

1702/95

KÖZZÉTETELI PÉLDÁNY



71583

60.821/SZE

KIVONAT

Inzulin-származékok

Eli Lilly and Company, INDIANAPOLIS, Indiana, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1993. 12. 15.

Elsőbbsége: 1992. 12. 18. (07/995,659)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US93/12237

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/14461

A jelen találmány tárgya egy humán inzulin analóg, amelyben a természetes humán inzulin B lánc 26-os pozíciójában levő tirozincsoportot alanin, glicin, valin, leucin, izoleucin vagy prolin helyettesíti. Ezt a molekulát a természetes humán inzulin A-lánca 21-es pozíciójában, valamint a természetes humán inzulin B-lánca 1-es és 3-as pozíciójában is módosítani lehet. Az említett inzulin analógok sokkal stabilabbak, és kevésbé hajlamosak a dimerizációra vagy az önmagukkal való asszociálódásra és nagy molekulasúlyú forma létrehozására, és ennél fogva hatásukat viszonylag gyorsabban fejtik ki, míg megtartják a természetes humán inzulin biológiai aktivitását.

Jell. 65-re. min.

Gwara



A

60.821/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-923

1762 / 95

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Inzulin-származékok

Eli Lilly and Company, INDIANAPOLIS, Indiana, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók: CHANCE Ronald Eugene, WESTFIELD, Indiana,

FAN Li,

LOMBARD, Illinois,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1993. 12. 15.

Elsőbbsége: 1992. 12. 18. (07/995,659)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US93/12237

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/14461

A jelen találmány tárgya a humán cukorbetegség kezelése. Pontosabban, a találmány tárgyát a humán inzulin molekula analógjai, ezeknek az analógoknak az alkalmazása és az ezeket az inzulin analógokat tartalmazó gyógyászati készítmények képezik.

A cukorbetegség egy anyagcsere rendellenesség, amit az jellemez, hogy a test szövetei nem képesek normális sebességgel oxidálni a szénhidrátokat. A cukorbeteg állapot egyik leglényegesebb jellemzője az inzulin hiánya. Az elmúlt 70 évben a cukorbetegségben szenvedő embereket nagy mértékben segítette, hogy ellenőrzött mennyiségű inzulint kaptak. Az 1980-as évek elejéig a cukorbetegség által használt inzulint állati hasnyálmirigyből izolálták, általában sertésekből és szarvasmarhákból. A rekombináns DNS technológia bevezetésével lehetségessé vált, hogy a humán inzulint, valamint a humán inzulin természetes és nem-természetes analógjait nagy mennyiségben előállítsák. Ezek az inzulin analógok a természetes humán inzulintól eltérő kémiai és fizikai tulajdonságokkal rendelkeznek.

A természetes humán inzulin egy tirozincsoportot tartalmaz a B-lánc 26-os pozíciójában. Ha ezt a tirozincsoportot alaninnal helyettesítjük, akkor egy analógot kapunk, az Ala(B26) humán inzulint, amelynek kisebb a hajlama arra, hogy oldatban önmagával asszociálódjon, mint a természetes humán inzulin. Ez az Ala(B26) humán inzulin analóg emellett stabilabb is, és hatása gyorsabban fellép mint a humán inzulin hatása. A B26-os csoportot lehet még glicinnel, valinnal, leucinnal, izoleucinnal és prolinnal helyettesíteni.

A jelen találmány tárgya egy humán inzulin analóg, amelyben a természetes humán inzulin B lánc 26-os pozíciójában levő tirozincsoportot alanin, glicin, valin, leucin, izoleucin vagy prolin helyettesíti. Ezt a molekulát a természetes humán inzulin A-lánc 21-es pozíciójában, valamint a természetes humán inzulin B-lánc 1-es és 3-as pozíciójában is módosítani lehet. Az említett inzulin analógok sokkal stabilab-

bak, és kevésbé hajlamosak a dimerizációra vagy az önmagukkal való asszociálódásra és nagy molekulásúlyú forma létrehozására, és ennél fogva hatásukat viszonylag gyorsabban fejtik ki, míg megtartják a természetes humán inzulin biológiai aktivitását.

A találmány tárgyát képezi a hiperglikémia kezelésére szolgáló eljárás, ami abban áll, hogy az ilyen kezelést igénylő betegnek a szabadalmaztatni kívánt analógokból hatásos mennyiséget adunk be. Emellett a találmány tárgyát képezik azok a gyógyászati készítmények is, amelyek a találmány szerinti inzulin analógból hatásos mennyiséget tartalmaznak, egy vagy több gyógyászati lag elfogadható töltőanyaggal kombinálva.

A jelen találmány leírásában az alábbi rövidítéseket és szakkifejezéseket használjuk.

Ala(B26)HI - humán inzulin analóg, amelyben a természetes humán inzulin 26-os pozíciójában levő tirozincsoportot alanin helyettesíti.

BHI - bioszintetikus humán inzulin.

Keresztkötés - diszulfidhidak létrejötte ciszteincsoportok között. Egy megfelelő keresztkötéseket tartalmazó humán inzulin vagy inzulin analóg három diszulfidhidat tartalmaz. Az első diszulfidhidat az A-lánc 6-os és 11-es pozícióiban levő ciszteincsoportok között találjuk. A második diszulfidhid az A-lánc 7-es pozíciójában levő ciszteint köti össze a B-lánc 7-es pozíciójában levő ciszteincsoporttal. A harmadik diszulfidhid az A lánc 20-as pozíciójában levő ciszteint köti össze a B-lánc 19-es pozíciójában levő ciszteinnel.

