3})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gln^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gly^{A21} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gly^{A21} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Gly^{A21} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gly^{A21} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,

9

(insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Ala^{A21} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Ala^{A21} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Ala^{A21} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Ala^{A21} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺ y
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gln^{B3} Glu^{B30})₆, 2Zn²⁺.

A continuação se mostra alguns exemplos de derivados de insulina humana segundo a presente invenção nos que três iões Zn²⁺ são ligados por hexâmero de insulina:

(insulina humana de N[□]B29-tridecanoil des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil Gly^{A21} des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil Gly^{A21} des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil Gly^{A21} des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil Gly^{A21} des(B30))₆, 3Zn²⁺,

(insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21 GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlnB3 des(B30))₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21)₆, 3Zn²⁺,

9

(insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21 GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlnB3)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 GluB30)₆, 3Zn²⁺,

9

(insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21 GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺ y
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlnB3 GluB30)₆, 3Zn²⁺.

A continuação se mostra os exemplos preferidos de derivados de insulina humana segundo a presente invenção nos que quatro iões Zn²⁺ são ligados por hexámero de insulina:

(insulina humana de N[□]B29-tridecanoil des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil des(B30))₆, 4Zn²⁺,

9

(insulina humana de N[□]B29-decanoil des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21 GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlnB3 des(B30))₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil)₆, 4Zn²⁺,

(insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 GlnB3)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 GlnB3)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 GlnB3)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 GlnB3)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 GlnB3)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 GlnB3)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21 GlnB3)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 GlnB3)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlnB3)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlnB3)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlnB3)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlnB3)₆, 4Zn²⁺,

9

(insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlyA21 GlnB3 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlyA21 GlnB3 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlyA21 GlnB3 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil GlyA21 GlnB3 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil AlaA21 GlnB3 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil AlaA21 GlnB3 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil AlaA21 GlnB3 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-dodecanoil AlaA21 GlnB3 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tridecanoil GlnB3 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-tetradecanoil GlnB3 GluB30)₆, 4Zn²⁺,
 (insulina humana de N[□]B29-decanoil GlnB3 GluB30)₆, 4Zn²⁺ y

(insulina humana de N^B29-dodecanoil Gln^B3 Glu^B30)₆, 4Zn²⁺.

Breve descrição dos desenhos

A presente invenção é ilustrada, além disso, fazendo referência aos desenhos anexos nos que:

A figura 1 mostra a construção do plásmido pEA5.3.2;

A figura 2 mostra a construção do plásmido pEA108; e

A figura 3 mostra a construção do plásmido pEA113.

Descrição detalhada da invenção

Linguagem utilizada

Os códigos de três letras e os códigos de uma letra dos resíduos aminoácidos usados, aqui aparecem estabelecidos em J. Biol. Chem. 243, pág. 3558 (1968).

Nas sequências de ADN, A é adenina, C é citosina, G é guanina e T é timina.

Também se empregam os seguintes acrónimos:

DMSO para dimetil sulfóxido, DMF para dimetilformamida, Boc para terc-butoxicarbonilo, CLARC-FI para cromatografia líquida em fase invertida de alto rendimento, X-OSu é um éster de n-hidroxisuccinimida, X é um grupo acilo e TFA faz referência a um ácido trifluoroacético.

Preparação de derivados insulínicos lipofílicos

Os derivados insulínicos segundo a presente invenção podem ser preparados, por exemplo, no modo que se descreve a continuação:

1. Derivados insulínicos que representam, na posição B30, um resíduo aminoácido codificado pelo código genético, por exemplo, treonina (insulina humana) ou alanina (insulina porcina).

1.1 A partir da insulina humana.

Trata-se a insulina humana com um reactivo de Boc (por exemplo, dicarbonato de di-terc-butilo) para formar insulina humana (A1,B1)-diBoc, ou seja, insulina humana na que o extremo N-terminal de ambas cadeias está protegido por um grupo Boc. Depois uma depuração opcional, por exemplo, por meio de CLARC, introduz-se um grupo acilo no grupo α -amino de Lys^{B29} deixando que o produto reaja com um éster de n-hidroxisuccinimida da fórmula X-OSu na que X é o grupo acilo a introduzir. No último passo, se emprega TFA para eliminar os grupos Boc e se isola o produto, ou seja, a insulina humana N^{B29}-X.

1.2 A partir de um precursor de insulina com uma cadeia única.

Pode-se empregar como material de partida um precursor de insulina de cadeia única, estendido em posição B1 com uma extensão (Ext) ligada a B1 através de um resíduo de arginina e onde a ponte desde B30 a A1 é um resíduo de arginina, ou seja, um composto da fórmula general Ext-Arg-B(1-30)-Arg-A(1-21). A acilação de esse material de partida com um éster de n-hidroxisuccinimida da fórmula general X-OSu na que X é um grupo acilo, introduz o grupo acilo X no grupo α -amino de Lys^{B29} e no grupo amino N-terminal do precursor. Durante o tratamento deste precursor acilado derivado da fórmula (N^{B29}-X),X-Ext-Arg-B(1-30)-Arg-A(1-21) com tripsina numa mistura com água e um dissolvente orgânico adequado misturado em água adequada, por exemplo, DMF, DMSO ou um álcool inferior, obtém-se uma insulina intermédia da fórmula (N^{B29}-X),ArgB31. Ao tratar este intermédio com carboxipeptidase B se obtém o produto desejado, ou seja, a insulina (N^{B29}-X).

2. Derivados insulínicos sem resíduos aminoácidos na posição B30, ou seja, insulinas des(B30).

2.1 A partir da insulina humana ou insulina porcina.

Depois o tratamento com carboxipeptidase a em tampão amônico, a insulina humana e a insulina porcina darão como resultado a insulina des(B30). Depois uma depuração opcional, se tratou a insulina des(B30) com um reactivo de Boc (por exemplo dicarbonato de di-terc-butilo) para formar a insulina (A1,B1)-diBoc des(B30), ou seja, uma insulina des(B30) na que o extremo N-terminal de ambas cadeias está protegido por um grupo Boc. Depois uma depuração opcional, por exemplo, por meio de CLARC, se introduziu um grupo acilo no grupo α -amino de Lys^{B29} deixando que o produto reagira com um éster de n-hidroxisuccinimida derivado da fórmula X-OSu na que X é o grupo acilo a introduzir. No último passo, se emprega TFA para suprimir os grupos Boc e se isola o produto, ou seja, a insulina (N^{B29}-X) des(B30).

2.2 A partir de um precursor de insulina humana de cadeia única.

Considera-se que um precursor de insulina humana de cadeia única, que se estende em posição B1 com uma extensão (Ext) ligada a B1 por meio de um resíduo de arginina e que apresenta uma ponte entre B30 e A1, pode ser um material de partida útil. Prefere-se que o ponte seja um peptídico da fórmula Yn-Arg, na que n é um aminoácido codificável exceptuando a lisina e a arginina, e n é zero ou um inteiro entre 1 e 35. Quando n>1, E pode designar diferentes aminoácidos. Alguns exemplos referidos de pontes entre B30 e A1 são: AlaAlaArg, SerArg, SerAspAspAlaArg e Arg (Patente Europeia Nº 163529). Ao tratar o precursor da fórmula general Ext-Arg-B(1-30)-Yn-Arg-A(1-21) com uma lisilendopeptidase, por exemplo, a protease de *Achromobacter lyticus*, se obtém insulina Ext-Arg-B(1-29) Thr-Yn-Arg-A(1-21) des(B30). A acilação deste intermédio com um éster de n-hidroxisuccinimida da fórmula general X-OSu na que X é um grupo acilo, introduz o grupo acilo X no grupo α -amino de Lys^{B29} e no grupo amino N-terminal do cadeia a e o cadeia B para dar como resultado a insulina (N^{B29}-X)-X-Ext-Arg-B(1-29) X-Thr-Yn-Arg-A(1-21) des(B30). Este intermédio durante o tratamento com tripsina numa mistura de

água com um dissolvente orgânico adequado, por exemplo, DMF, DMSO ou um álcool inferior, da o derivado desejado, ou seja, a insulina humana (N^{B29}-X) des(B30).

Dados sobre as insulinas modificadas N^{B29}.

Determinados dados experimentais sobre as insulinas modificadas NeB29 aparecem na Tabela 1.

Calculou-se a lipofilia de um derivado insulínico em relação a insulina humana, k'_{rel} , numa coluna de CLARC LiChrosorb RP18 (5 μ m, 250x4 mm) por meio de uma eluição isotáctica a 40°C usando misturas de a) 0,1 M de tampão de fosfato sódico, pH 7.3, que contém um 10% de acetonitrilo, e B) um 50% de acetonitrilo em água como eluente. Controlou-se a eluição ao seguir a absorção de UV do eluato a 214 nm. Calculou-se o tempo zero, t_0 , injectando 0,1 mM de nitrato sódico. Ajustou-se o tempo de retenção para a insulina humana, t_{humana} , a como mínimo 2 t_0 variando a proporção entre as soluções A e B. $k'_{rel} = (t_{derivado} - t_0) / (t_{humana} - t_0)$.

Estudou-se o grau de prolongação do efeito de redução da glicose em sangue em coelhos. Submeteu-se o exame cada derivado insulínico por meio de uma injeção subcutânea de 12 nmol em cada um dos seis coelhos em um ensaio de desaceleração de um só dia. Extraiu-se uma mostra de sangue para efectuar uma análise de glicose antes da injeção e 1, 2, 4 e 6 horas depois de essa injeção. A continuação se mostra os valores de glicose achados como porcentagem dos valores iniciais. O índice de Continuação, calculado a partir dos valores de glicose em sangue, é o índice de continuação (prolongação) a escala, ver pág. 211 em Markussen et al., Protein Engineering 1 (1987) 205-213. A fórmula foi convertida a escala de forma que de como resultado um valor de 100 com

insulina ultralente bovina e um valor de 0 com insulina Actrapid® (Novo Nordisk A/S, 2880 Bagsvaerd, Dinamarca).

Os derivados insulínicos catalogados na Tabela 1 foram administrados em soluções contendo 3 Zn^{2+} por hexâmero de insulina, exceptuando os que se saber, especificamente que carecem de Zn.

No caso dos análogos de efeito muito prolongado, o modelo baseado em coelhos foi inadequado já que o decrescimento da glicose em sangue inicial é demasiado pequeno como para estimar o índice de continuação.

A prolongação desses análogos se pode caracterizar de melhor maneira graças à taxa de desaparecimento em porcos. $T_{50\%}$ é o tempo quando o 50% do semelhante A14 Tyr(^{125}I) há desaparecido do lugar de injeção uma vez se mediu com a ajuda de um γ -contador exterior (Ribet, O et al., The Pig as a Model for Subcutaneous Absorption in Man. En: M. Serrano-Rios e P. J. Lefebvre (Eds): Diabetes 1985; Proceedings of the 12th Congress of International Diabetes Federation, Madrid, Espanha, 1985 (Excerpta Médica, Amsterdam, (1986) 891-96).

Na Tabela 2 se mostram os valores % de uma série de análogos de insulina de efeito muito prolongado. Esses análogos se administraram em soluções que continhas 3 Zn^{2+} por hexâmero de insulina.

TABELA I

Derivado insulínico *)	Lipofilia relativa	Glucose em sangue, % do valor inicial				Índice de continuação
		1 h	2 h	4 h	6 h	
Insulina de N ^{□B29} -benzoilo	1,14					
Insulina de N ^{□B29} -fenilacetilo (sin Zn)	1,28	55,4	58,9	88,8	90,1	10
Insulina de N ^{□B29} -ciclohexilacetilo	1,90	53,1	49,6	66,9	81,1	28
Insulina de N ^{□B29} -ciclohexilpropionilo	3,29	55,5	47,6	61,5	73,0	39
Insulina de N ^{□B29} -ciclohexilvaleroilo	9,87	65,0	58,3	65,7	71,0	49
Insulina de N ^{□B29} -octanoilo	3,97	57,1	54,8	69,0	78,9	33
Insulina de N ^{□B29} -decanoil, des(B30)	11,0	74,3	65,0	60,9	64,1	65
Insulina de N ^{□B29} -decanoil	12,3	73,3	59,4	64,9	68,0	60
Insulina de N ^{□B29} -undecanoil, des(B30)	19,7	88,1	80,0	72,1	72,1	80
Insulina de N ^{□B29} -lauroil, des(B30)	37,0	91,4	90,0	84,2	83,9	78
Insulina de N ^{□B29} -miristoi	113	98,5	92,0	83,9	84,5	97
Insulina de N ^{□B29} -coloilo	7,64	58,2	53,2	69,0	88,5	20
Insulina de N ^{□B29} -deoxicoiloil (sin Zn)	24,4	76,5	65,2	77,4	87,4	35
Insulina de N ^{□B29} -litocoloiloil (sin Zn)	51,6	98,3	92,3	100,5	93,4	115

Insulina de N ^{□B29} -4-benzoil-fenilalanilo	2,51	53,9	58,7	74,4	89,0	14
Insulina de N ^{□B29} -3,5-diyodotirosil	1,07	53,9	48,3	60,8	82,1	27
Insulina de N ^{□B29} -L-tiroxil	8,00					



TABELA 2

Derivado de insulina humana	Hidrofobia relativa	Desaparecimento subcutâneo em porcos
600 $\square$ M, $3Zn^{2+}$ /hexâmero, fenol al 0,3%, glicerol al 1,6%, pH 7.5	k'_{rel}	$T_{50\%, horas}$
Insulina de $N^{\square B29}$ -decanoilo des(B30)	11,0	5,6
Insulina de $N^{\square B29}$ -undecanoilo des(B30)	19,7	6,9
Insulina de $N^{\square B29}$ -lauroilo des(B30)	37	10,1
Insulina de $N^{\square B29}$ -tridecanoilo des(B30)	65	12,9
Insulina de $N^{\square B29}$ -miristoil des(B30)	113	13,8
Insulina de $N^{\square B29}$ -palmitoil des(B30)	346	12,4
Insulina del ácido $N^{\square B29}$ -succinimido-mirístico	10,5	13,6
Insulina de $N^{\square B29}$ miristoil	113	11,9
Insulina NPH humana		10

Solubilidade

O solubilidade de todas as insulinas modificadas com N^{B29} mencionadas na Tabela 1, que contém 3 iões Zn²⁺ por hexâmero de insulina, é 600 nmol/ml superior numa formulação farmacêutica neutra (pH 7.5) e aquosa que compreende, além disso, um 0,3% de fenol como conservante e um 1,6% de glicerol para conseguir a isotonicidade. 600 nmol/ml é a concentração de insulina humana que se pode encontrar nos composições com 100 IU/ml que normalmente se empregam nos tratamentos.

O grupo amino $\square$ -B29 pode ser um componente de uma enlace de amidas, uma enlace de sulfonamidas, uma carbamida, uma tiocarbamida ou um carbamato. O substituinte lipofílico transportado pelo grupo amino $\square$ -B29 também pode ser um grupo alquilo.

As composições farmacêuticas que contém um derivado de insulina humana segundo a presente invenção podem ser administradas por via parenteral a aqueles pacientes que precisem desse tratamento. A administração por via parenteral se pode levar a cabo por meio de uma injeção subcutânea, intramuscular ou intravenosa com ajuda de uma seringa, opcionalmente uma pluma seringa. Alternativamente, a administração parenteral se pode levar a cabo por meio de uma bomba de infusão. Outra opção é uma composição em forma de pó ou líquido para a administração do derivado de insulina humana em forma de spray nasal.

As composições injectáveis de insulina humana segundo a invenção podem ser preparadas por meio de as técnicas convencionais da indústria farmacêutica que implicam dissolver e misturar os ingredientes de maneira apropriada para obter o produto final desejado.

Deste modo, segundo um dos procedimentos, o derivado de insulina humano é dissolvido numa quantidade de água que é um pouco menor que o volume final da composição a preparar. Agregam-se um agente isotônico, um conservante e um tampão na forma requerida e se ajusta o valor de pH da solução, no caso de ser necessário, usando um ácido, por exemplo, ácido hidrocloreídrico, ou uma base, por exemplo, hidróxido sódico aquoso na quantidade que seja necessária. Finalmente, se ajusta o volume da solução com água para obter a concentração desejada dos ingredientes.

Alguns exemplos de agentes isotônicos são o cloruro sódico, o manitol e o glicerol.

Alguns exemplos de conservantes são o fenol, m-cresol, o p-hidroxibenzoato metílico e o álcool bencílico.

Alguns exemplos de tampões adequados são o acetato sódico e o fosfato sódico.

Pode-se preparar uma composição para a administração por via nasal de um derivado insulínico segundo a presente invenção, por exemplo, no modo em que se descreve na Patente Europeia Nº 272097 (o nome de Novo Nordisk A/S).

As composições de insulina segundo esta invenção podem ser empregadas no tratamento da diabetes. O nível de dose óptima para qualquer paciente dependerá de uma variedade de factores entre os que se incluem a eficácia do derivado de insulina humana específico empregado, a idade, o peso corporal, a actividade física e a dieta do paciente, dependendo da possível combinação com outros medicamentos e da gravidade do caso de diabetes. Recomenda-se que a dosificação diária do derivado de insulina humana segundo esta invenção seja

determinada para cada paciente de forma individual pelos expertos na matéria de modo similar ao das composições de insulina conhecidas.

Naqueles casos onde seja conveniente, o derivado de insulina humano segundo esta invenção podem ser empregados misturados com outros tipos de insulina, por exemplo, insulina humana, insulina porcina ou análogos de insulina com um começo de acção mais rápida. Alguns exemplos deste tipo de análogos de insulina aparecem descritos, por exemplo, nas solicitudes de Patente Europeia com os seguintes N° de publicação: EP 214826 (Novo Nordisk A/S), EP 375437 (Novo Nordisk A/S) e EP 383472 (Eli Lilly & Co.).

A presente invenção também é ilustrada por meio de os seguintes exemplos que, mas, não devem ser considerados como limitadores do objectivo da invenção. As características detalhadas na descrição precedente e nos exemplos seguintes podem constituir, tanto por separado como em combinação, o material para levar a cabo a invenção de formas diversas.

Exemplos

Plásmidos e material de ADN

Todos os plásmidos de expressão são do tipo cPOT. Estes tipo de plásmidos aparecem descritos em solicitude de patente EP N° 171 142 e se caracterizam pelo facto de que contém o gene de isomerase de fosfato de triosa Schizosacaromices pombe (POT) para seleccionar e estabilizar o plásmido. Um plásmido que contém o gene POT se encontra disponível a partir de uma cepa depositada de E. coli (ATCC 39685). Os plásmidos contém, além disso, o promotor e o terminador de isomerase de fosfato de triosa S. cerevisiae (P_{TPI} e T_{TPI}). Ambos são idênticos a pMT742 (Egel-Mitani, M. et al., Gene 73 (1988) 113-120) (ver Figura 1) salvo pela zona definida pelos movimentos de restrição ECoRI-XbaI que restringem a zona de codificação a sinais/guia/produto.

Sintetizaram-se os fragmentos de ADN sintéticos em um sintetizador de ADN automático (Applied Biosystems, modelo 380A) utilizando reactivos de fosforamiesse e reactivos química e comercialmente disponíveis (Beaucage, S.L. e Caruthers, M.H., Tetrahedron Letters 22 (1981) 1859-1869).

O resto de métodos e materiais empregados são pontos comuns no estado da técnica (ver, por exemplo, Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory press, Nova York, 1989).

Analítica

Obtiveram-se as massas moleculares das insulinas preparadas por meio de é (espectroscopia de massas), bem por meio de EMDP (espectrometria de massas por desabsorção de plasma) usando um instrumento Bio-Ion 20 (Bio-Ion Nordic AB, Uppsala, Suecia) ou por meio de EMES (espectrometria de massas por meio de electrospray) usando um analisador de massas biomolecular API III (Perkin-Elmer Sciex Instruments, Thornhill, Canadá).

EXEMPLO 1

Síntese do precursor de insulina humana Ala^{A21} Asp^{B3} a partir da cepa de levedura yEA002 usando a sinal/guia LaC212spx3.

Sintetizaram-se os seguintes oligonucleótidos:

#98 5'-TGGCTAAGAGATTCGTTGACCAACACTTGTGCGGTTCTCA
CTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGTGAA
AGAGGTTTCTTCTACACTCCAAAGTCTGACGACGCT-3' (AspB3)
(ID de SEC N°:3)

#128

CTGCGGGCTGCGTCTAAGCACAGTAGTTTTCCAATTGGTACAA

5'-

AGAACAGATAGAAGTACAACATTGTTCAACGATACCCTTAGCGTC
GTCAGACTTTGG-3' (AlaA21) (ID de SEC N°:4)
#126 5'-GTCGCCATGGCTAAGAGATTCGTTG-3' (AspB3)
(ID de SEC N°:5)
#16 5'-CTGCTCTAGAGCCTGCGGGCTGCGTCT-3' (ID de SEC N°:6)

A seguinte reacção em cadeia de polimerase (RCP) se realizou por meio de uma equipe de reactivos para RPC com genes Amp (Perkin Elmer, 761 Main Avewalk, CT 06859, EEUU) segundo as instruções do fabricante. Em qualquer caso, se cobriu a mistura PCR com 100 µl de azeite mineral (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU).

2,5 µl de oligonucleótido #98 (2,5 pmol)

2,5 µl de oligonucleótido #128 (2,5 pmol)

10 µl de 10X tampão PCR

16 µl de mistura dNTP

0,5 µl de enzima Taq

58,5 µl de água

Realizou-se um ciclo: 94°C durante 45 seg., 49°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos.

Posteriormente, se lhe agregou 5 µl de oligonucleótidos #16 e #126 e se realizaram 15 ciclos: 94°C durante 45 seg., 45°C durante 1 minuto, 72°C durante 1,5 minutos. Carregou-se a mistura de PCR em um 2,5% de gel de agarose e se submeteu a uma eletroforese usando técnicas standards (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989). Extraiu-se o fragmento de ADN resultante do gel de agarose e se isolou usando o Gene Clean Kit (Bio 101 Inc., Afastado de Correios 2284, A Jolla, CA 92038, EEUU) segundo as instruções do fabricante. O fragmento de ADN com PCR purificado

foi dissolvido em 10 µl de água e um tampão de endonuclease de restrição e cortado com as endonuclease de restrição NcoI e Xba I segundo as técnicas standards, situado sobre um 2,5% do gel de agarose e purificado com um Gene Clean Kit como o descrito.

O plásmido pAK188 consiste numa sequência de ADN de 412 bp composta de um fragmento EcoRI/NcoI que codifica o gene LaC212spx3 da sinal/guia da levedura sintética (descrito no exemplo 3 da WO 89/02463) contínuo de um fragmento sintético NcoI/XbaI que codifica o precursor de insulina MI5, que apresenta uma ponte SerAspAspAlaLys que liga os resíduos aminoácidos B29 e A1 (ver ir da SEC Não 14, 15 e 16), inseridos no fragmento EcoRI/XbaI do vector (fagémido) pBLUESCRIPT IIsk(+/-) (Stratagene, EEUU). Na figura 1 se mostra o plásmido pAK188.

Também se cortou o plásmido pAK188 com as endonucleases de restrição NcoI e XbaI e se isolou o fragmento do vector de 3139 bp. Ligaram-se os dois fragmentos de ADN por meio de uma ligase de ADN T4 sob condições standards (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989). A mistura de ligação foi transformada numa cepa de E. coli (R-, M+) competente em seguida para selecção para conseguir uma resistência a ampicilina. Isolaram-se os plásmidos das colónias de E. coli resultantes usando uma técnica standard de ADN miniprep (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989), comprovada por meio de as endonucleases de restrição apropriadas, ou seja, EcoRI, Xba I, NcoI e HpaI. O plásmido seleccionado foi mostrado por meio de análise da sequência do ADN (Sequenase, U.S. Biochemical Corp.) que continha a sequência correcta do precursor de insulina humana Ala^{A21}, Asp^{B3} e do pEA5.3 mencionado.

O plásmido pKFN1627 é um vector transportador de E. coli-S. cerevisiae, idêntico ao plásmido pKFN1003 descrito na patente EP N° 375718, salvo no caso de uma sequência de ADN curta na parte superior do localizador único do XbaI. No pKFN1003, esta sequência é um fragmento de 178 bp que codifica um gene de aprotinina sintético fusionado dentro da mesma marco que a sequência da sinal/guia alfa 1 do factor de acoplamento da levedura. No pKFN1627, a sequência de 184 bp correspondente codifica o precursor de insulina MI5 (Glu^{B1}, Glu^{B28}) (ou seja, B(1-29, Glu^{B1}, Glu^{B28})-SerAspAspAlaLys-A(1-21) fusionado dentro do mesmo marco que a sequência alfa 1 do factor de acoplamento (ver ir da SEC Não 17, 18 e 19). Na figura 1 se mostra o vector pKFN1627.

Cortou-se o pEA5.3 com as endonucleases de restrição EcoRI e XbaI e se isolou o fragmento de ADN proveniente de 412 bp. Cortou-se o vector de expressão da levedura pKFN1627 com as endonucleases de restrição NcoI e XbaI e com NcoI e EcoRI, se isolou o fragmento de ADN de 9273 bp da primeira digestão e se isolou o fragmento de ADN de 1644 bp da segunda digestão. A continuação, se ligou o fragmento 412 bp EcoRI/XbaI aos outros dois fragmentos, ou seja, ao fragmento 9273 bp NcoI I/XbaI e ao fragmento 1644 bp NcoI/EcoRI, por meio de técnicas standards.

A mistura de ligadura foi transformada em E. coli no modo que se há descrito anteriormente. Isolou-se o plásmido de E. coli conseguido por meio de técnicas standards e se comprovou com endonucleases de restrição apropriadas, ou seja, com EcoRI, XbaI, NcoI, HpaI. Graças a uma análise da sequência de ADN (usando o kit de sequenases no modo descrito pelo fabricante, U.S. Biochemical) se demonstrou que o plásmido seleccionado continha a sequência correcta para o ADN do precursor de insulina humana AlaA21 AspB3 e que

estava inserido depois o ADN que codifica o ADN do sinal/guia LaC212spx3. Ao plásmido se lhe deu o nome de pEA5.3.2 e aparece mostrado na figura 1.

A sequência de ADN que codifica a sinal/guia/complexo do precursor de insulina humana Ala^{A21} Asp^{B3}, LaC212spx3, e sua sequência de aminoácidos derivada aparecem na ID de SEC Nº 20, 21 e 22. O plásmido pEA5.3.2 foi transformado na cepa S. cerevisiae MT663 no modo descrito na solicitude de Patente Europeia com Nº de publicação 214826 e a cepa produzida se lhe deu o nome de yEA002.

EXEMPLO 2

Síntese do precursor de insulina humana Ala^{A21} Thr^{B3} da cepa da levedura yEA005 usando a sinal/guia LaC212spx3.

Sintetizaram-se os seguintes oligonucleótidos:

#101 5'-

TGGCTAAGAGATTCGTTACTCAACACTTGTGCGGTTCTCACTT
GGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGTGAAAGAGGTTTC
TTCTACA

CTCCAAAGTCTGACGACGCT-3' (ThrB3) (ID de SEC Nº:7)

#128 5'-

CTGCGGGCTGCGTCTAAGCACAGTAGTTTTCCAATTGGTACAAA
GAACAGATAGAAGTACAACATTGTTCAACGATACCCTTA
GCGTCG

TCAGACTTTGG-3' (AlaA21) (ID de SEC Nº:4)

#15 5'-GTCGCCATGGCTAAGAGATTCGTT $\bar{3}$ ' (ThrB3) (ID de
SEC Nº:8)

#16 5'-CTGCTCTAGAGCCTGCGGGCTGCGTCT-3' (ID de SEC
Nº:6)

Construiu-se o precursor de insulina humana Ala^{A21} Thr^{B3} que codifica o ADN da mesma maneira especificada para o precursor de insulina humana Ala^{A21} Asp^{B3} que codifica o ADN no exemplo 1. A sequência de ADN que codifica o complexo do precursor de insulina humana LaC212spx3 sinal/guia/ Ala^{A21} Thr^{B3} e sua sequência de aminoácidos derivada apresentam as ID de SEC Nº 23, 24 e 25. Demonstrou-se que o plásmido pEA8.1.1 continha a sequência desejada, transformada na cepa Seg. cerevisiae MT663 como se descreve no exemplo 1 e a cepa formada se lhe destinou o nome de yEA005

EXEMPLO 3

Síntese do precursor de insulina humana Gly^{A21} Asp^{B3} a partir da cepa de levedura yEA007 usando o sinal/guia LaC212spx3.

Sintetizaram-se os seguintes oligonucleótidos:

#98 5'-

TGGCTAAGAGATTCGTTGACCAACACTTGTGCGGTTCTCACTTG
GTTGAAGCTTTGTACTTGTTTGTGGTGAAAGAGGTTTCT
TCT
ACACTCCAAAGTCTGACGACGCT-3' (AspB3) (ID de SEC
Nº:3)

#127 5'-

CTGCGGGCTGCGTCTAACCACAGTAGTTTTCCAATTGGTACAA
AGAACAGATAGAAGTACAACATTGTTCAACGATACCCT
TAGCGTCGTCAGACTTTGG-3' (GlyA21) (ID de SEC Nº:9)

#126 5'-GTCGCCATGGCTAAGAGATTCGTTG-3' (AspB3) (ID de
SEC Nº:5)

#16 5'-CTGCTCTAGAGCCTGCGGGCTGCGTCT-3' (ID de SEC
Nº:6)

Construiu-se o precursor de insulina humana Gly^{A21} Asp^{B3} que codifica o ADN da maneira especificada para o precursor de insulina humana Ala^{A21} Asp^{B3} que codifica o ADN no exemplo 1. A sequência de ADN que codifica o complexo do precursor de insulina humana LaC212spx3 sinal/guia/Gly^{A21} Asp^{B3} e sua sequência de aminoácidos derivada apresentam as ID de SEC Nº 26, 27 e 28. Demonstrou-se que o plásmido pEA1.5.6 continha a sequência desejada, transformado na cepa S. cerevisiae MT663 como se descreve no exemplo 1 e a cepa formada se lhe destinou o nome de yEA007.

EXEMPLO 4

Síntese do precursor de insulina humana Gly^{A21} Thr^{B3} a partir da cepa de levedura yEA006 usando a sinal/guia LaC212spx3.

Sintetizaram-se os seguintes oligonucleótidos:

#101 5'-

TGGCTAAGAGATTCGTTACTCAACACTTGTGCGGTTCTCACTT
GGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGTGAAAGAGGTTTC
TTCTACA

CTCCAAAGTCTGACGACGCT-3' (ThrB3) (ID de SEC Nº:7)

#127 5'-

CTGCGGGCTGCGTCTAACCACAGTAGTTTTCCAATTGGTACAA
AGAACAGATAGAAGTACAACATTGTTCAACGATACCCT
TAGCGTCGTCAGACTTTGG-3' (GlyA21) (ID de SEC Nº:9)

#15 5'-GTCGCCATGGCTAAGAGATTCGTT□3' (ThrB3) (ID de SEC Nº:8)

#16 5'-CTGCTCTAGAGCCTGCGGGCTGCGTCT-3' (ID de SEC Nº:6)

Construiu-se o precursor de insulina humana Gly^{A21} Thr^{B3} que codifica o ADN da maneira especificada para o precursor de insulina humana Ala^{A21} Asp^{B3} que

codifica o ADN no exemplo 1. A sequência de ADN que codifica o complexo do precursor de insulina humana LaC212spx3 sinal/guia/ Gly^{A21} Thr^{B3} e sua sequência de aminoácidos derivada apresentam as ID de SEC N° 29, 30 e 31. Demonstrou-se que o plásmido pEA4.4.11 continha a sequência de ADN desejada, transformada na cepa *S. cerevisiae* MT663 como se descreve no exemplo 1 e a cepa formada se lhe destinou o nome de yEA006.