Gly(B26)HI - humán inzulin analóg, amelyben a természetes humán inzulin 26-os pozíciójában levő tirozincsoportot glicincsoport helyettesíti.

Ile(B26)HI - humán inzulin analóg, amelyben a természetes humán inzulin 26-os pozíciójában levő tirozincsoportot izoleucincsoport helyettesíti.

Leu(B26)HI - humán inzulin analóg, amelyben a természetes humán inzulin 26-os pozíciójában levő tirozincsoportot leucincsoport helyettesíti.

Pro(B26)HI - humán inzulin analóg, amelyben a természetes humán inzulin 26-os pozíciójában levő tirozincsoportot prolincsoport helyettesíti.

SEQ ID NO.1 - a szekvencialista első szekvenciája, amely a humán inzulin A-láncának analógja, szekvenciája az alábbi:

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

1 5 10 15

Leu Glu Asn Tyr Cys Xaa

20

aholis Xaa jelentése Asn, Asp, Glu, Gln, Ala, Gly vagy Ser.

SEQ ID NO.2 - a szekvencialista második szekvenciája, amely a humán inzulin B-láncának analógja, szekvenciája az alábbi:

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

1 5 10 15

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

20 25

aholis az 1-es pozícióban levő Xaa jelentése Phe vagy Asp, a 3-as pozícióban levő Xaa jelentése Asn vagy Asp, és a 26-os pozícióban levő Xaa jelentése Ala, Gly, Val, Leu, Ile vagy Pro.

Val(B26)HI - humán inzulin analóg, amelyben a természetes humán inzulin 26-os pozíciójában levő tirozincsoportot valincsoport helyettesíti.

Az ebben a leírásban használt összes aminosav rövidítést jóváhagyta az Amerikai Egyesült Államok Patent and Trademark Office [37 C.F.R. §1.822(b)(2) (1990)].



A jelen találmány tárgyát az alábbi képletű inzulin analógok képezik:

SEQ ID NO. 1

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

1 5 10 15

Asn Tyr Cys Xaa)

20

megfelelő keresztkötéssel összekötve a SEQ ID NO. 2-vel

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

1 5 10 15

Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Xaa Thr Pro Lys Thr)

20 25

vagy ezeknek gyógyászatilag elfogadható sói, amelyekben a SEQ ID NO. 1 (inzulin A lánc) 21-es pozíciójában levő Xaa jelentése Asn, Asp, Glu, Gln, Ala, Gly vagy Ser; a SEQ ID NO. 2 (inzulin B lánc) 21-es pozíciójában levő Xaa jelentése Phe vagy Asp; a SEQ ID NO. 2 (inzulin B lánc) 3-as pozíciójában levő Xaa jelentése Asn vagy Asp és a SEQ ID NO. 2 (inzulin B lánc) 26-os pozíciójában levő Xaa jelentése Ala, Gly, Val, Leu, Ile vagy Pro. A SEQ ID NO. 1 21-es pozíciójában levő Xaa jelentése előnyösen Gly, Ala, Ser vagy Asn. A B-lánc (SEQ ID NO. 2) 26-os pozíciójában levő aminosav előnyösen Ala és Gly, de legelőnyösebb, ha Ala. A 21-es pozícióban a legelőnyösebb aminosav az aszparagin. A jelen találmány szerinti egyik analógot úgy állíthatjuk elő, hogy a normális körülmények között az inzulin B-láncának (SEQ ID NO. 2) 1-es pozíciójában található aminosavat eltávolítjuk. A SEQ ID NO. 2 1-es pozíciójában legelőnyösebb, ha Phe található, míg a SEQ ID NO. 2 3-as pozíciójában legelőnyösebb, ha Asn található. A jelen találmány szerinti egyik legelőnyösebb inzulin analóg az, amelyben a SEQ ID NO. 1 21-es pozíciójában levő Xaa jelentése Asn, a SEQ ID NO. 2 1-es pozíciójában levő Xaa jelentése Phe, a SEQ ID NO. 2 3-

as pozíciójában levő Xaa jelentése Asn, és a SEQ ID NO. 2 26-os pozíciójában levő Xaa jelentése Ala. A szakterületen jártas szakember számára ismert standard biokémiai kifejezéssel élve a különösen előnyös analóg az Ala(B26) humán inzulin.

A jelen találmány szerinti inzulin analógoknak kisebb a hajlamuk arra, hogy dimerizálódjanak vagy egyéb módon önmagukkal asszociálódjanak magasabb molekulasúlyú formák képződése közben, akár olyan oldatban, amely tartalmaz cinket, akár olyan oldatban, amely cinkmentes. Mivel az analógok oldatban általában monomerek, ezért a hatás a beadás után gyorsan fellép.

Amint az előzőekben említettük, a találmány tárgyát az inzulin analógok gyógyászatilag elfogadható sói képezik. Előnyös sók a cink-, nátrium-, kálium-, magnézium- és kalciumsók, vagy ezeknek a sóknak a kombinációi.

A jelen találmány szerinti inzulin analógokat a számos ismert peptidszintézis technika bármelyikével elő lehet állítani, beleértve a klasszikus (oldatban végrehajtott) módszereket, a szilárd fázisú módszereket, félszintetikus módszereket és az újabban elérhetővé vált rekombináns DNS módszereket.

A szilárd fázisú technikában az aminosav szekvenciát szekvenciálisan építjük fel egy kiindulási, oldhatatlan, gyantához kötött C-terminális aminosavból kiindulva. A szilárd fázisú módszer technikáit J. Stewart és munkatársai közzétették [J. Stewart és mtsai.: Solid-Phase Peptide Synthesis, Freeman and Co., San Francisco (1969)].

A szilárd fázisú módszerben általában a keresett peptid C-terminális aminosavcsoportjának megfelelő aminosavat egy oldhatatlan hordozógyantára rögzítjük, majd a peptidláncot elkezdjük kialakítani, a gyantához kötött C-terminális aminosavnál kezdve. Az egyes aminosavakat azután egymás után adjuk a hosszabbodó lánchoz, addig, ameddig a kívánt aminosav szekvenciát megkapjuk. Egy másik módszer szerint kis peptidfragmenseket készítünk, majd a kívánt sorrendben bejut-

tatjuk a peptidláncba. A peptidlánc a szintézis során a gyantához kötve marad, és a lánc teljes elkészülte után a peptidet levágjuk a gyantáról.

A peptidláncot egy észterkötéssel kapcsoljuk a polisztirol gyantához, amely észterkötés a C-terminális egység és a hordozógyantán levő specifikus metilénecsoporthoz jön létre. A metilénecsoporthoz az ilyen kötések kialakítása céljából került a gyantára.

Az aminosavakat a szakterületen a peptidkötések kialakítására jól ismert technikák alkalmazásával alakítjuk ki. Az egyik módszer szerint az aminosavból egy származékot készítünk, amely a karboxilcsoportot érzékenyebbé teszi a peptidfragmenten levő szabad N-terminális aminocsoporttal való reakcióra. Például az aminosavat átalakíthatjuk egy kevert anhidriddé, oly módon, hogy a védett aminosavat etil kloroformáttal vagy izobutil kloroformáttal reagáltatjuk. Egy másik módszer szerint az aminosavat aktív észterré lehet átalakítani, azaz például 4,5-triklórfenil észterré, pentaklórfenil észterré, p-nitrofenil észterré, N-hidroxiszukcinimid észterré, vagy egy 1-hidroxibenzotriazollal képezett észterré.

Egy másik kapcsolási módszer szerint egy megfelelő kapcsoló ágenszt használunk, azaz például N,N'-diciklohexilkarbodiimidet (DCC) vagy N,N'-diizopropilkarboxidiimidet (DIC). Egyéb megfelelő kapcsoló ágensek ismertek a szakterületen jártas szakember számára [Schroder és Mutsaers.: The Peptides, Academic Press, III. fejezet (1965)]. Az említett publikációt a továbbiakban referenciaként kezeljük.

Az nyilvánvaló, hogy a peptidszintézisben alkalmazott minden egyes aminosav α -aminocsoportját meg kell védeni a kapcsolási reakció során, hogy megakadályozzuk a reakcióképes α -amino funkciók mellékreakcióit. Az is nyilvánvaló, hogy bizonyos aminosavak tartalmaznak reaktív oldallánc funkciók csoportokat (például szulfhidril, ϵ -amino, β - és γ -karboxil, imidazol, guanido és hidroxil), és ezeket

a funkciós csoportokat is meg kell védeni mind a kiindulási, mind az azt követő kapcsolási lépésekben. A megfelelő kapcsoló csoportok ismertek a szakterületen [Protective Groups In Organic Chemistry, M. McOmie, szerk., Plenum Press, NY (1973); 4,617,149 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom], amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezeljük.

Egy megfelelő védőcsoport kiválasztása során bizonyos feltételeknek eleget kell tenni. Egy α -amino védőcsoportnak a következő tulajdonságokkal kell rendelkeznie: (1) az α -amino funkciót reakcióképtelenné kell tennie, a kapcsolási reakcióban alkalmazott körülmények között, (2) könnyen eltávolíthatónak kell lennie a kapcsolási reakció lejátszódása után, olyan körülmények között, amelyek között az oldallánc védőcsoportok nem válnak le, és a peptidfragmens szerkezete nem változik, és (3) meg kell szüntetni az aktiválás utáni racemizáció lehetőségét, közvetlenül a kapcsolás előtt. Egy oldallánc védőcsoportnak a következő tulajdonságokkal kell rendelkeznie: (1) az oldallánc funkciós csoportját reakcióképtelenné kell tennie a kapcsolási reakcióban alkalmazott körülmények között, (2) stabilnak kell lennie az α -amino védőcsoport eltávolítására alkalmazott körülmények között, és (3) a kívánt aminosav szekvencia elkészülte után könnyen eltávolíthatónak kell lennie olyan reakciókörülmények között, amelyek nem változtatják meg a peptidlánc szerkezetét.

A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a peptidszintézis során hasznosnak megismert védőcsoportok reakcióképessége változik az eltávolításukra használt égenséktől függően. Például bizonyos védőcsoportok, úgymint a trifenil metil és 2-(p-bifenilil)izopropiloxikarbonil csoportok nagyon labilisak és gyenge savas körülmények között lehasíthatók. Más védőcsoportok, mint például a t-butiloxikarbonil-, t-amiloxikarbonil-, adamantiloxikarbonil- és p-metiloxikarbonil csoportok kevésbé labilisak és eltávolításukhoz közepes erősségű savakra, mint például trifluoecetsavra, sósavra vagy bórt trifluoridra van szükség ecetsavban. Egyéb védő-

csoportok, mint például a benziloxikarbonil-, halobenziloxikarbonil-, p-nitrobenziloxikarbonil-, cikloalkiloxikarbonil- és izopropiloxikarbonil csoportok még kevésbé labilisak és erősebb savakra, mint például hidrogénfluoridra, hidrogénbromidra vagy bór trifluoracetátra van szükség az eltávolításukra.