EXEMPLO 5

Síntese do precursor de insulina humana de cadeia única Arg^{B-1} Arg^{B31} que apresenta um extensão N-terminal (GluGluAlaGluAlaGluAlaArg) da cepa de levedura yEA113 por meio de a guia do factor alfa.

A)

Sintetizaram-se os seguintes oligonucleótidos:

##220 5'-ACGTACGTTCTAGAGCCTGCGGGCTGC-3' (ID de SEC N°:10)

#263 5'-

CACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGTGAAAGAGGTTTC
TTCTACACTCCAAAGACTAGAGGTATCGTTGA $\bar{3}$ ' (ID de SEC N°:11)

#307 5'-

GCTAACGTCGCCATGGCTAAGAGAGAAGAAGCTGAAGCTGAAGCT
AGATTCGTTAACCAACAC-3' (ID de SEC N°:12)

A seguinte reacção em cadeia da polimerase (RCP) foi levada a cabo usando o equipo de reactivos para RPC com genes Amp (Perkin Elmer, 761 Main Avewalk, CT 06859, EEUU) segundo as instruções do fabricante. Em qualquer caso, se cobriu a mistura RPC com 100 ml de azeite mineral (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EEUU). O plásmido pAK220 (que é idêntico a pAK188) está composto de uma sequência de ADN de 412 bp que codifica a sinal/guia

LaC212spx3 da levedura sintética (descrita no exemplo 3 da WO 89/02463) contínuo do precursor de insulina MI5 (ver as ID de SEC N° 14, 15 e 16) inserido no vector (fagémido) pBLUESCRIPT IIsk(+/-) (Stratagene, EEUU).

5 µl de oligonucleótido #220 (100 pmol)

5 µl de oligonucleótido #263 (100 pmol)

10 µl de 10X tampão RPC

16 µl de mistura dNTP

0,5 µl de enzima Taq

0,5 µl de plásmido pAK220 (idêntico ao pAK188) como patrono (0,2 mg de ADN)

63 µl de água

Criou-se um total de 16 ciclos, cada um de esses ciclos compreendendo 1 minuto a 95°C; 1 minuto a 40°C; e 2 minutos a 72°C. A continuação se carregou a mistura RPC em um 2% de gel de agarose e se submeteu a eletroforese por meio de as técnicas standards. Extraiu-se o fragmento de ADN produzido do gel de agarose e se isolou usando o Gene Clean Kit (Bio 101 Inc., Afastado de Correios 2284, La Jolla, CA 92038, EEUU) segundo as instruções do fabricante. Dissolveu-se o fragmento de ADN purificado por meio de RPC em 10 ml de água e tampão de endonuclease de restrição e se cortou com as endonucleases de restrição HindIII e XbaI segundo as técnicas standards. Purificou-se o fragmento de ADN HindIII/XbaI com o Gene Clean Kit no modo descrito.

O plásmido pAK406 se compõe de uma sequência de ADN de 520 bp que compreende um fragmento EcoRI/HindIII derivado de pMT636 (descrito na WO 90/10075) que codifica o sinal do factor alfa da levedura e parte do precursor de insulina ligado ao fragmento HindIII/XbaI do pAK188 que

codifica o resto dos precursores de insulina MI5 (ver as ID de SEC Nº 32, 33 e 34) inseridos no vector cPOT. Na figura 2 se mostra o vector pAK406.

O plásmido pAK233 se compõe de uma sequência de ADN de 412 bp que codifica a sinal/guia LaC212spx3 da levedura sintética (descrita no exemplo 3 da WO 89/02463) em seguida do gene do precursor de insulina B(1-29)-GluLysArg-A(1-21) (A21-Gly) (ver as ID de SEC Nº 35, 36 e 37) inseridos no vector cPOT. Na figura 2 se mostra o plásmido pAK233.

Cortou-se o plásmido pAK233 por meio de as endonucleases de restrição NcoI e XbaI e se isolou o fragmento do vector de 9273 bp. Cortou-se o plásmido pAK406 por meio de as endonucleases de restrição NcoI e HindIII e se isolou o fragmento do vector de 2012 bp. Ligaram-se ambos fragmentos de ADN junto com o fragmento de RPC HindIII/XbaI usando a ligase de ADN T4 e umas condições standards. A continuação se transformou a mistura de ligação numa cepa de E. coli competente (R-, M+), depois o que se seleccionou a resistência a ampicilina. Isolaram-se os plásmidos das colónias de E. coli produzido graças a uma técnica mini-preparação de ADN standard e se comprovou com as endonucleases de restrição apropriadas, ou seja, com EcoRI, XbaI, NcoI, HindIII. Mostrou-se que o plásmido seleccionado por meio da análise da sequência do ADN continha a sequência correcta para o ADN do precursor de insulina humana de cadeia única Arg^{B31} e que estava inserido depois o ADN que codifica o ADN do factor alfa de *S. cerevisiae*. Ao plásmido se lhe destinou o nome de pEA108 e se mostra na figura 2. A sequência de ADN que codifica o complexo do precursor de insulina humana de cadeia único da guia/Arg^{B31} do factor alfa e sua sequência de aminoácidos derivada apresentam as ID de SEC Nº 38, 39 e 40. O plásmido pEA108 se transformou na cepa S. cerevisiae MT663 no modo descrito no exemplo 1 e a cepa conseguida se lhe destinou o nome de yEA108.

B)

A seguinte reacção em cadeia da polimerase (RCP) se realizou por meio de uma equipe reactivo para RCP com genes Amp (Perkin Elmer, 761 Main Ave, CT 06859, EEUU) segundo as instruções do fabricante. Em qualquer caso, se cobriu a mistura RCP com 100 ml de azeite mineral (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU)

5 µl de oligonucleótido #220 (100 pmol)

5 µl de oligonucleótido #307 (100 pmol)

10 µl de 10X de tampão RCP

16 µl de mistura dNTP

0,5 µl de enzima Taq

0,2 µl de plásmido pEA108 como patrono (0,1 µg de ADN)

63 µl de água

Realizou-se um total de 16 ciclos, cada um de esses ciclos compreendendo 1 minuto a 95°C; 1 minuto a 40°C; e 2 minutos a 72°C. A continuação se carregou a mistura RCP em um 2% de gel de agarose e se submeteu a eletroforese por meio de as técnicas standards. Extraí-se o fragmento de ADN resultante do gel de agarose e se isolou utilizando um Gene Clean Kit (Bio 101 Inc., Afastado de Correios 2284, La Jolla, CA 92038, EEUU) segundo as instruções do fabricante. Dissolveu-se o fragmento de ADN purificado com RCP em 10 ml de água e tampão de endonuclease de restrição e se cortou com as endonucleases de restrição NcoI e XbaI segundo as técnicas standards. Purificou-se o fragmento de ADN NcoI/XbaI por meio de o Gene Clean Kit no modo descrito.

O plásmido pAK401 se compõe de uma sequência de ADN de 523 bp composta por um fragmento EcoRI/NcoI derivado de pMT636 (descrito na WO 90/10075) (construído ao introduzir um sítio NcoI no extremo 3 da guia alfa por meio de

mutagêneses dirigida) que codifica a guia do factor alfa em seguida de um fragmento NcoI/XbaI de pAK188 que codifica o precursor de insulina MI5 (ver as ID de SEC N° 41, 42 e 43) inscrito no vector (fagómido) pBLUESCRIPT IIsk(+/-) (Stratagene, EEUU). Na figura 3 se mostra o plásmido pAK401.

Se cortou o plásmido pAK401 com as endonucleases de restrição NcoI e XbaI, se isolou o fragmento do vector de 3254 bp e se ligou junto com o fragmento de RCP NcoI/XbaI. A continuação se transformou a mistura de ligação numa cepa de E. coli competente, se isola os plásmidos das colónias de E. coli resultantes por meio de uma técnica mini-preparada de ADN standard e se comprovaram por meio de as endonucleases de restrição apropriadas, ou seja, por meio de EcoRI, XbaI, NcoI. O plásmido seleccionado, ao que se lhe destinou o nome p113A (mostrado na figura 3), se cortou com EcoRI e XbaI e se isolou o fragmento de 535 bp.

Cortou-se o plásmido pAK233 com as endonucleases de restrição NcoI e XbaI e com EcoRI/NcoI e se isolaram os fragmentos de 9273 e 1644 bp. Ligaram-se estes dois fragmentos de ADN junto com o fragmento EcoRI/XbaI de p113A com ligase de ADN T4 e com as condições standards. A continuação, a mistura de ligação se transformou numa cepa de E. coli competente (R-, M+), depois o que se seleccionou a resistência a ampicilina. Isolaram-se os plásmidos das colónias de E. coli resultantes usando uma técnica mini-preparada de ADN standard e se comprovou com endonucleases de restrição apropriadas, ou seja, com EcoRI, XbaI, NcoI, HindIII. Demonstrou-se que o plásmido seleccionado por meio da análise de sequência do ADN continha a sequência correcta para o ADN do precursor de insulina humana de cadeia única Arg^{B31} com o extensão N-terminal GluGluAlaGluAlaGluAlaArg e que estava inserido depois o ADN que codifica o ADN do factor alfa da S. cerevisiae. Ao plásmido se lhe destinou o nome de pEA113 e se mostra na figura 3. A sequência de ADN que codifica o

precursor de insulina humana de cadeia única da guia/ArgB-1 ArgB31 do factor alfa que apresenta um extensão N-terminal (GluGluAlaGluAlaGluAlaArg) e sua sequência de aminoácidos derivada apresentam as ID de SEC Nº 44, 45 e 46. O plásmido pEA113 se transformou na cepa S. cerevisiae MT663 como se descreve no exemplo 1 e a cepa formada se lhe destinou o nome yEA113.

EXEMPLO 6

Síntese de precursor de insulina humana de cadeia única Arg^{B-1} Arg^{B31} que apresenta um extensão N-terminal (GluGluAlaGluAlaGluAlaGluArg) a partir da cepa de levedura yEA136 usando a guia do factor alfa.

Sintetizou-se o seguinte oligonucleótido:

#389 5'-
GCTAACGTCGCCATGGCTAAGAGAGAAGAAGCTGAAGCGAAG
CTGAAAGATTCGTTAACCAACAC-3' (ID de SEC Nº:13)

A seguinte RCP se realizou por meio de um equipe de reactivos para RCP com genes Amp.

5 µl de oligonucleótido #220 (100 pmol)

5 µl de oligonucleótido #389 (100 pmol)

10 µl de 10X tampão RCP

16 µl de mistura dNTP

0,5 µl de enzima Taq

2 µl do plásmido pEA113 como patrono (0,5 ug de ADN)

63 µl de água

Realizou-se um total de 12 ciclos, cada um de esses ciclos estando composto de 1 minuto a 95°C; 1 minuto a 37°C; e 2 minutos a 72°C.

O ADN que codifica o precursor de insulina humana de cadeia única da guia/Arg^{B-1} Arg^{B31} do factor alfa que apresenta um extensão N-terminal

(GluGluAlaGluAlaGluAlaGluArg) se construiu da maneira descrita para o ADN que codifica o precursor de insulina humana de cadeia único da guia/Arg^{B-1} Arg^{B31} do factor alfa que apresenta um extensão N-terminal (GluGluAlaGluAlaGluAlaGluArg) do exemplo 5. Ao plásmido se lhe destinou o nome de pEA136. A sequência de ADN que codifica o precursor de insulina humana de cadeia única da guia/ Arg^{B-1} Arg^{B31} do factor alfa que apresenta um extensão N-terminal (GluGluAlaGluAlaGluAlaGluArg) e sua sequência de aminoácidos derivada apresenta as ID de SEC N° 47, 48 e 49. O plásmido pEA136 se transformou na cepa S. cerevisiae MT663 como se descreve no exemplo 1 e a cepa resultante se lhe destinou o nome yEA136.

EXEMPLO 7

Síntese da insulina humana de (A1,B1)-diBoc.

Dissolveram-se 5 g de insulina humana sem zinco em 41,3 ml de DMSO. A solução se lhe agregaram 3,090 ml de ácido acético. Fez-se que a reacção alcançará a temperatura ambiente e se começo agregando 565 mg de pirocarbonato de di-terc-butilodisuelto em 5,650 ml de DMSO. Deixou-se que a reacção continuara durante 5 horas e média e, a continuação, se deteve agregando 250 ml de etanolamina. Precipitou-se o produto agregando 1500 ml de acetona. Isolou-se o precipitado por centrifugado e se deixou que se secasse ao vazio. Obteve-se um rendimento de 6,85 g de material.

Purificou-se a insulina (A1,B1)-diBoc por meio de uma CLARC de fase invertida como segue: Se dissolveu o produto bruto em 100 ml de etano em água ao 25%, se ajustou o pH até 3.0 com HCl e se aplicou a uma coluna (5 cm de diâmetro, 30 cm de alto) recheada com partículas de sílica substituído por octadecildimetilsililo (tamanho meio de partícula de 15 µm, tamanho de poro de 100 Å) e se equilibrou com um tampão de eluição. A eluição se realizou usando misturas de etano e 1 mM de HCl aquoso, 0,3 M de KCl a uma velocidade de 2

l/h. Eluiu-se a insulina incrementando o contido em etano do 30% ao 45%. Diluiu-se a fracção adequada em um 20% de etano e se precipitou com um pH de 4.8. Isolou-se o material precipitado centrifugando-o e se deixou que se secara ao vazio. Deste modo, se obteve 1,701 g de insulina humana (A1,B1)-diBoc com um pureza de um 94,5%.

EXEMPLO 8

Síntese da (insulina humana de N^{B29}-benzoilo)₆. 3Zn²⁺.

Dissolveram-se 400 mg de insulina humana (A1,B1)-diBoc em 2 ml de DMSO. A solução se lhe agregaram 748 ml de uma mistura de N-metilmorfolina e DMSO (1:9, v/v). A reacção se realizou a 15°C e se começou agregando 14,6 mg de éster de n-hidroxisuccinimida do ácido benzóico dissolvido em 132 ml de DMF. Deteve-se a reacção depois 2 horas agregando 100 ml de acetona. Isolou-se o material precipitado centrifugando-o e se deixou que se secasse ao vazio. Se recogieron 343 mg de material.

Suprimiram-se os grupos de protecção Boc agregando 4 ml de TFA. Incubou-se o material dissolvido durante 30 minutos e, a continuação, se precipitou agregando 50 ml de acetona. Isolou-se o precipitado centrifugando-o e se deixou que se secasse ao vazio.

Purificou-se a insulina humana de NeB29-benzoilo por meio de uma CLARC de fase invertida como se descreve no exemplo 7. Obteve-se um rendimento de 230 mg. O recristalização de etano aquoso ao 15% contendo 6 mM de Zn²⁺ e 50 mM de citrato com um pH de 5.5 deu como resultado unos cristais derivados do composto do titulo que foram isolados centrifugando-o e se deixou que se secaram ao vazio. O rendimento foi de 190 mg.

Massa molecular, achada por meio de EM (espectrometria de massas): 5911,
teoria: 5911.

EXEMPLO 9

Síntese de (insulina humana de de N^{B29}-litocoloil)6, 3Zn²⁺.