A kívánt peptidszekvencia elkészítése után a védett peptidet le kell hasítani a hordozógyantáról, majd az összes védőcsoportot el kell távolítani. A hasítási reakciót és a védőcsoportok eltávolítását egyszerre, vagy lépésenként végezhetjük. Ha a hordozógyanta klórmetilezett polisztirol gyanta, akkor a peptidet a gyantához rögzítő kötés egy észterkötés, amely a C-terminális egység szabad karboxilcsoportja és a hordozógyantán levő számos klórmetil csoport között jön létre. Az nyilvánvaló, hogy a rögzítő kötetést olyan reagensekkel lehet eltávolítani, amelyekről ismert, hogy képesek felbontani egy észterkötést és képesek behatolni a hordozógyantába. Az egyik különösen kényelmes módszer, ha folyékony vízmentes hidrogénfluoridot használunk. Ez a reagens nemcsak lehasítja a peptidet a gyantáról, hanem az összes védőcsoportot is eltávolítja. Tehát ha ezt a reagenst használjuk, akkor közvetlenül a teljesen védőcsoportmentesített peptidet kapjuk. Ha arra van szükség, hogy a peptidet anélkül hasítsuk le, hogy a védőcsoportot eltávolítsunk, akkor a védett peptid-gyanta metanolízisen eshet át, és így olyan védett peptidet kaphatunk, amelyben a C-terminális karboxilcsoport metilezve van. A metilésztert azután hidrolizálhatjuk gyenge lúgos körülmények között, és így kaphatjuk a szabad C-terminális karboxilcsoportot. A peptidláncon levő védőcsoportokat azután el lehet távolítani erős savval, mint például folyékony hidrogénfluoriddal kezelve a molekulát. A metanolízisre egy különösen hasznos technikát írtak le Moore és munkatársai [Moore és mtsai.: Peptide, Proc. 5th Amer. Pept. Symp., 518-521. old., M. Goodman és J. Meienhofer, szerk., John Wiley, NY. (1977)], amely szerint a védett peptid-gyantát metanollal és káliumcianiddal kezeljük koronaéter jelenlétében.

A védett peptidnek a gyantáról való lehasítására szolgáló másik módszer az ammonolízis vagy hidrazinkezelés. Ha szükséges, akkor a keletkező C-terminális amidot vagy hidrazidot elhidrolizálhatjuk a szabad C-terminális karboxilcsoporttá, és a védőcsoportokat a szokványos módszerekkel távolíthatjuk el.

Az is nyilvánvaló, hogy az N-terminális α -aminocsoporton levő védőcsoportot preferenciálisan távolíthatjuk el, a védett peptidnek a hordozógyantáról való eltávolítása előtt, vagy azzal egyidőben.

A jelen találmány szerinti inzulin analógok A és B láncait rekombináns DNS technikával is előállíthatjuk. Előállításuk során egy olyan nukleotid szekvenciát készítünk, amely az A és B lánc peptidjeit kódolja, az ilyen szintézisnek ma már rutinszerűnek számító módszereivel. Ezek a módszerek általában abból állnak, hogy olyan oligonukleotidokat készítünk, amelyek mind a keresett kódoló szekvencia, mind az annak megfelelő komplementer szekvencia fragmenseit kódolják. Az oligonukleotidokat úgy tervezzük meg, hogy a kódoló szekvencia egyik fragmense átfedjen a komplementer szekvencia két fragmensével, és fordítva. Az oligonukleotidokat egymáshoz illesztjük majd kapcsoljuk, végül így kapjuk meg a kívánt génszekvenciát.

A szekvenciát olyan pontban építjük be egy klónozó vektorba, amely lehetővé teszi, hogy a szekvencia által kódolt peptidtermék expresszáljon. A proinzulin és inzulin analógok expresszáására képes plazmidok készítését Chance és munkatársai írták le [Chance és mtsai.: European Patent Publication No 0 383 472 (1990. augusztus 22.)], amely publikációt a továbbiakban referenciának tekintünk.

A találmány szerinti inzulin analógok A és B láncait proinzulinszerű molekulákon keresztül is előállíthatjuk, rekombináns DNS technika alkalmazásával [Frank és mtsai.: Peptides: Synthesis-Structure-Function, Proc. Seventh Am. Pept. Symp.,

szerk.: D. Rich és E. Gross (1981)] amely publikációt a továbbiakban referenciának tekintünk.

Az egyes, bármilyen módon előállított A és B láncok kombinálásának lépéseit Chance és munkatársai leírása szerint hajthatjuk végre [Chance és mtsai.: Peptides: Synthesis-Structure-Function, Proc. Seventh Am. Pept. Symp., szerk.: D. Rich és E. Gross (1981)] amely publikációt a továbbiakban referenciának tekintünk.

Az alábbi példákat a jelen találmány illusztrálása céljából adjuk meg, és nem tekinthetők a találmány oltalmi köre korlátozásának.

1. Példa

Ala (B26) humán inzulin

A címben szereplő inzulin analógot enzimes félszintézis módszerrel állítjuk elő (reverz proteolízis), dezpentapeptid (B26-30) humán inzulin és szintetikus Ala-Thr-Pro-Lys-Thr pentapeptid felhasználásával. A pentapeptidet szilárd fázisú peptidszintézissel állítjuk elő, míg a dezpentapeptid humán inzulin bioszintetikus humán inzulinból származik (Eli Lilly and Company, Indianapolis), pepszin hidrolízis reakcióval, amely a 26-30-as szekvenciát távolítja el, lényegében Gattner és munkatársai leírása szerint [Gattner és mtsai.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 356, 1397-1404 (1975)].

A peptidet vagy egy ABI 430A szintetizátorral vagy egy ACT I Model szintetizátorral szintetizáljuk. A t-Boc-Thr(Bzl)OCH₂-PAM gyantát, valamint a t-Boc-aminosavakat és a peptidszintézishez használt előrecsomagolt reagenseket az Applied Biosystems Inc.-től vásároljuk. A pentapeptideket a szokásos HF hasítással távolítjuk el a gyantáról. A hasítást 90%-os HF és 10%-os m-krezol elegyével véghez-
 zük 0 °C-on 1 óra hosszat, majd a HF-ot csökkentett nyomáson eltávolítjuk. A

peptidet azonnal kicsapjuk hideg vízmentes éterrel, majd többször mossuk hideg vízmentes éterrel, végül 10%-os ecetsavban oldjuk és liofilezzük.

A címben szereplő inzulin analóg előállításához 400 mg dezpentapeptid humán inzulint és 730 mg szintetikus Ala-Thr-Pro-Lys-Thr pentapeptidet elegyítünk 36 ml 85% 1,4-butándiol és 15% 1 mol/l koncentrációjú TRIS összetételű oldatban, majd a pH-t tömény sósavval 7,0-7,1-re állítjuk. 40 mg kimotripsint oldunk 400 µl 0,01 mol/l sósavban, mielőtt a fehérjeoldathoz adjuk. A kapcsolási reakciót 4,5 óra hosszat 25 °C-on tartjuk és fordított fázisú HPLC-vel követjük, majd a reakciót 10 térfogat mélyhűtött acetonnal állítjuk le. A csapadékot centrifugálással nyerjük ki, éterrel mossuk, 25 ml 10%-os ecetsavban oldjuk, amely elegendő guanidin-HCl-t tartalmaz ahhoz, hogy oldatban tartsa az anyagot, majd egy Sephadex G50 (Superfine, 5 X 00 cm) oszlopra visszük és 1 mol/l koncentrációjú ecetsavval eluáljuk 4 °C-on. A kívánt frakciókat egyesítjük, majd fordított fázisú HPLC oszlopra visszük (Zorbax C8 (2,12x25 cm)), és 45-70%-os lineáris B puffergradienssel oldjuk le 760 perc alatt, 2,5 ml/perc sebességgel. Az elúciós pufferek a következők: A puffer, amelynek összetétele 0,1 mol/l NaH₂PO₄, pH=2,1; és B puffer, amelynek összetétele 50% A puffer és 50% CH₃CN. A további tisztítást Vydac C18 oszlopon végezzük (2,12x25 cm), az eluáló puffer összetétele pedig 45-70%-os lineáris B puffer, 25 ml/perc. A mozgófázis 0,1% TFA-t tartalmaz A pufferként és 0,1% TFA/50% CH₃CN összetételű oldatot B pufferként. Végezetül 38 mg liofilezett fehérjét kapunk, és ezt különböző elemzéseknek vetjük alá. A gyorsatombombázásos tömegspektrometria (FAB/MS) eredményei alapján a molekulásúlya 5715,6 (várt: 5715,4). Az aminosavösszetétel az alábbi, aszparaginsavat használva moláris egységként (az elméleti aminosav arányok zárójelben láthatók): Asp 3,00 (3); Thr 2,89 (3); Ser 2,75 (3); Glu 7,24 (7); Pro 1,06 (1); Gly 4,00 (4); Ala 2,00 (2); Cys 5,24 (6); Val 3,36 (4); Ile 1,41 (2); Leu 6,1 (6); Tyr 2,83 (3); Phe 2,87 (3); His 2,22 (2); Lys 0,99 (1); Arg 1,00 (1).

A jelen találmány szerinti egyéb analógokat lényegében ugyanúgy állítjuk elő mint ahogy az előzőkben ismertettük. Kiindulási anyagként a Gly-Thr-Pro-Lys-Thr pentapeptidet használva a Gly(B26)HI inzulin analógot állítottuk elő. Kiindulási anyagként a Val-Thr-Pro-Lys-Thr pentapeptidet használva a Val(B26)HI inzulin analógot állítjuk elő. Kiindulási anyagként a Leu-Thr-Pro-Lys-Thr pentapeptidet használva a Leu(B26)HI inzulin analógot állítjuk elő. Kiindulási anyagként az Ile-Thr-Pro-Lys-Thr pentapeptidet használva az Ile(B26)HI inzulin analógot állítjuk elő. Kiindulási anyagként a Pro-Thr-Pro-Lys-Thr pentapeptidet használva a Pro(B26)HI inzulin analógot állítjuk elő. Az egyes analógok vizsgálata azt mutatja, hogy ezek a vegyületek jól használható, gyorsan ható inzulin analógok.