Dissolveram-se 400 mg de insulina humana (A1,B1)-diBoc em 2 ml de DMSO. A solução se lhe agregou 748 ml de uma mistura de N-metilmorfolina e DMSO (1:9, v/v). A reacção se realizou a 15°C e se começou agregando 31,94 mg de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido litocólico dissolvido em 300 µl de DMF. Deteve-se a reacção depois 2 horas agregando 100 ml de acetona. Isolou-se o material precipitado centrifugando-o e se deixou que se secasse ao vazio. Obtiveram-se 331 mg de material.

Suprimiram-se os grupos de protecção Boc agregando 4 ml de TFA. Incubou-se o material dissolvido durante 30 minutos e, a continuação, se precipitou agregando 50 ml de acetona. Isolou-se o precipitado centrifugando-o e se deixou que se secasse ao vazio. O rendimento foi de 376 mg.

Purificou-se a insulina de B29-litocoloil por meio de uma CLARC de fase invertida como se descreve no exemplo 7. Obteve-se um rendimento final de 67 mg com uma pureza do 94%. O recristalização do etano aquoso ao 15% contendo 6 mM de Zn²⁺ + e 50 mM de citrato com um pH de 5.5 deu como resultado unos cristais derivados do composto do titulo que se isolaram centrifugando-o e se deixou que se secaram ao vazio. O rendimento foi de 49 mg.

Massa molecular, achada por meio de é (espectrometria de massas): 6160,
teoria: 6166.

EXEMPLO 10

Síntese de (insulina humana de N^{B29}-decanoil)6, 3Zn²⁺

Dissolveram-se 400 mg de insulina humana (A1,B1)-diBoc em 2 ml de DMSO. A solução se lhe acrescentou 748 µl de uma mistura de N-metilmorfolina e DMSO (1:9, v/v). A reacção se realizou a 15°C e se começou agregando 18,0 mg de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido decanóico dissolvido em 132 µl de DMF. Deteve-se a reacção uns 60 minutos e se precipitou o produto agregando 100 ml de acetona. Isolou-se o material precipitado centrifugando-o e se deixou que se secasse ao vazio. Recolheram-se 420 mg de produto intermédio.

Suprimiram-se os grupos de protecção Boc agregando 4 ml de TFA. Incubou-se o material dissolvido durante 30 minutos e, a continuação, se precipitou o produto agregando 50 ml de acetona. Isolou-se o precipitado centrifugando-o e se deixou que se secara ao vazio. O rendimento de produto bruto foi de 420 mg.

O produto bruto foi purificado por meio de uma CLARC de fase invertida como se descreve no exemplo 7. Obteve-se um rendimento final de 254 mg do produto do título. A pureza foi de 96,1%. O recristalização de etano aquoso ao 15% contendo 6 mM de Zn²⁺ e 50 mM de citrato com um pH de 5.5 deu como resultado unos cristais derivados do composto do título que se isolaram centrifugando-o e se deixou que se secaram ao vazio. O rendimento foi de 217 mg.

Massa molecular, achada por meio de EM (espectrometria de massas): 5962, teoria: 5962.

EXEMPLO 11

Síntese da insulina humana des(B30).

A síntese da insulina humana des(B30) se efectuou como descreve Markussen (Methods in diabetes research, Vol. I, Laboratory methods, parte B, 404-410. Ed: J. Larner e S. Phol, John Wilcy & Sons, 1984). Dissolveram-se 5 g de insulina humana em 500 ml de água enquanto se manteve o valor do pH da solução a 2.6 agregando 0,5 M de ácido sulfúrico. Posteriormente, se colocou sal na insulina agregando 100 g de sulfato amônico e se isolou o precipitado centrifugando-o. Dissolveu-se o granulado em 800 ml de carbonato hidrogenado com 0,1 M de amônio e se ajustou o valor de pH da solução a 8.4 com 1 M de amônio.

Suspenderam-se 50 mg de carboxipeptidase bovina a em 25 ml de água e se isolou centrifugando-o. Se suspenderam os cristais em 25 ml de água e se lhe agregou 1 M de amônio até obter uma solução clara com um pH definitivo de 10. Agregou-se a solução de carboxipeptidase a solução de insulina e se deixou que a reacção continuasse durante 24 horas. Agregam-se umas gotas de tolueno para que actuaram como conservante durante a reacção.

Depois 24 horas, a insulina humana des(B30) se cristalizou agregando sucessivamente 80 g de cloreto sódico enquanto se removia a solução. A continuação se ajustou o valor de pH a 8.3 e se deixou que a cristalização continuasse durante 20 horas removendo-a suavemente. Isolaram-se os cristais em um filtro de 1,2 μ m, se lavaram com 250 ml de 2-propanol gelado e, finalmente, se deixou que se secasse ao vazio.

EXEMPLO 12

Síntese da insulina humana (A1,B1)-diBoc des(B30).

Sintetizou-se o composto do título por meio de um método similar ao descrito no exemplo 7, usando insulina porcina des(B30) como material de partida. Precipitou-se o produto bruto com acetona e se deixou que se secasse ao vazio.

Purificou-se a insulina humana (A1,B1)-diBoc des(B30) com uma CLARC de fase invertida como se descreve no exemplo 7.

EXEMPLO 13

Síntese da insulina humana NeB29-decanoil des(B30).

Se empregaram 400 mg de insulina humana (A1,B1)-diBoc des(B30) como material de partida para sintetizar a insulina humana N^{B29}-decanoil des(B30), seguindo o procedimento descrito no exemplo 10. Precipitou-se o produto bruto com acetona, se deixou que se secasse ao vazio e se desprotegeu usando TFA. Precipitou-se o produto resultante com acetona e se deixou que se secasse ao vazio. A continuação, se purificou a insulina humana N^{B29}-decanoil des(B30) com uma CLARC de fase invertida como se descreve no exemplo 10.

Massa molecular, achada por meio de EM (espectrometria de massas): 5856, teoria: 5861.

EXEMPLO 14

Síntese da insulina humana N^{B29}-dodecanoil des(B30).

a. Imobilização da protease *A. lyticus*

Misturaram-se 13 mg de protease *A. lyticus*, dissolvido em 5 ml de tampão aquoso com 0,2 M de NaHCO₃, pH 9.4, com 4 ml de gel MiniLeak® Médium estabilizado, que havia sido lavado com o mesmo tampão (MiniLeak é uma sefarose CL 6B activada por meio de divinilsulfonas, obtida de KemEnTec, Copenhague). O gel se manteve em suspensão remexendo ligeiramente durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuação se isolou o gel filtrando-o, lavou-se com água, se suspendeu em 20 ml de tampão com 1 M de etanolamina, pH 9.4, e se manteve em suspensão durante 24 horas a temperatura ambiente.

Finalmente, lavou-se o gel com água em seguida de 0,1 M de ácido acético e se armazenou a 4°C. A actividade enzimática no filtrado foi o 13% da solução inicial, indicando um rendimento na reacção de imobilização de aproximadamente um 87%.

b. Imobilização da tripsina porcina

Imobilizou-se a tripsina porcina com um MiniLeak® Low a um grau de substituição de 1 mg por ml de gel, usando as condições descritas anteriormente para o imobilização da A. lyticus.

c. Síntese da insulina de Glu(GluAla)₃Arg-B(1-29), ThrArg-A(1-21) usando uma protease A. lyticus imobilizada

A 200 mg de precursor de insulina humana de cadeia única Glu(GluAla)₃Arg-B(1-29)-ThrArg-A(1-21), dissolvido em 20 ml de tampão com 0,1 M de NaHCO₃, pH 9.0, se lhe agregou 4 ml do gel contendo a protease A. lyticus imobilizada. Depois de manter o gel em suspensão na mistura de reacção durante 6 horas a temperatura ambiente, se completou a hidrólise, dando como resultado a insulina humana Glu(GluAla)₃-Arg-B(1-29), ThrArg-A(1-21) (a reacção foi em seguida de uma CLARC de fase invertida). Depois a hidrólise, se extraiu o gel por meio de filtração. Ao filtrado se lhe agregou 5 ml de etano e 15 µL de 1 M ZnCl₂ e se ajustou o pH a 5.0 usando HCl. A precipitação do produto se completou deixando repousar durante toda a noite a 4°C mexendo ligeiramente. Isolou-se o produto centrifugando-o. Depois de lavá-la com 1 ml de etano gelado ao 20% e de deixar secar ao vazio, o rendimento foi de 190 mg.

d. Síntese da insulina humana de N^{□A1}, N^{□B1}, N^{□B29}-tridodecanoil Glu(GluAla)₃Arg-B(1-29), Thr-Arg-A(1-21) usando um éster de N-hidroxisuccinimida do ácido dodecanoico

Dissolveram-se 190 mg (30 μ mol) de insulina Glu(GluAla)₃Arg-B(1-29), ThrArg-A(1-21) em 1 ml de DMSO e 1,05 ml de uma solução de 0,572 M de N,N-diisopropiletilamina em DMF. Deixou-se que a solução se esfriar a 15°C e se misturaram 36 mg (120 μ mol) de éster de N-hidroxisuccinimida do ácido dodecanoico dissolvido em 0,6 ml de DMSO. A reacção se completou ao longo de 24 horas. Não se isolou o composto lipofílico do título.

e. Síntese da insulina de N^{B29}-dodecanoil des(B30)

Diluiu-se o produto do passo anterior, d., contido em aproximadamente 2,65 ml de DMSO/DMF/N,N-diisopropiletilamina com 10,6 ml de um tampão com 50 mM de glicina que incluía etano ao 20% e se ajustou o pH a 10 com NaOH. Depois o manter durante 1 hora a temperatura ambiente, se agregou 1 ml de gel MiniLeak, que incluía 1 mg de tripsina imobilizada por ml de gel. Removeu-se ligeiramente a mistura reactiva durante 48 horas a temperatura ambiente. Com o objectivo de isolar o produto desejado, se aplicou a mistura de reacção a uma coluna CLAR de fase invertida (5 cm de diâmetro, 30 cm de alto), recheia com partículas de sílica substituídas com octadecildimetilsililo (tamanho meio de partícula de 15 μ m, tamanho do poro de 100 Å). Para a eluição se utilizaram 20 mM de tampões Tris/HCl, com um pH ajustado a 7.7 e compreendendo uma concentração crescente de etano, do 40% ao 44% (v/v), a um índice de 2000 ml/h. O valor máximo de eluição a aproximadamente um 43-44% de etano continha o composto do título.

Agruparam-se as fracções que continham o valor máximo, se lhes agregou água para reduzir a concentração em etano ao 20% (v/v) e se ajustou o pH a 5.5. Deixou-se a solução durante toda a noite a -20°C, depois o qual se precipitou o produto. Isolou-se o precipitado centrifugando-o a -8°C e se deixou que se secara ao vazio. O rendimento do composto do título foi de 90 mg.

Massa molecular, achada por meio de EM (espectrometria de massas): 5892,
teoria: 5890.

EXEMPLO 15

Síntese da insulina humana de N^{B29} - (N-miristoil- $\square$ -glutamil).

Dissolveram-se 500 mg de insulina humana (A1,B1)-diBoc em 2,5 ml de DMSO e se agregaram 428 ml de diisopropilamina etílica, diluída em 2,5 ml de DMSO/DMF 1/1 (v/v). Ajustou-se a temperatura a 15°C e se agregaram 85 mg de éster de N-hidroxisuccinimida de N-miristoil-Glu(OBut), dissolvido em 2,5 ml de DMSO/DMF 1/1 (v/v). Depois de 30 minutos, se verteu a mistura de reacção em 60 ml de água, se ajustou o pH a 5 e se isolou o precipitado centrifugando-o. Deixou-se que o precipitado se secara ao vazio. Dissolveu-se a mistura de reacção seca em 25 ml de TFA e se manteve a solução durante 30 minutos a temperatura ambiente. Extraiu-se o TFA deixando que se evaporara ao vazio.

Dissolveu-se o resíduo gelatinoso em 60 ml de água e se ajustou o pH a 11.2 usando amónio concentrado. Cristalizou-se o composto do título desta solução ajustando o pH a 8.5 usando 6 N de HCl. Isolou-se o produto centrifugando-o, se lavou uma vez com 10 ml de água e se deixou que se secasse ao vazio. Se obteve um rendimento de 356 mg. Pureza por meio de CLARC do 94%.

Em consequência, o produto deste exemplo é uma insulina humana na que o grupo $\square$ -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte da seguinte estrutura:
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CO}-$.

Massa molecular, achada por meio de EM (espectrometria de massas): 6146,
teoria: 6148.

EXEMPLO 16

Síntese da insulina humana de N^{B29}-undecanoil des(B30).

Se sintetizou o composto do título de forma análoga a insulina humana de N^{B29}-dodecanoil des(B30) no modo descrito no exemplo 14, usando um éster de N-hidroxisuccinimida do ácido undecanoico em lugar de um éster de N-hidroxisuccinimida do ácido dodecanoico.

Massa molecular do produto achada por meio de EM (espectrometria de massas): 5876, teoria: 5876.

EXEMPLO 17

Síntese da insulina humana de N^{B29}-tridecanoil des(B30).

Sintetizou-se o composto do título de forma análoga a insulina humana de N^{B29}-dodecanoil des(B30) no modo descrito no exemplo 14, usando um éster de N-hidroxisuccinimida do ácido tridecanoico em lugar do éster de n-hidroxisuccinimida do ácido dodecanoico.

Massa molecular do produto achada por meio de é (espectrometria de massas): 5899, teoria: 5904.

EXEMPLO 18

Síntese da insulina humana de N^{B29}-miristoil des(B30).

Se sintetizou o composto do título de forma análoga a insulina humana de N^{B29}-dodecanoil des(B30) no modo descrito no exemplo 14, usando um éster de N-hidroxisuccinimida do ácido mirístico em lugar do éster de N-hidroxisuccinimida do ácido dodecanoico.

Massa molecular do produto achada por meio de ϵ (espectrometria de massas): 5923, teoria: 5918.

EXEMPLO 19

Síntese da insulina humana de N^{B29}-palmitoil des(B30).

Sintetizou-se o composto do título de forma análoga a insulina humana de N^{B29}-dodecanoil des(B30) no modo descrito no exemplo 14, usando o éster de N-hidroxisuccinimida do ácido palmítico em lugar do éster de N-hidroxisuccinimida do ácido dodecanoico.

Massa molecular do produto achada por meio de EM (espectrometria de massas): 5944, teoria: 5946.

EXEMPLO 20

Síntese da insulina humana de N^{B29}-suberoil-D-tiroxina.

a. Preparação da N-(succinimidilsuberoil)-D-tiroxina.

Dissolveu-se suberato de disuccinimidil (1,0 g, Pierce) em DMF (50 ml) e se agregou D-tiroxina (2,0 g, Aldrich) mexendo-o a 20°C. A tiroxina se dissolveu lentamente e, depois 20 horas, se extraiu o dissolvente vaporizando-o ao vazio. O resíduo oleaginoso se cristalizou a partir de 2-propanol para dar como resultado 0,6 g de N-(succinimidilsuberoil)-D-tiroxina, p.f. 128-133 °C.

b. Reacção da insulina humana de (A1,B1)-diBoc com N-(succinimidilsuberoil)-D-tiroxina.

Dissolveu-se a insulina humana de (A1,B1)-diBoc (200 mg) em DMF seco (10 ml) agregando trietilamina (20 μ l) a temperatura ambiente. A continuação, se lhe agregou N-(succinimidilsuberoil)-D-tiroxina (80 mg). Controlou-se a reacção por meio de uma CLARC de fase invertida e, quando a reacção esteve

completa ao 90%, se extraiu o dissolvente ao vazio. Ao resíduo de evaporação se lhe agregou ácido trifluoroacético anhidrico (5 ml) e se manteve a solução durante 1 hora a temperatura ambiente. Depois extrair o ácido trifluoroacético ao vazio, se dissolveu o resíduo numa mistura de 1M de ácido acético (5 ml) e acetonitrilo (1,5 ml), purificado por meio de uma CLARC de fase invertida preparatória e se salifica numa coluna PD-10. O rendimento da insulina humana de N^{B29}-D-tiroxina foi de 50 mg.