2. Példa

Méretkizárásos HPLC

Különböző koncentrációjú Ala(B26)HI-t kromatografálunk DuPont Zorbax GF-250 (0,94x25 cm) oszlopon, az eluáláshoz használt mozgófázis összetétele 0,2 mol/l NaCl, 20 mmol/l Na₂HPO₄ és 0,01% NaN₃ (pH=7,5). Az oszlopot 1 ml/perc sebességgel eluáljuk 4 °C-on. A disztribúciós koefficiens (K_d) a molekula átlagos sugarától függ. A $K_d = (V_e - V_o) / (V_i - V_o)$ egyenletben V_e jelentése a minta elúciós térfogata, V_o jelentése a kizárási térfogat, amit Blue Dextran elúciójával lehet meghatározni, V_i jelentése az inklúziós térfogat, amit DL-ditiotreitol elúciójával lehet meghatározni. Az inzulin disztribúciós koefficiense (K_d) jelentősen lecsökken ha nő az inzulin koncentrációja, ami azt mutatja, hogy az inzulin nagyobb koncentrációban aggregációra hajlamos. Ha az inzulin B26 tirozincsoportját alaninnal helyettesítjük, akkor egy olyan inzulin analógot kapunk, amely bizonyos körülmények között láthatóan képes eliminálni az aggregációt, és így koncentrációfüggetlen K_d-t eredményez.

3. Példa

Egyensúlyi denaturáció

Az egyensúlyi denaturációs kísérleteket Brems és munkatársai leírása szerint végezzük [Brems és mtsai.: Biochemistry 29, 9289-9293 (1990)], amely publikációra a továbbiakban referenciaként hivatkozunk. Az egyensúlyi denaturációt távoli UV cirkuláris dikroizmus alapján határozzuk meg, növekvő guanidin koncentráció mellett. Az Ala(B26)HI denaturációs átmenete 3,3 mol/l GdnHCl értéknél kezdődik. A természetes szerkezet megszűnésének szabadenergiája (ΔG) 4,5 kcal/mol az Ala(B26)HI esetében, ami ugyanaz az érték, mint a BHI esetében. A középérték GdnHCl koncentrációja ((denaturált)/(természetes)=1) 5,3 mol/l az Ala(B26)HI esetében, a Brems és munkatársai által a humán inzulinra korábban meghatározott 5,0 mol/l-rel szemben [Brems és mtsai.: Journal of Biological Chemistry 66, 1611-1615 (1991)].

4. Példa

Egyensúlyi ultracentrifugálás

Az inzulin aggregációs tulajdonságait ülepitési egyensúlyi ultracentrifugálással határozzuk meg. Az egyes analógok asszociációs állapotát a Pekar és munkatársai alapján meghatározott technikával határozzuk meg [Pekar és mtsai.: Biochemistry 11, 4013-4016 (1972)], amely publikációt a továbbiakban referenciának tekintünk. A fehérjéket 50 mmol/l nátrium-klorid-50 mmol/l nátrium-foszfát pufferelegyenben oldjuk, pH-ját 7,2-re állítjuk. A fehérjekoncentrációkat Aviv 14 DS spektrofotométerrel határozzuk meg (Lakewood, N.J.). Mg/ml alapon a BHI extinkciós koefficiense 1,05, míg az Ala(B26)HI extinkciós koefficiense 0,800. A BHI monomer molekulásúlya 5808 a BHI esetében, míg az Ala(B26)HI esetében 5716. Az oldatok egy részéhez cinket adunk egy ZnCl₂ törzsoldatból, amelynek a koncentrációját atomspektroszkópiával határozzuk meg. A cink és a fehérje molaránya mindig 0,5. Az ülepitési egyensúlyi

kísérleteket 22 °C-on végezzük egy Spinco Model E analitikai ultracentrifugával, hatlukas titánrotort és fotoelektromos pásztázó abszorpciós optikai rendszert használva. Nagysebességű technikákat használtunk, úgy hogy az egyensúlyt elértük, mielőtt az egyensúlyi pásztázást 5 óra elteltével megkezdjük. Standard 12 mm-es középdarabokat használtunk a hígabb oldatokhoz és rendelésre készített 3 mm-es szénnel töltött epon középdarabokat használtunk a töményített oldatokhoz. Az ülepedést ideálisnak tekintettük, a különböző sugarak súlyozott átlagos molekulásúlyait az alábbi kifejezés alapján számítottuk:

$$M_w = RT / (1 - v_p) w^2 \cdot 1/r \cdot 1/c \cdot dC/dr$$

ahol R jelentése a gázállandó, T jelentése az abszolút hőmérséklet, W jelentése a sebesség, r jelentése a sugár, C jelentése a koncentráció és p jelentése az oldószer sűrűsége. Az Ala(B26)HI-ről feltételezzük, hogy ugyanazzal a részleges specifikus térfogatattal rendelkezik mint a BHI, nevezetesen az érték 0,73 ml/g. A súlyozott átlagos molekulásúlyt a monomer molekulásúlyával osztjuk, és a fehérje teljes koncentrációjához viszonyítjuk. Az Ala(B26)HI kisebb hajlamot mutat az önmagával való asszociálódásra mint a BHI. Például 3,5 mg/ml koncentráció (vagy 100 egység/ml) mellett az inzulin átlagos molekulásúlya körülbelül 6,5-szer magasabb a monomer molekulásúlyánál. Az Ala(B26)HI súlyozott átlagos molekulásúlya körülbelül 3,2-szer magasabb értéket mutatott a monomer átlagos molekulásúlyánál. 0,5 mól cink per mól fehérje jelenlétében az inzulin főleg hexamer formában fordul elő, 0,5 mg/ml mellett. Ezzel szemben az Ala(B26)HI kevésbé asszociálódik. Ahogy a fehérje koncentrációja nő, az Ala(B26)HI hexamernél magasabb formát vesz fel a molekulásúly alapján.

5. Példa

Receptorkötés

A jelen találmány szerinti inzulin analógok fiziológiás hatását az alábbi *in vitro* receptorkötési vizsgálatban mutatjuk ki. A humán placentamembrán készítését és a kötési vizsgálatot a Gruppuso és munkatársai által ismertetett módosított eljárással végezzük el [Gruppuso és mtsai.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 67, 194-197 (1988)], amely publikációt a továbbiakban referenciának tekintjük. Az eljárás során 30-50 µg humán placentamembrán fehérjét inkubálunk körülbelül 10 fmol ¹²⁵I-inzulinnal és különböző koncentrációjú jelzetlen inzulinnal vagy analógokkal 500 µl végtérfogatban, 100 mmol/l HEPES (pH=7,8), 120 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 1,2 mmol/l MgSO₄, 8 mmol/l glükóz és 0,25% BSA összetételű pufferben, 18 órán át 4 °C-on.

A membránokat cell harvestert (Skatron, Lier, Norvégia) használva üvegszűrőlapokon nyerjük ki, amelyeket 0,1% polietiléniminnel előkezeltünk. A kötési adatokat úgy elemezzük, hogy a leszorítási görbéket egy négyparaméteres modellhez illesztjük, Prefit/Allfit eljárást használva az EC₅₀ értékek (az a dózis, amely a maximális kötés felének leszorításához szükséges) meghatározásához. Négy kísérlet adatai azt mutatják, hogy a humán inzulin EC₅₀ értéke $0,34 \pm 0,05$ nmol, míg az Ala(B26)HI EC₅₀ értéke $0,39 \pm 0,02$ nmol, ami azt jelenti, hogy az inzulin potenciáljának 89%-át éri el.

6. Példa

Állati tesztek

A jelen találmány szerinti inzulin analóg fiziológiai hatásait az alábbi *in vivo* rendszerekben igazoljuk.

Normál hím Sprague Dawley patkányokat (Charles River Laboratories (Portage, MI) használunk vizsgálati állatként. 160-180 grammos testsúlyban kapjuk

őket, majd egy hétig állatszállóban tartjuk, 23 °C-on, szabályozott megvilágítási ciklust alkalmazva (világítás reggel 7-től este 7-ig). Az állatokat Purina 5001 patkánytáppal etetjük, tetszőleges mennyiségben. Az egyes vizsgálatokban használt állatokat felhasználás előtt 16 óra hosszat éheztetjük. Az első felhasználás idején testsúlyuk 200 gramm. 275 grammos testsúly elérése után (körülbelül három hét alatt) az állatokat nem használjuk. Öt kontroll állatot és öt kísérleti állatot használunk a vizsgálatban. A fehérjét 0,05 mol/l sósavban oldjuk (pH=1,6), így kapunk egy 100 µg/ml koncentrációjú törzsoldatot. Ebből hígítást készítünk normál sóoldatban, amit szubkután injekciózunk a patkányokba. 100 µl-es vérmintát veszünk az egyes patkányok farokvénájából nulla időpontban, majd a kezelés után 30 perc, 1 óra, 2 óra, 3 óra és 4 óra elteltével. A glükózt a glükózoxidáz módszerrel (Sigma Chemical Co.) határozzuk meg. Az egyes patkányoknál kiszámítjuk a vér glükóztartalmának a nulla időponthoz viszonyított százalékos eltérését, majd a végeredményeket átlagos százalékos változás $\pm$ SEM formában adjuk meg a kísérleti csoportra, korrigálva a kontrollcsoportra aznap mért átlagos változásra.

Dózis-válasz görbéket készítünk a vizsgált vegyület különböző koncentrációjával végzett vizsgálatok eredményeiből, az egyes dózisoknál a glükóz százalékos változását ábrázolva a glükózkoncentráció mélypontjánál. Ebből a görbéből meghatározunk egy ED50 értéket, mint azt a szubkután fehérjedózist (µg/kg), amely a maximális hipoglikémiás válasz felét adja. A humán inzulin ED50 értéke $7,8 \pm 0,1$ (n=3), míg az Ala(B26)HI ED50 értéke $8,9 \pm 0,7$ (n=2), ami azt jelenti, hogy az inzulin potenciáljának 88%-át éri el.

A sertés modellen végzett vizsgálatok azt is igazolják, hogy az Ala(B26)HI analóg jól használható gyorsan ható inzulinként. A humán inzulinnal összehasonlítva

a szubkután injekció után 40-60 perc alatt körülbelül kétszer annyi Ala(B26)HI abszorbeálódik.

Amint az előzőkben megjegyeztük, a jelen találmány szerinti inzulin analógoknak kisebb a hajlamuk a dimerizálódásra vagy az önmagukkal egyéb módon való asszociálódásra, és így nagyobb molekulasúlyú formák kialakítására. Tehát egy vagy több említett analóg beadásával az aktivitás gyors fellépése érhető el. A jelen találmány szerinti inzulin analógok hatékonyak a hiperglikémia kezelésében, ha egy ilyen kezelést igénylő betegnek egy inzulin analógból (amely a B-lánc 26-os pozíciójában egy alanincsoportot tartalmaz) hatásos mennyiséget adunk be. Ez a mennyiség általában 10 és 60 egység per nap között változik (azaz körülbelül 0,3 - 2 mg, feltételezve hogy az anyag aktivitása 29 egység per mg). Arra azonban fel kell hívunk a figyelmet, hogy az éppen beadott inzulin analóg mennyiségét egy orvosnak kell meghatározni, a megfelelő körülmények fényében, beleértve a kezelendő állapotot (azaz a hiperglikémia oka), az éppen beadott analógot, a beadás választott parenterális útját, az adott beteg testsúlyát és reakcióját, valamint a beteg tüneteinek súlyosságát. Ennélfogva a fenti dózistartományok nem tekinthetők a találmány oldalmi köre korlátozásának.