Em consequência, o produto deste exemplo é uma insulina humana na que o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte da seguinte estrutura: Tirox-CO(CH₂)₆CO-, na que Tirox é tiroxina ligada a metade do ácido octanodioico por meio de uma enlace de amidas com seu grupo A-amino.

Massa molecular do produto achada por meio de EM (espectrometria de massas): 6724, teoria: 6723.

EXEMPLO 21

Síntese da insulina humana do ácido N^{B29}-(2-succinilamido)mirístico.

a. Preparação de éster metílico do ácido α -aminomirístico,HCl.

Ao metanol (5 ml, Merck) a -10°C, se lhe agregou gota a gota cloruro de tionilo (0,2 ml, Aldrich) enquanto se removia energicamente. A continuação, se lhe agregou ácido α -aminomirístico (0,7 g, obtido preparado do ácido α -brómico ao reagir com o amónio). Removeu-se a mistura de reacção à temperatura ambiente durante toda a noite e, a continuação, evaporou-se até secar-se. Empregou-se o produto bruto (0,7 g) directamente no passo b.

b. Preparação do éster metílico do ácido N-succinoil- α -aminomirístico.

Dissolveu-se o éster metílico do ácido α -aminomirístico,HCl (0,7 g) em clorofórmio (25 ml, Merck). Se lhe agregou trietilamina (0,35 ml, Fluka),

contínuo de anhídrido succínico (0,3 g, Fluka). Removeu-se a mistura de reacção à temperatura ambiente durante 2 horas, se concentrou até que se secou e o resíduo se recrystalizou a partir de etilacetato/éter de petróleo (1/1).
Rendimento: 0,8 g.

c. Preparação do éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)- α -aminomirístico.

Dissolveu-se o éster metílico do ácido N-succinoil- α -aminomirístico (0,8 g) em DMF seco (10 ml, Merck, secado em um filtro molecular 4Å). Agregaram-se piridina seca (80 ml, Merck), e di(N-succinimidil)carbonato (1,8 g, Fluka) e se removeu a mistura de reacção durante toda a noite a temperatura ambiente. Purificou-se o resíduo de evaporação por meio de cromatografia instantânea sobre gel de sílica 60 (Merck) e se recrystalizou a partir de 2-propanol/éter de petróleo (1/1). O rendimento do éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)- α -aminomirístico foi de: 0,13 g, p.f. 64-66°C.

d. Reacção da insulina humana de (A1,B1)-diBoc ante o éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)- α -aminomirístico.

A reacção teve lugar no modo descrito no exemplo 20 b., ainda que utilizando éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)- α -aminomirístico (16 mg) em lugar de N-(succinimidilsuberoil)-D-tiroxina.

Depois ter sido extraído o ácido trifluoroacético ao vazio, se tratou o resíduo de evaporação com 0,1M de hidróxido sódico a 0°C para saponificar o éster metílico. Quando se considerou que a saponificação estava completa por meio de uma CLARC de fase invertida, se ajustou o valor de pH na solução a 3 e se

lioofilizou a solução. Depois a depuração por meio de a CLARC de fase invertida preparatória e a dessalinização numa coluna PD-10, o rendimento da insulina humana do ácido N^{B29}-(2-succinilamido)mirístico foi de 39 mg.

Em consequência, o produto deste exemplo é uma insulina humana onde o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte da seguinte estrutura: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{COOH})\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$.

Massa molecular do produto achada por meio de EM (espectrometria de massas): 6130, teoria: 6133.

EXEMPLO 22

Síntese da insulina humana de N^{B29}-octiloxicarbonilo.

A síntese se realizou no modo descrito no exemplo 20 b., ainda que utilizando N-hidroxisuccinimida de n-octiloxicarbonilo (9 mg, obtidos a partir de cloroformato de n-octilo (Aldrich) e de N-hidroxisuccinimida), em lugar de N-(succinimidilsuberoil)-D-tiroxina. O rendimento de insulina humana de N^{B29}-octiloxicarbonilo foi de 86 mg.

Em consequência, o produto deste exemplo é uma insulina humana onde o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte da seguinte estrutura: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OCO}-$.

Massa molecular do produto achada por meio de EM (espectrometria de massas): 5960, teoria: 5964.

EXEMPLO 23

Síntese da insulina humana do ácido N^{B29}-(2-succinilamido)palmítico.

a. Preparação do éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)- $\square$ -aminopalmítico.

Este composto foi preparado como se descreve no exemplo 21 a.-c., utilizando um ácido $\square$ -aminopalmítico em lugar do ácido $\square$ -aminomirístico.

b. Reacção da insulina humana de (A1,B1)-diBoc com o éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)- $\square$ -aminopalmítico.

A reacção se realizou do modo descrito no exemplo 21 d., ainda que utilizando um éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)- $\square$ -aminopalmítico em lugar do éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)- $\square$ -aminopalmítico para dar como resultado uma insulina humana do ácido N^{B29}-(2-succinilamido)palmítico.

Em consequência, o produto deste exemplo é uma insulina humana onde o grupo $\square$ -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte da seguinte estrutura:
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}(\text{COOH})\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-.$

EXEMPLO 24

Síntese da insulina humana do ácido N^{B29}-(2-succinilamidoetiloxi)palmítico.

a. Preparação do éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)-2-aminoetiloxipalmítico.

Este composto foi preparado como se descreve no exemplo 21 a.-c., ainda que utilizando ácido 2-aminoetiloxipalmítico (sintetizado por meio do procedimento geral descrito por R. TenBrink, J. Org. Chem. 52 (1987) 418-422) em lugar de ácido $\square$ -aminomirístico.

b. Reacção da insulina humana de (A1,B1)-diBoc com o éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)-2-aminoetiloxipalmitico.

A reacção foi levada a cabo como se descreve no exemplo 21 d., ainda que utilizando o éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)-2-aminoetiloxipalmitico em lugar do éster metílico do ácido N-(succinimidilsuccinoil)- α -aminomirístico para dar como resultado uma insulina humana do ácido N^{B29}-(2-succinilamidoetiloxi)palmítico.

Em consequência, o produto deste exemplo é uma insulina humana na que o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte da seguinte estrutura:
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}(\text{COOH})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$.

EXEMPLO 25

Síntese da insulina humana de N^{B29}-litocoloil- α -glutamil des(B30).

A síntese foi levada a cabo como se descreve no exemplo 13 usando éster de α -N-hidroxisuccinimida do ácido N-litocoloil-L-glutámico, éster de α -terc-butilo em lugar do éster de N-hidroxisuccinimida do ácido decanóico.

Em consequência, o produto deste exemplo é uma insulina humana des(B30) na que o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte da seguinte estrutura:
litocoloil-NHCH(CH₂CH₂COOH)CO-.

Massa molecular do produto achada por meio de EM (espectrometria de massas): 6194, teoria: 6193.

EXEMPLO 26

Síntese da insulina humana de N^{B29}-3,3',5,5'-tetrayodotiroacetilo.

A síntese foi levada a cabo como se descreve no exemplo 10 usando um éster de N-hidroxisuccinimida do ácido 3,3',5,5'-tetrayodotiroacético, em lugar do éster de N-hidroxisuccinimida do ácido decanóico.

Massa molecular do produto achada por meio de é (espectrometria de massas): 6536, teoria: 6538.

EXEMPLO 27

Síntese da insulina humana de N^{B29}-L-tiroxil.

A síntese foi levada a cabo como se descreve no exemplo 10 usando o éster de N-hidroxisuccinimida da Boc-L-tiroxina, em lugar do éster de N-hidroxisuccinimida do ácido decanóico.

Massa molecular do produto achada por meio de EM (espectrometria de massas): 6572, teoria: 6567.

EXEMPLO 28

Composição farmacêutica que inclui 600 nmol/ml de insulina humana de N^{B29}-decanoil des(B30), 1/3Zn²⁺ em solução.

Dissolveu-se a insulina humana N^{B29}-decanoil des(B30) (1,2 mmol) em água (0,8 ml) e se ajustou o valor de pH a 7.5 agregando 0,2 M de hidróxido sódico. Acrescentou-se 0,01 M de acetato de zinco (60 µl) e uma solução que continha um 0,75% de fenol e um 4% de glicerol (0,8 ml). Ajustou-se o valor de pH da solução a 7.5 usando 0,2 M de hidróxido sódico e se ajustou o volume da solução a 2 ml com água.

Esterilizou-se a solução sendo filtrada e sendo transferida assepticamente a um cartucho ou de modo vial.

EXEMPLO 29

Composição farmacêutica que inclui 600 nmol/ml de insulina humana de N^{B29}-decanoil, 1/2Zn²⁺ em solução.

Dissolveram-se 1,2 mmol do composto do título em água (0,8 ml) e se ajustou o valor de pH a 7.5 agregando 0,2 M de hidróxido sódico. Agregou-se uma solução que continha um 0,75% de fenol e um 1,75% de cloreto sódico (0,8 ml). Ajustou-se o valor de pH da solução a 7.5 usando 0,2 M de hidróxido sódico e se ajustou o volume da solução a 2 ml com água.

Esterilizou-se a solução sendo filtrada e sendo transferida assepticamente a um cartucho ou vial.

EXEMPLO 30

Composição farmacêutica que inclui 600 nmol/ml de insulina humana N^{B29}-litocoloil em solução.

Suspenderam-se 1,2 mmol do composto do título em água (0,8 ml) e se dissolveram para ajustar o valor de pH da solução a 8.5 usando 0,2 M de hidróxido sódico. A continuação, agregou-se lhe a solução 0,8 ml de uma solução concentrada que continha um 0,75% de cresol e um 4% de glicerol em água. Finalmente, se voltou a ajustar o valor de pH a 8.5 e se ajustou o volume da solução a 2 ml com água.

Esterilizou-se a solução sendo filtrada e sendo transferida assepticamente a um cartucho ou vial.

LISTADO DE SEQUENCIAS

(1) Informação geral:

(i) Solicitante:

(A) Nome: Novo Nordisk A/S

(B) Endereço: Novo Allé

- 9
- (C) Cidade: DK-2880 Bagsvaerd
 - (E) País: Dinamarca
 - (G) Telefone: +45 44448888
 - (H) TELEFAX: +45 44490555
 - (I) Telex: 37173
 - (ii) Título da invenção: Insulina ACILADA
 - (iii) Número de sequências: 49
 - (iv) Endereço:
 - (A) Endereço: Novo Nordisk A/S
Corporate Patents
 - (B) Rua: Novo Alle
 - (C) Cidade: DK-2880 Bagsvaerd
 - (E) País: Dinamarca
 - (v) Formato legível por computador:
 - (A) Tipo suporte: Disquete
 - (B) Computador: IBM PC compatível
 - (C) Sistema operativo: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) Software: PatentIn Release #1.0, Versao #1.25
 - (vi) Dados actuais sobre a solicitude:
 - (A) Número de solicitude:
 - (B) Data de depósito:
 - (C) Classificação:
 - (vii) Data de solicitude anterior:
 - (A) Números de solicitude: DK 1044/93 e US 08/190,829
 - (B) Datas de depósito: 09-SEP-1993 e 02-FEB-1994
 - (viii) Informação sobre o AGENTE/REPRESENTANTE:
 - (A) Nome: Jørgensen, Dam et al.
 - (C) Número de REFERÊNCIA/IDENTIFICAÇÃO: 3985.204-WO,DJ
 - (ix) Dados sobre as telecomunicações:
 - (A) Telefone: +45 44448888
 - (B) TELEFAX: +45 44493256
 - (2) Informação para a ID de SEC Nº:1:
 - (i) Características da sequência:
 - (A) Longitude: 21 aminoácidos
 - (B) Tipo: aminoácido
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) Tipo de molécula: proteína
 - (xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:1:

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu

1

5

10

15

Glu Asn Tyr Cys Xaa

20

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:2:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 30 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:2:

Xaa Val Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Xaa

20 25 30

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:3:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 110 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLIGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:3:

TGGCTAAGAG ATTCGTTGAC CAACACTTGT GCGGTTCTCA

CTTGGTTGAA GCTTTGTACT 60

TGGTTTGTGG TGAAAGAGGT TTCTTCTACA CTCCAAAGTC

TGACGACGCT 110

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:4:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 100 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

- (C) Tipo de enlace: simples
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 (ii) Tipo de molécula: ADN
 (xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:4:

CTGCGGGCTG CGTCTAAGCA CAGTAGTTTT CCAATTGGTA
 CAAAGAACAG ATAGAAGTAC 60
 AACATTGTTC AACGATACCC TTAGCGTCGT CAGACTTTGG
 100

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:5:

(i) Características da sequência:

- (A) Longitude: 25 pares base
 (B) Tipo: ácido nucleico
 (C) Tipo de enlace: simples
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:5:

GTCGCCATGG CTAAGAGATT CGTTG

25

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:6:

(i) Características da sequência:

- (A) Longitude: 27 pares base
 (B) Tipo: ácido nucleico
 (C) Tipo de enlace: simples
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:6:

CTGCTCTAGA GCCTGCGGGC TGCGTCT

27

(2) Identidade da ID de SEC Nº:7:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 110 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:7:

TGGCTAAGAG ATTCGTTACT CAACACTTGT GCGGTTCTCA
CTTGGTTGAA GCTTTGTACT 60
TGGTTTGTGG TGAAAGAGGT TTCTTCTACA CTCCAAAGTC
TGACGACGCT 110

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:8:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 25 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:8:

GTCGCCATGG CTAAGAGATT CGTTA

25

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:9:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 100 pares básicos

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: AND

(xi) Descripción da sequência: ID de SEC Nº:9:

CTGCGGGCTG CGTCTAACCA CAGTAGTTTT CCAATTGGTA
CAAAGAACAG ATAGAAGTAC 60
AACATTGTTC AACGATACCC TTAGCGTCGT CAGACTTTGG
100

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:10:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 27 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descripción da sequência: ID de SEC Nº:10:

ACGTACGTTC TAGAGCCTGC GGGCTGC

27

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:11:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 78 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: AND

(xi) Descripción da sequência: ID de SEC Nº:11:

CACTTGGTTG AAGCTTTGTA CTTGGTTTGT GGTGAAAGAG
GTTTC'ITCTA CACTCCAAAG 60
ACTAGAGGTA TCGTTGAA

78

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:12:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 63 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:12:

GCTAACGTCG CCATGGCTAA GAGAGAAGAA GCTGAAGCTG
AAGCTAGATT CGTTAACCAA 60
CAC

63

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:13:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 65 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:13:

GCTAACGTCG CCATGGCTAA GAGAGAAGAA GCTGAAGCGA
AGCTGAAAGA TTCGTTAACC 60

73

AACAC

65

9

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:14:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 415 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 80..391

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:14:

ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC
AAACTATCAA TTTCATACAC 60
AATATAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG
TCC TTG ATC 112

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile

1 5 10

GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT
GTT GAG 160

Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu

15 20 25

ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG
GCT AAC 208

Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn

30 35 40

GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT
TCT CAC 256

Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His

45 50 55

TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC
TTC TAC 304

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

60 65 70 75

ACT CCA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC GTT GAA CAA TGT
TGT ACT 352

Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr

80 85 90

TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT AAC
TAGACGCAGC 401

Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

95 100

CCGCAGGCTC TAGA

415

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:15:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 104 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo molecular: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:15:

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala

1 5 10 15

Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser

20 25 30

Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn Val Ala Met Ala Lys

35 40 45

75

Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
 50 55 60
 Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp
 65 70 75 80
 Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu
 85 90 95
 Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:16:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 415 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:16:

TAGCTTAAGG	TAAGTTCTTA	TCAAGTTTGT	TCTTCTAATG
TTTGATAGTT AAAGTATGTG 60			
TTATATTGTC	TGGTTTTCTT	ACTTCCGACA	AAAGAACCAA
AACAGGAACT AGCCTAAGAC 120			
GACCCGGGTT	GGTCAGTGAC	CGCTACTTAG	TAGACAACTC
TAAGGCCTTC TCAGAGACTA 180			
GTAGCGACTT	TTGTGGTGAA	ACCGATTGCA	GCGGTACCGA
TTCTCTAAGC AATTGGTTGT 240			
GAACACGCCA	AGAGTGAACC	AACTTCGAAA	CATGAACCAA
ACACCACTTT CTCCAAAGAA 300			

GATGTGAGGT TTCAGACTGC TCGGATTCCC ATAGCAACTT
 GTTACAACAT GAAGATAGAC 360
 AAGAAACATG GTTAACCTTT TGATGACATT GATCTGCGTC
 GGGCGTCCGA GATCT 415

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:17:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 523 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo molecular: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 80..499

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:17:

ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC
 AAACATATCAA TTTCATACAC 60
 AATATAAACG ATTAAAAGA ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT
 GCA GTT TTA 112

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu

1 5 10

TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA
 ACA GAA 160

Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu

15 20 25

GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC
 TCA GAT 208

Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp

30 35 40

TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC
AGC ACA 256

Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr

45 50 55

AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT
GCT GCT 304

Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala

60 65 70 75

AAA GAA GAA GGG GTA TCT TTG GAT AAG AGA GAA GTT AAC
CAA CAC TTG 352

Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Asp Lys Arg Glu Val Asn Gln His Leu

80 85 90

TGC GGT TCT CAC TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT
GAA AGA 400

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg

95 100 105

GGT TTC TTC TAC ACT GAA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC
GTT GAA 448

Gly Phe Phe Tyr Thr Glu Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu

110 115 120

CAA TGT TGT ACT TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC
TAC TGT 496

Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys

125 130 135

AAC TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA

523

Asn

140

(2) Informação sobre a ID de SEC N°:18:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 140 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC N°:18:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80
Ser Leu Asp Lys Arg Glu Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
85 90 95
Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
100 105 110
Glu Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
115 120 125
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
130 135 140

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:19:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 523 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:19:

TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG
TTTGATAGTT AAAGTATGTG 60
TTATATTTGC TAATTTTCTT ACTCTAAAGG AAGTTAAAAA
TGACGTCAAA ATAAGCGTCG 120
TAGGAGGCGT AATCGACGAG GTCAGTTGTG ATGTTGTCTT
CTACTTTGCC GTGTTTAAGG 180
CCGACTTCGA CAGTAGCCAA TGAGTCTAAA TCTTCCCCTA
AAGCTACAAC GACAAAACGG 240
TAAAAGGTTG TCGTGTTTAT TGCCCAATAA CAAATATTTA
TGATGATAAC GGTCGTAACG 300
ACGATTCTT CTTCCCCATA GAAACCTATT CTCTCTTCAA
TTGGTTGTGA ACACGCCAAG 360
AGTGAACCAA CTTCGAAACA TGAACCAAAC ACCACTTTCT
CCAAAGAAGA TGTGACTTTT 420
CAGACTGCTG CGATTCCCAT AGCAACTTGT TACAACATGA
AGATAGACAA GAAACATGGT 480
TAACCTTTTG ATGACATTGA TCTGCGTCGG GCGTCCGAGA TCT
523

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:20:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 415 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 80..391

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:20:

ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC
AAACTATCAA TTTCATACAC 60
AATATAAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG
TCC TTG ATC 112

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile

1 5 10

GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT
GTT GAG 160

Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu

15 20 25

ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG
GCT AAC 208

Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn

30 35 40

GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT GAC CAA CAC TTG TGC GGT
TCT CAC 256

Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His

45 50 55

TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC
TTC TAC 304

Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr
60 65 70 75

ACT CCA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC GTT GAA CAA TGT
TGT ACT 352

Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr
80 85 90

TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT GCT
TAGACGCAGC 401

Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Ala
95 100

CCGCAGGCTC TAGA 415

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:21:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 104 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:21:

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala

1 5 10 15

Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser

20 25 30

Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn Val Ala Met Ala Lys

35 40 45

Arg Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

9

50 55 60
 Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp
 65 70 75 80
 Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu
 85 90 95
 Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Ala
 100

(2) Informação sobre a ID de SEC N°:22:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 415 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC N°:22:

TAGCTTAAGG	TAAGTTCTTA	TCAAGTTTGT	TCTTCTAATG
TTTGATAGTT	AAAGTATGTG	60	
TTATATTTGC	TGGTTTTCTT	ACTTCCGACA	AAAGAACCAA
AACAGGAACT	AGCCTAAGAC	120	
GACCCGGGTT	GGTCAGTGAC	CGCTACTTAG	TAGACAACTC
TAAGGCCTTC	TCAGAGACTA	180	
GTAGCGACTT	TTGTGGTGAA	ACCGATTGCA	GCGGTACCGA
TTCTCTAAGC	AACTGGTTGT	240	
GAACACGCCA	AGAGTGAACC	AACTTCGAAA	CATGAACCAA
ACACCACTTT	CTCCAAAGAA	300	
GATGTGAGGT	TTCAGACTGC	TGCGATTCCC	ATAGCAACTT
GTTACAACAT	GAAGATAGAC	360	

AAGAAACATG GTTAACCTTT TGATGACACG AATCTGCGTC
GGGCGTCCGA GATCT 415

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:23:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 415 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 80..391

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:23:

ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC
AAACTATCAA TTTCATACAC 60
AATATAAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG
TCC TTG ATC 112

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile

1 5 10

GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT
GTT GAG 160

Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu

15 20 25

ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG
GCT AAC 208

Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn

30 35 40

GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT ACT CAA CAC TTG TGC GGT
TCT CAC 256

Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Thr Gln His Leu Cys Gly Ser His

45 50 55

TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC
TTC TAC 304

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

60 65 70 75

ACT CCA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC GTT GAA CAA TGT
TGT ACT 352

Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr

80 85 90

TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT GCT
TAGACGCAGC 401

Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Ala

95 100

CCGCAGGCTC TAGA

415

(2) Informação sobre a ID de SEC N°:24:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 104 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC N°:24:

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala

1 5 10 15

Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser

9

20	25	30	
Leu	Ile	Ile	Ala
Glu	Asn	Thr	Thr
Leu	Ala	Asn	Val
Ala	Met	Ala	Lys
35	40	45	
Arg	Phe	Val	Thr
Gln	His	Leu	Cys
Gly	Ser	His	Leu
Val	Glu	Ala	Leu
50	55	60	
Tyr	Leu	Val	Cys
Gly	Glu	Arg	Gly
Phe	Phe	Tyr	Thr
Pro	Lys	Ser	Asp
65	70	75	80
Asp	Ala	Lys	Gly
Ile	Val	Glu	Gln
Cys	Cys	Thr	Ser
Ile	Cys	Ser	Leu
85	90	95	
Tyr	Gln	Leu	Glu
Asn	Tyr	Cys	Ala
100			

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:25:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 415 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:25:

TAGCTTAAGG	TAAGTTCTTA	TCAAGTTTGT	TCTTCTAATG
TTTGATAGTT	AAAGTATGTG	60	
TTATATTTGC	TGGTTTTCTT	ACTTCCGACA	AAAGAACCAA
AACAGGAACT	AGCCTAAGAC	120	
GACCCGGGTT	GGTCAGTGAC	CGCTACTTAG	TAGACAACTC
TAAGGCCTTC	TCAGAGACTA	180	
GTAGCGACTT	TTGTGGTGAA	ACCGATTGCA	GCGGTACCGA
TTCTCTAAGC	AATGAGTTGT	240	

GAACACGCCA AGAGTGAACC AACTTCGAAA CATGAACCAA
 ACACCACTTT CTCCAAAGAA 300
 GATGTGAGGT TTCAGACTGC TCGATTCCC ATAGCAACTT
 GTTACAACAT GAAGATAGAC 360
 AAGAAACATG GTTAACCTTT TGATGACACG AATCTGCGTC
 GGGCGTCCGA GATCT 415

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:26:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 415 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 80..391

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:26:

ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC
 AAACATATCAA TTTCATACAC 60
 AATATAAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG
 TCC TTG ATC 112

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile

1 5 10

GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT
 GTT GAG 160

Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu

15 20 25

ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG
GCT AAC 208

Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn

30 35 40

GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT GAC CAA CAC TTG TGC GGT
TCT CAC 256

Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His

45 50 55

TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC
TTC TAC 304

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

60 65 70 75

ACT CCA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC GTT GAA CAA TGT
TGT ACT 352

Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr

80 85 90

TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT GGT
TAGACGCAGC 401

Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly

95 100

CCGCAGGCTC TAGA

415

(2) Informação da ID de SEC N°:27:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 104 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC N°:27:

9

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala
 1 5 10 15
 Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser
 20 25 30
 Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn Val Ala Met Ala Lys
 35 40 45
 Arg Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
 50 55 60
 Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp
 65 70 75 80
 Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu
 85 90 95
 Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly
 100

(2) Informação sobre a ID de SEC N°:28:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 415 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC N°:28:

TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG
 TTTGATAGTT AAAGTATGTG 60
 TTATATTTGC TGGTTTTCTT ACTTCCGACA AAAGAACCAA
 AACAGGAACT AGCCTAAGAC 120

GACCCGGGTT GGTCACTGAC CGCTACTTAG TAGACAACTC
 TAAGGCCTTC TCAGAGACTA 180
 GTAGCGACTT TTGTGGTGAA ACCGATTGCA GCGGTACCGA
 TTCTCTAAGC AACTGGTTGT 240
 GAACACGCCA AGAGTGAACC AACTTCGAAA CATGAACCAA
 ACACCACTTT CTCCAAAGAA 300
 GATGTGAGGT TTCAGACTGC TGCGATTCCC ATAGCAACTT
 GTTACAACAT GAAGATAGAC 360
 AAGAAACATG GTTAACCTTT TGATGACACC AATCTGCGTC
 GGGCGTCCGA GATCT 415

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:29:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 415 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 80..391

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:29:

ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC
 AAACATCAA TTTCATACAC 60
 AATATAAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG
 TCC TTG ATC 112

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile

1 5 10

GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT
 GTT GAG 160

Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu

15 20 25

ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG
GCT AAC 208

Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn

30 35 40

GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT ACT CAA CAC TTG TGC GGT
TCT CAC 256

Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Thr Gln His Leu Cys Gly Ser His

45 50 55

TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC
TTC TAC 304

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

60 65 70 75

ACT CCA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC GTT GAA CAA TGT
TGT ACT 352

Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr

80 85 90

TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT GGT
TAGACGCAGC 401

Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly

95 100

CCGCAGGCTC TAGA

415

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:30:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 104 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) DESCRIÇÃO da sequência: ID de SEC Nº:30:

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala
 1 5 10 15
 Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser
 20 25 30
 Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn Val Ala Met Ala Lys
 35 40 45
 Arg Phe Val Thr Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
 50 55 60
 Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp
 65 70 75 80
 Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu
 85 90 95
 Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly
 100

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:31:

(i) Características da sequência:

- (A) Longitude: 415 pares base
- (B) Tipo: ácido nucleico
- (C) Tipo de enlace: simples
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:31:

TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG
 TTTGATAGTT AAAGTATGTG 60
 TTATATTTGC TGGTTTTCTT ACTTCCGACA AAAGAACCAA
 AACAGGAACT AGCCTAAGAC 120

GACCCGGGTT	GGTCAGTGAC	CGCTACTTAG	TAGACAACTC
TAAGGCCTTC TCAGAGACTA 180			
GTAGCGACTT	TTGTGGTGAA	ACCGATTGCA	GCGGTACCGA
TTCTCTAAGC AATGAGTTGT 240			
GAACACGCCA	AGAGTGAACC	AACTTCGAAA	CATGAACCAA
ACACCACTTT CTCCAAAGAA 300			
GATGTGAGGT	TTCAGACTGC	TGCGATTCCC	ATAGCAACTT
GTTACAACAT GAAGATAGAC 360			
AAGAAACATG	GTTAACCTTT	TGATGACACC	AATCTGCGTC
GGGCGTCCGA GATCT 415			

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:32:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 523 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 80..499

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:32:

ATCGAATTCC	ATTCAAGAAT	AGTTCAAACA	AGAAGATTAC
AAACTATCAA TTTCATACAC 60			
AATATAAACG ATTAAAAGA ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT			
GCA GTT TTA 112			

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu

1

5

10

TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA
ACA GAA 160

Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu

15 20 25

GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC
TCA GAT 208

Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp

30 35 40

TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC
AGC ACA 256

Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr

45 50 55

AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT
GCT GCT 304

Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala

60 65 70 75

AAA GAA GAA GGG GTA TCT TTG GAT AAG AGA TTC GTT AAC CAA
CAC TTG 352

Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Asp Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu

80 85 90

TGC GGT TCT CAC TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT
GAA AGA 400

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg

95 100 105

GGT TTC TTC TAC ACT CCA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC
GTT GAA 448

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu

110 115 120

CAA TGT TGT ACT TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC
TAC TGT 496

Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys

125 130 135

AAC TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA

523

Asn

140

(2) Informação sobre a ID de SEC N°:33:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 140 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC N°:33:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln

20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val

65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu

85 90 95

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

95

100 105 110
Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
115 120 125
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
130 135 140

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:34:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 523 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:34:

TAGCTTAAGG	TAAGTTCTTA	TCAAGTTTGT	TCTTCTAATG
TTTGATAGTT	AAAGTATGTG	60	
TTATATTTGC	TAATTTTCTT	ACTCTAAAGG	AAGTTAAAAA
TGACGTCAAA	ATAAGCGTCG	120	
TAGGAGGCGT	AATCGACGAG	GTCAGTTGTG	ATGTTGTCTT
CTACTTTGCC	GTGTTTAAGG	180	
CCGACTTCGA	CAGTAGCCAA	TGAGTCTAAA	TCTTCCCCTA
AAGCTACAAC	GACAAAACGG	240	
TAAAAGGTTG	TCGTGTTTAT	TGCCCAATAA	CAAATATTTA
TGATGATAAC	GGTCGTAACG	300	
ACGATTTCTT	CTTCCCCATA	GAAACCTATT	CTCTAAGCAA
TTGGTTGTGA	ACACGCCAAG	360	
AGTGAACCAA	CTTCGAAACA	TGAACCAAAC	ACCACTTTCT
CCAAAGAAGA	TGTGAGGTTT	420	

CAGACTGCTG CGATTCCCAT AGCAACTTGT TACAACATGA
 AGATAGACAA GAAACATGGT 480
 TAACCTTTTG ATGACATTGA TCTGCGTCGG GCGTCCGAGA TCT
 523

(2) Informação sobre a ID de SEC N°:35:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 409 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 80..385

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC N°:35:

ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC
 AAACATATCAA TTTCATACAC 60
 AATATAAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG
 TCC TTG ATC 112

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile

1 5 10

GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT
 GTT GAG 160

Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu

15 20 25

ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG
 GCT AAC 208

Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn

30 35 40

GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT

TCT CAC 256

Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His

45 50 55

TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC

TTC TAC 304

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

60 65 70 75

ACT CCT AAG GAA AAG AGA GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT ACT

TCT ATC 352

Thr Pro Lys Glu Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile

80 85 90

TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT GGT TAGACGCAGC

CCGCAGGCTC 405

Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly

95 100

TAGA

409

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:36:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 102 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:36:

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala

9

1	5	10	15
Gln	Pro	Val	Thr
Gly	Asp	Glu	Ser
Ser	Val	Glu	Ile
Pro	Glu	Glu	Ser
20	25	30	
Leu	Ile	Ile	Ala
Glu	Asn	Thr	Thr
Leu	Ala	Asn	Val
Ala	Met	Ala	Lys
35	40	45	
Arg	Phe	Val	Asn
Gln	His	Leu	Cys
Gly	Ser	His	Leu
Val	Glu	Ala	Leu
50	55	60	
Tyr	Leu	Val	Cys
Gly	Glu	Arg	Gly
Phe	Phe	Tyr	Thr
Pro	Lys	Glu	Lys
65	70	75	80
Arg	Gly	Ile	Val
Glu	Gln	Cys	Cys
Thr	Ser	Ile	Cys
Ser	Leu	Tyr	Gln
85	90	95	
Leu	Glu	Asn	Tyr
Cys	Gly		
100			

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:37:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 409 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:37:

TAGCTTAAGG	TAAGTTCTTA	TCAAGTTTGT	TCTTCTAATG
TTTGATAGTT	AAAGTATGTG	60	
TTATATTTGC	TGGTTTTCTT	ACTTCCGACA	AAAGAACCAA
AACAGGAACT	AGCCTAAGAC	120	
GACCCGGGTT	GGTCAGTGAC	CGCTACTTAG	TAGACAACCTC
TAAGGCCTTC	TCAGAGACTA	180	

GTAGCGACTT TTGTGGTGAA ACCGATTGCA GCGGTACCGA
 TTCTCTAAGC AATTGGTTGT 240
 GAACACGCCA AGAGTGAACC AACTTCGAAA CATGAACCAA
 ACACCACTTT CTCAAAGAA 300
 GATGTGAGGA TTCCTTTTCT CTCCATAGCA ACTTGTTACA
 ACATGAAGAT AGACAAGAAA 360
 CATGGTTAAC CTTTGTATGA CACCAATCTG CGTCGGGCGT
 CCGAGATCT 409

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:38:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 511 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 77..487

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:38:

GAATTCCATT CAAGAATAGT TCAAACAAGA AGATTACAAA
 CTATCAATTT CATAACAAT 60
 ATAAACGATT AAAAGA ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA
 GTT TTA 109

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu

1 5 10

TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA
 ACA GAA 157

Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu

15 20 25

GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC
TCA GAT 205

Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp

30 35 40

TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC
AGC ACA 253

Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr

45 50 55

AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT
GCT GCT 301

Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala

60 65 70 75

AAA GAA GAA GGG GTA TCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT AAC CAA
CAC TTG 349

Lys Glu Glu Gly Val Ser Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu

80 85 90

TGC GGT TCC CAC TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT
GAA AGA 397

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg

95 100 105

GGT TTC TTC TAC ACT CCA AAG ACT AGA GGT ATC GTT GAA CAA
TGT TGT 445

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys

110 115 120

ACT TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGC AAC
487

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

125 130 135
TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA

511

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:39:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 137 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácidos

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:39:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80
Ser Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
85 90 95
Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
100 105 110
Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser
115 120 125
Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
130 135

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:40:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 511 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:40:

CTTAAGGTAA GTTCTTATCA AGTTTGTCT TCTAATGTTT
GATAGTTAAA GTATGTGTTA 60
TATTTGCTAA TTTTCTTACT CTAAAGGAAG TTAAAAATGA
CGTCAAAATA AGCGTCGTAG 120
GAGGCGTAAT CGACGAGGTC AGTTGTGATG TTGTCTTCTA
CTTTGCCGTG TTTAAGGCCG 180
ACTTCGACAG TAGCCAATGA GTCTAAATCT TCCCCTAAAG
CTACAACGAC AAAACGGTAA 240
AAGGTTGTCG TGTTTATTGC CCAATAACAA ATATTTATGA
TGATAACGGT CGTAACGACG 300
ATTTCTTCTT CCCCATAGGT ACCGATTCTC TAAGCAATTG
GTTGTGAACA CGCCAAGGGT 360
GAACCAACTT CGAAACATGA ACCAAACACC ACTTTCTCCA
AAGAAGATGT GAGGTTTCTG 420
ATCTCCATAG CAACTTGTTA CAACATGAAG ATAGACAAGA
AACATGGTTA ACCTTTTGAT 480
GACGTTGATC TCGTCGGGC GTCCGAGATC T 511

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:41:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 523 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 80..499

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:41:

ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC
AAACTATCAA TTTCATACAC 60
AATATAAACG ATTAAAAGA ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT
GCA GTT TTA 112

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu

1 5 10

TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA
ACA GAA 160

Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu

15 20 25

GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC
TCA GAT 208

Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp

30 35 40

TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC
AGC ACA 256

Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr

45 50 55

AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT
GCT GCT 304

Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala

60 65 70 75

AAA GAA GAA GGG GTA TCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT AAC CAA
CAC TTG 352

Lys Glu Glu Gly Val Ser Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu

80 85 90

TGC GGT TCC CAC TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGC GGT
GAA AGA 400

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg

95 100 105

GGT TTC TTC TAC ACT CCT AAG TCT GAC GAT GCT AAG GGT ATT
GTC GAG 448

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu

110 115 120

CAA TGC TGT ACC TCC ATC TGC TCC TTG TAC CAA TTG GAA AAC
TAC TGC 496

Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys

125 130 135

AAC TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA

523

Asn

140

(2) Informação sobre a ID de SEC N°:42:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 140 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:42:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80
Ser Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
85 90 95
Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
100 105 110
Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
115 120 125
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
130 135 140

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:43:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 523 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:43:

TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG
TTTGATAGTT AAAGTATGTG 60
TTATATTTGC TAATTTTCTT ACTCTAAAGG AAGTTAAAAA
TGACGTCAAA ATAAGCGTCG 120
TAGGAGGCGT AATCGACGAG GTCAGTTGTG ATGTTGTCTT
CTACTTTGCC GTGTTTAAGG 180
CCGACTTCGA CAGTAGCCAA TGAGTCTAAA TCTTCCCCTA
AAGCTACAAC GACAAAACGG 240
TAAAAGGTTG TCGTGTTTAT TGCCCAATAA CAAATATTTA
TGATGATAAC GGTCGTAACG 300
ACGATTTCTT CTTCCCCATA GGTACCGATT CTCTAAGCAA
TTGGTTGTGA ACACGCCAAG 360
GGTGAACCAA CTTGAAACA TGAACCAAAC GCCACTTTCT
CCAAAGAAGA TGTGAGGATT 420
CAGACTGCTA CGATTCCCAT AACAGCTCGT TACGACATGG
AGGTAGACGA GGAACATGGT 480
TAACCTTTTG ATGACGTTGA TCTGCGTCGG GCGTCCGAGA TCT
523

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:44:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 535 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 77..511

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:44:

GAATTCCATT CAAGAATAGT TCAAACAAGA AGATTACAAA
CTATCAATTT CATAACAAT 60
ATAAACGATT AAAAGA ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA
GTT TTA 109

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu

1 5 10

TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA
ACA GAA 157

Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu

15 20 25

GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC
TCA GAT 205

Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp

30 35 40

TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC
AGC ACA 253

Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr

45 50 55

AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT
GCT GCT 301

Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala

60 65 70 75

AAA GAA GAA GGG GTA TCC ATG GCT AAG AGA GAA GAA GCT
GAA GCT GAA 349

Lys Glu Glu Gly Val Ser Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu

9

80 85 90
 GCT AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCC CAC TTG GTT
 GAA GCT 397
 Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala

95 100 105
 TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC TTC TAC ACT CCA
 AAG ACT 445
 Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

110 115 120
 AGA GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT ACT TCT ATC TGT TCT TTG
 TAC CAA 493
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln

125 130 135
 TTG GAA AAC TAC TGC AAC TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA
 535
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

140 145

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:45:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 145 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:45:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln

9

20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Arg Phe Val Asn
 85 90 95
 Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
 100 105 110
 Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val Glu
 115 120 125
 Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
 130 135 140
 Asn
 145

(2) Informação da ID de SEC Nº:46:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 535 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:46:

CTTAAGGTAA GTTCTTATCA AGTTTGTTCT TCTAATGTTT
 GATAGTTAAA GTATGTGTTA 60

TATTTGCTAA TTTTCTTACT CTAAAGGAAG TTAAAAATGA
 CGTCAAATA AGCGTCGTAG 120
 GAGGCGTAAT CGACGAGGTC AGTTGTGATG TTGTCTTCTA
 CTTTGCCGTG TTTAAGGCCG 180
 ACTTCGACAG TAGCCAATGA GTCTAAATCT TCCCCTAAAG
 CTACAACGAC AAAACGGTAA 240
 AAGGTTGTCG TGTTTATTGC CCAATAACAA ATATTTATGA
 TGATAACGGT CGTAACGACG 300
 ATTTCTTCTT CCCCATAGGT ACCGATTCTC TCTTCTTCGA
 CTTGACTTC GATCTAAGCA 360
 ATTGGTTGTG AACACGCCAA GGGTGAACCA ACTTCGAAAC
 ATGAACCAA CACCACTTTC 420
 TCCAAAGAAG ATGTGAGGTT TCTGATCTCC ATAGCAACTT
 GTTACAACAT GAAGATAGAC 480
 AAGAAACATG GTTAACCTTT TGATGACGTT GATCTGCGTC
 GGGCGTCCGA GATCT 535

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:47:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 538 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: cADN

(ix) Características:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) Localização: 77..514

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:47:

GAATTCCATT CAAGAATAGT TCAAACAAGA AGATTACAAA
CTATCAATTT CATAACAAT 60
ATAAACGATT AAAAGA ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA
GTT TTA 109

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu

1 5 10

TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA
ACA GAA 157

Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu

15 20 25

GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC
TCA GAT 205

Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp

30 35 40

TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC
AGC ACA 253

Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr

45 50 55

AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT
GCT GCT 301

Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala

60 65 70 75

AAA GAA GAA GGG GTA TCC ATG GCT AAG AGA GAA GAA GCT
GAA GCT GAA 349

Lys Glu Glu Gly Val Ser Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu

80 85 90

GCT GAA AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCC CAC TTG
GTT GAA 397

Ala Glu Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu

9

95	100	105
GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC TTC TAC ACT		
CCA AAG 445		
Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys		
110	115	120
ACT AGA GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT ACT TCT ATC TGT TCT		
TTG TAC 493		
Thr Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr		
125	130	135
CAA TTG GAA AAC TAC TGC AAC TAGACGCAGC CCGCAGGCTC		
TAGA 538		
Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn		
140	145	

(2) Informação sobre a ID de SEC Nº:48:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 146 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácidos

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) Tipo de molécula: proteína

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC Nº:48:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser									
1	5	10	15						
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln									
20	25	30							
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe									
35	40	45							
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu									

9

50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu Arg Phe Val
 85 90 95
 Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
 100 105 110
 Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val
 115 120 125
 Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr
 130 135 140
 Cys Asn
 145

(2) Informação sobre a ID de SEC N°:49:

(i) Características da sequência:

(A) Longitude: 538 pares base

(B) Tipo: ácido nucleico

(C) Tipo de enlace: simples

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADN

(xi) Descrição da sequência: ID de SEC N°:49:

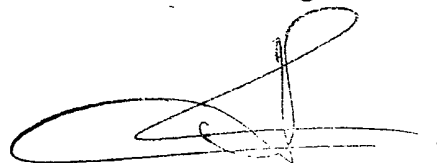
CTTAAGGTAA GTTCTTATCA AGTTTGTCT TCTAATGTTT
 GATAGTTAAA GTATGTGTTA 60
 TATTTGCTAA TTTTCTTACT CTAAAGGAAG TTAAAAATGA
 CGTCAAAATA AGCGTCGTAG 120

GAGGCGTAAT	CGACGAGGTC	AGTTGTGATG	TTGTCTTCTA
CTTTGCCGTG	TTTAAGGCCG 180		
ACTTCGACAG	TAGCCAATGA	GTCTAAATCT	TCCCCTAAAG
CTACAACGAC	AAAACGGTAA 240		
AAGGTTGTCG	TGTTTATTGC	CCAATAACAA	ATATTTATGA
TGATAACGGT	CGTAACGACG 300		
ATTTCTTCTT	CCCCATAGGT	ACCGATTCTC	TCTTCTTCGA
CTTCGACTTC	GACTTTCTAA 360		
GCAATTGGTT	GTGAACACGC	CAAGGGTGAA	CCAACTTCGA
AACATGAACC	AAACACCACT 420		
TTCTCCAAAG	AAGATGTGAG	GTTTCTGATC	TCCATAGCAA
CTTGTTACAA	CATGAAGATA 480		
GACAAGAAAC	ATGGTTAACC	TTTTGATGAC	GTTGATCTGC
GTCGGGCGTC	CGAGATCT 538		

Lisboa, 6 de Novembro de 2001.

Pela Requerente

O Agente Oficial



Gonçalo da Cunha Ferreira

Adjunto do Agente Oficial de
Propriedade Industrial

R. D. João V, 9-2.º dt.º - 1250 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Derivado de insulina que tem a seguinte sequência:

Cadeia A S _____ S

7

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-

1 2 3 4 5 6 8 9 10 11 12

S

Cadeia B S

Xa₁-Val-Xa₂-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Cadeia A (cont.)

20

Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa (ID de SEC N°:1)

13 14 15 16 17 18 19 21

S

Cadeia B (cont.) S

Glu-Al₁-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-

13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

Cadeia B (cont.)

Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Xaa

(ID de SEC N°:2)

25 26 27 28 29 30

caracterizado por

Xaa nas posições A21 e B3 ser, independentemente, qualquer resíduo aminoácido que possa ser codificado pelo código genético, salvo Lys, Arg e Cys;

Xaa na posição B1 ser Phe ou ser suprimido;

Xaa na posição B30 ser (a) um aminoácido lipofílico não codificável que apresenta entre 10 e 24 átomos de carbono, em cujo caso um grupo acilo de um ácido carboxílico com até 5 átomos de carbono ser ligado ao grupo α -amino de Lys^{B29}, (b) qualquer resíduo aminoácido que possa ser codificado pelo código genético, salvo Lys, Arg e Cys, em cujo caso o grupo α -amino de Lys^{B29} inclui um substituinte lipofílico ou (c) é suprimido, em cujo caso o grupo α -amino de Lys^{B29} apresenta um substituinte lipofílico; e qualquer de seus complexos Zn²⁺ derivados, sempre que, quando Xaa na posição B30 seja Thr ou Ala, Xaa nas posições A21 e B3 sejam ambos Asn e Xaa na posição B1 seja Phe, então, o derivado de insulina é um complexo Zn²⁺

2. Derivado de insulina segundo a reivindicação 1, caracterizado por

Xaa nas posições A21 e B3 ser, independentemente, qualquer resíduo aminoácido que possa ser codificado pelo código genético, salvo Lys, Arg e Cys;

Xaa na posição B1 ser Phe ou ser suprimido;

Xaa na posição B30 ser um aminoácido lipofílico não codificável que tem entre 10 e 24 átomos de carbono e um grupo acilo ser ligado ao grupo α -amino de Lys^{B29}, onde o grupo acilo é um grupo acilo de um ácido monocarboxílico com até 4 átomos de carbono ou um ácido dicarboxílico com até 5 átomos de carbono.

3. Derivado de insulina segundo a reivindicação 1, caracterizado por

Xaa nos posições A21 e B3 ser, independentemente, qualquer resíduo aminoácido que possa ser codificado pelo código genético, salvo Lys, Arg e Cys;

Xaa na posição B1 ser Phe ou ser suprimido;

Xaa na posição B30 ser suprimido ou ser qualquer resíduo aminoácido que possa ser codificado pelo código genético, salvo Lys, Arg e Cys e o grupo α -amino de Lys^{B29} tem um substituinte lipofílico que compreende, como mínimo, 6 átomos de carbono.

4. Derivado de insulina segundo a reivindicação 2, caracterizado por Xaa na posição B30 ser seleccionado do grupo consistente em ácido α -aminodecanóico, ácido α -aminododecanoico, ácido α -aminotetradecanoico e ácido α -aminohexadecanoico.

5. Derivado de insulina segundo a reivindicação 2, caracterizado o grupo acilo ligado ao grupo α -amino de Lys^{B29} ser seleccionado do grupo consistente em formilo, acetilo, propionilo e n-butilo.

6. Derivado de insulina segundo a reivindicação 2, caracterizado o grupo acilo ligado ao grupo α -amino de Lys^{B29} ser um grupo acilo de ácido succínico.

7. Derivado de insulina segundo a reivindicação 3, caracterizado por Xaa na posição B30 ser suprimido.

8. Derivado de insulina segundo a reivindicação 3, caracterizado por Xaa na posição B30 ser Asp, Glu ou Thr.

9. Derivado de insulina segundo a reivindicação 3, caracterizado por o substituinte lipofílico ligado ao grupo α -amino de Lys^{B29} ser um grupo acilo derivado de um ácido carboxílico que tem, como mínimo, 6 átomos de carbono.

10. Derivado de insulina segundo a reivindicação 9, caracterizado por o grupo acilo, que pode ser ramificado, compreende uma cadeia principal de átomos de carbono de 8-24 átomos de longitude.

11. Derivado de insulina segundo a reivindicação 9, caracterizado por o grupo acilo ser um grupo acilo de um ácido gorduroso que tem, como mínimo, 6 átomos de carbono.

12. Derivado de insulina segundo a reivindicação 9, caracterizado por o grupo acilo ser um grupo acilo derivado de um ácido carboxílico saturado lineal que apresenta entre 6 e 24 átomos de carbono.

13. Derivado de insulina segundo a reivindicação 9, caracterizado por o grupo acilo ser seleccionado do grupo que compreende ácido dodecanoico, ácido tridecanoico e ácido tetradecanoico.

14. Derivado de insulina segundo a reivindicação 1, caracterizado por Xaa na posição A21 ser Ala, Gln, Gly ou Ser.

15. Derivado de insulina segundo a reivindicação 1, caracterizado por Xaa na posição B3 ser Asp, Gln ou Thr.

16. Derivado de insulina segundo a reivindicação 1, caracterizado por Xaa na posição B1 ser suprimido.

17. Composição farmacêutica para tratar a diabetes em um paciente que necessite esse tratamento, caracterizada por incluir uma quantidade terapêuticamente eficaz de um derivado de insulina segundo a reivindicação 1 junto com um suporte farmacêuticamente aceitável.

18. Composição farmacêutica para tratar a diabetes em um paciente que necessite esse tratamento, caracterizada por incluir uma quantidade terapêuticamente eficaz de um derivado de insulina segundo a reivindicação 1, misturado com uma insulina ou um semelhante de insulina que presente um começo de ação rápida, junto com um suporte farmacêuticamente aceitável.

19. Método para tratar o diabetes em um paciente que necessite esse tratamento, caracterizado por incluir a administração ao paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um derivado de insulina segundo a reivindicação 1 junto com um suporte farmacêuticamente aceitável.

20. Método para tratar a diabetes em um paciente que necessite esse tratamento, caracterizado por incluir a administração ao paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um derivado de insulina segundo a reivindicação 1 misturado com uma insulina ou um semelhante de insulina que presente um começo de ação rápida, junto com um suporte farmacêuticamente aceitável.

21. Uso de uma quantidade farmacêutica eficaz de um derivado de insulina segundo a reivindicação 1 junto com um suporte farmacêuticamente aceitável caracterizado por preparar uma composição farmacêutica para tratar o diabetes.

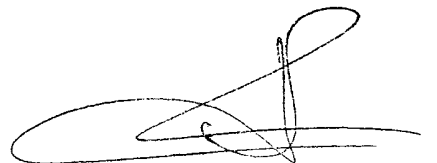
22. Uso de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um derivado de insulina segundo a reivindicação 1 junto com um suporte farmacêuticamente aceitável caracterizado por preparar uma composição farmacêutica adequada para a administração subcutânea para o tratamento da diabetes.

23. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um derivado de insulina segundo a reivindicação 1 e insulina ou semelhante de insulina caracterizado por apresentar um começo de acção rápida, junto com um suporte farmacêuticamente aceitável para preparar uma composição farmacêutica para tratar a diabetes.

24. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um derivado de insulina segundo a reivindicação 1 e insulina ou semelhante de insulina caracterizado por apresentar um começo de acção rápida, junto com um suporte farmacêuticamente aceitável para preparar uma composição farmacêutica adequada destinada a administração subcutânea para o tratamento da diabetes.

Lisboa, 6 de Novembro de 2001.

Pela Requerente
O Agente Oficial



Gonçalo da Cunha Ferreira
Adjunto do Agente Oficial de
Propriedade Industrial
R. D. João V, 9-2.º dt.º - 1250 LISBOA

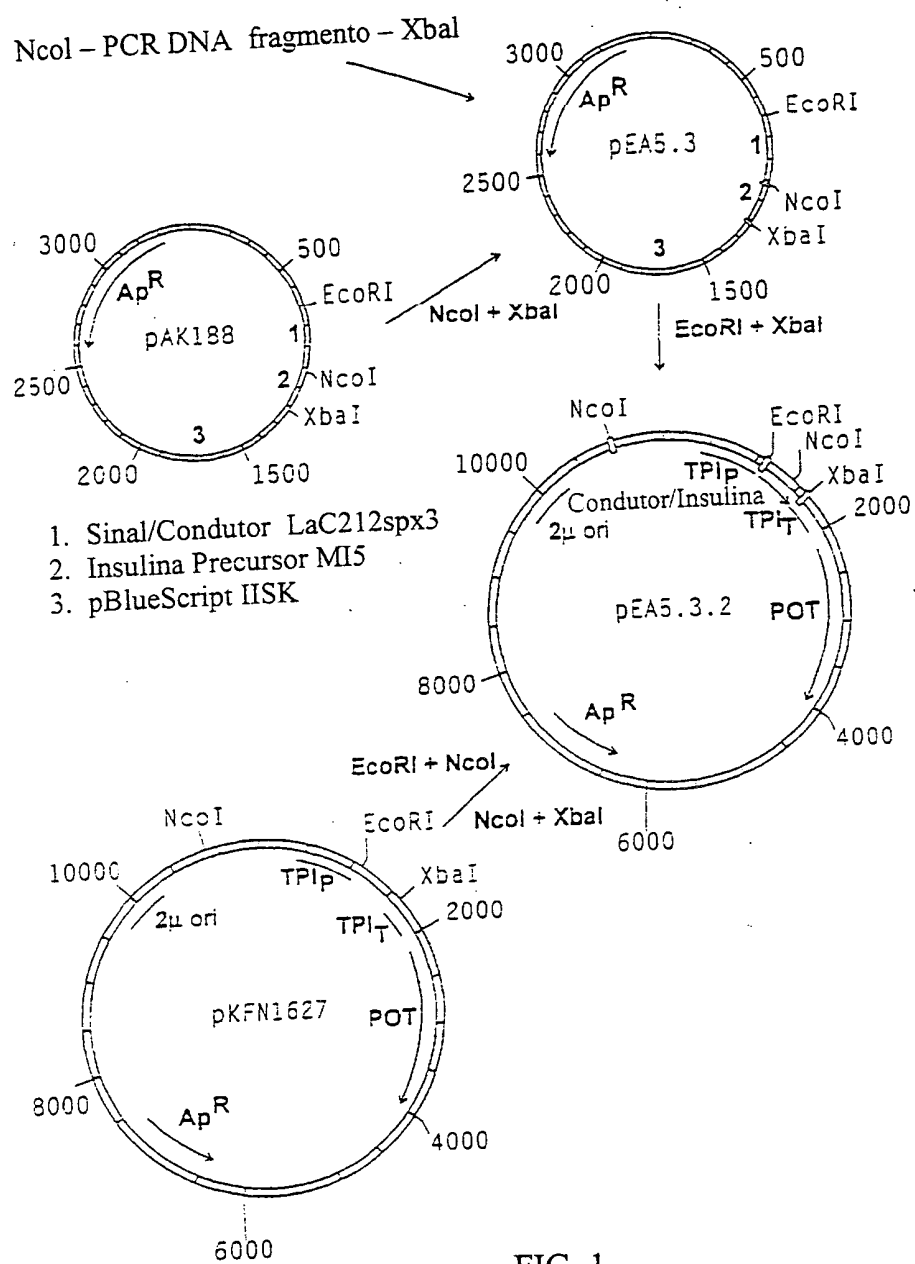


FIG. 1

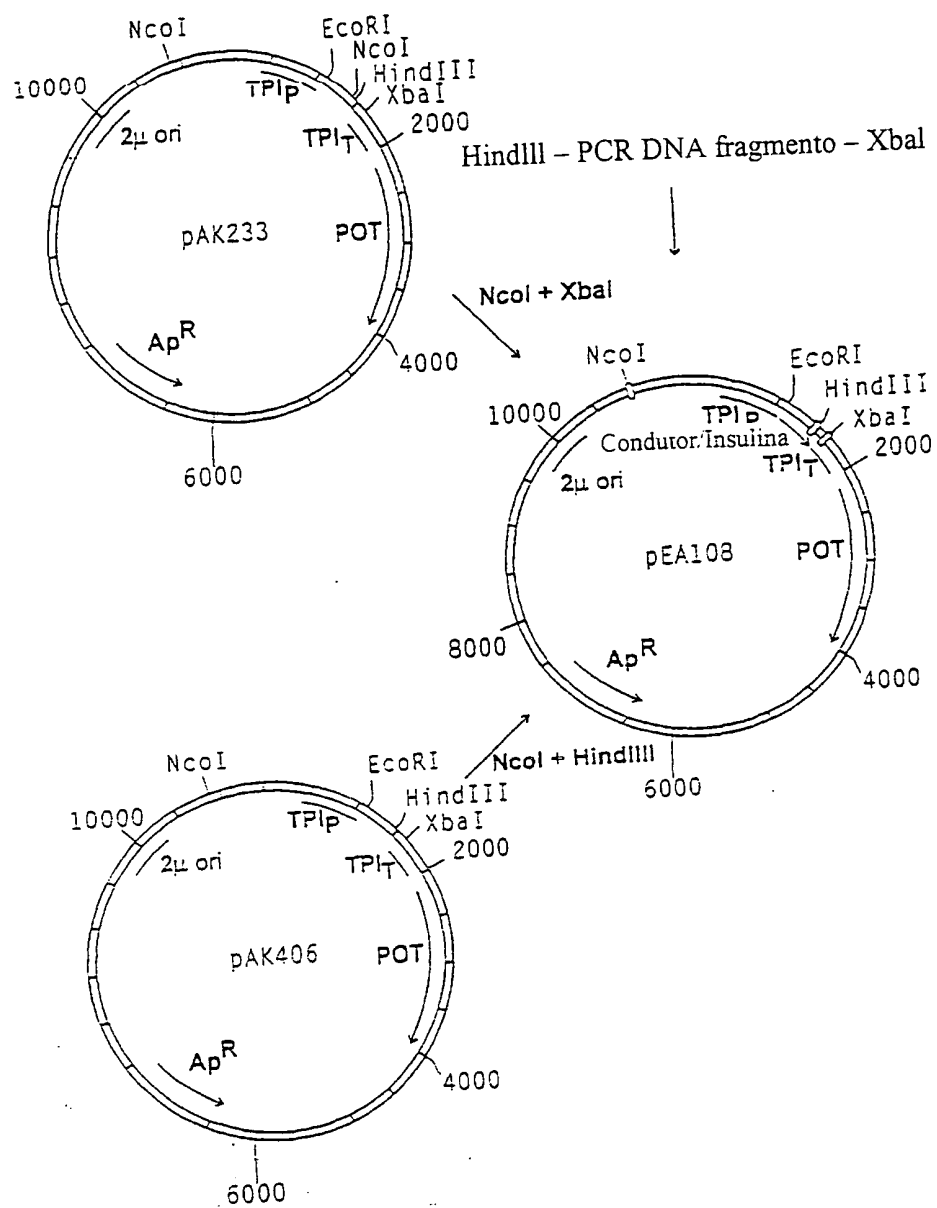


FIG. 2

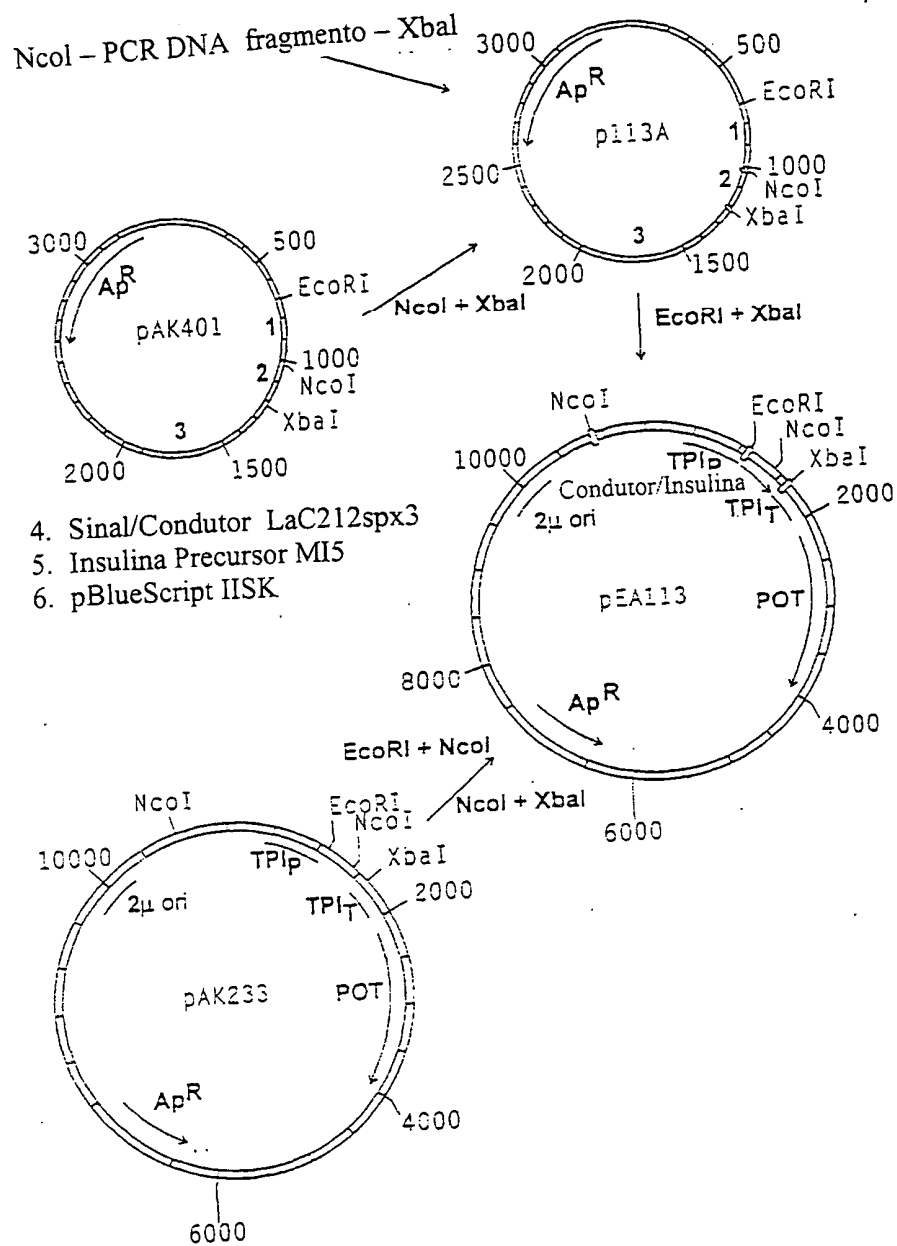


FIG. 3