A találmány szerinti inzulin analógokat az ilyen kezelésre szoruló betegeknek (azaz hiperglikémiában szenvedő betegnek) olyan gyógyászati készítmény formájában adjuk be, amely legalább egy, a B-lánc 26-os pozíciójában alanint tartalmazó inzulin analógból hatásos mennyiséget tartalmaz, egy vagy több gyógyászatilag elfogadható hordozó- vagy töltőanyaggal kombinálva. Ezekre a célokra a gyógyászati készítményeket általában úgy formulázhatjuk, hogy milliliterenként körülbelül 100 egységet tartalmazzanak, illetve hasonló koncentrációjuk legyen, inzulin analóg(ok) hatásos mennyiségéből. Ezek a készítmények általában, de nem szükségszerűen parenterális természetűek, és számos különböző technikával előállíthatók, a szakte-

rületen a parenterális termékek készítésében jól ismert szokványos töltő- és hordozóanyagok alkalmazásával [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. kiadás, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA (1985)], amely publikációt a továbbiakban referenciának tekintünk. Például a parenterális beadáshoz való dózisformákat úgy állíthatjuk elő, hogy legalább egy inzulin analógból, amelynek a B-lánca 26-os pozíciójában alanincsoport van, a kívánt mennyiséget szuszpendáljuk vagy oldjuk egy nem-toxikus folyadékhordozóban, amely alkalmas injekciózásra, azaz például vizes közegben, majd a szuszpenziót vagy oldatot sterilezzük. Egy kísérő ampullát vagy hordozót adhatunk hozzá a beadás előtti összekeverés céljából. A parenterális beadáshoz adaptált gyógyászati készítmények hígítószerkeket, töltőanyagokat és hordozókat, mint például vizet és vízzel elegyedő szerves oldószereket, azaz például glicerint, szezámolajat, földimogyoró olajat, vizes propilénglikolt, N,N'-dimetilformamidot és hasonlókat tartalmaznak. Az ilyen gyógyászati készítmények lehetnek a B-lánc 26-os pozíciójában alanincsoportot tartalmazó inzulin analóg steril, izotóniás vizes sóoldatai, amiket egy gyógyászatilag elfogadható pufferrel lehet pufferelni, és amelyek pirogénmentesek. Emellett a parenterális gyógyászati készítmények tartalmazhatnak tartósítószerkeket, mint például fenolt vagy meta-krezolt. A végtermék pH-jának beállításához például nátrium-hidroxidot vagy sósavat használhatunk.

A jelen találmány szerinti inzulin analógokat gyógyászati készítményekké lehet formulázni, amelyek alkalmasak az intranazális beadásra. Az ilyen készítményeket részletesen a 0200383 A3 számú European Patent Application-ban írják le, amelyet a továbbiakban referenciának tekintünk. Röviden, az ilyen készítményeket egy vagy több gyógyászatilag elfogadható hígítószerrel, gyógyászatilag elfogadható mennyiségű alkálifémsóval, egy lényegében cinkmentes inzulin szabad savának az ammóniumsójával, adott esetben legalább egy abszorpciót fokozó ágensből, amelyet a következő csoportból választhatunk: (1) olajsav illetve annak az

észtere vagy sója, (2) folyadékformájú szorbitán zsírsavészter, (3) egy szorbitán zsírsavészternek egy folyadékformájú polioxietilén származéka, és (4) egy folyadékformájú hidroxipolioxietilén-polioxipropilén-polioxietilén-kopolimer, az abszorpciót fokozó mennyiséggel formulázzuk.

SZEKVENCIA LISTA

(1) Általános információk:

(i) A találmány bejelentője: Chance és munkatársai

(ii) A találmány címe: Inzulinanalógok

(iii) A szekvenciák száma: 2

(iv) Levelezési cím:

(A) Cím: Eli Lilly and Company

Patent division/DKN

(B) Utca: Lilly Corporate Center

(C) Város: Indianapolis

(D) Állam: Indiana

(E) Ország: USA

(F) Irányítószám: 46285

(v) Számítógéppel olvasható forma:

(A) Adathordozó fajtája: Floppilemez, 3,5", 1Mb

(B) Számítógép: Macintosh

(C) Operációs rendszer: Macintosh

(D) Szoftver: Microsoft Word

(vi) Jelenlegi bejelentési adatok:

(A) A bejelentés száma:

(B) A benyújtás dátuma:

(C) Osztályozás:

(vii) A korábbi bejelentés adatai:

(A) A bejelentés száma:

(B) A bejelentés időpontja:

(viii) Ügyvivői/ügynöki információk:

(A) Név: Douglas K. Normar

(B) Bejegyzés száma: 33267

(C) Referencia/akta száma: X8667

(ix) Telekommunikációs információ:

(A) Telefon: 317-276-2958

(B) Telefax: 317-276-1294

(2) Információk a SEQ ID NO. 1-ről:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 21 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus:

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: polipeptid

(ix) Jellemzők:

(A) Név/kulcs: Variábilis hely

(B) Hely: 21

(C) Azonosítási módszer:

(D) Egyéb információk: "Ez az aminosav Asn, Asp, Glu, Gln, Ala, Gly
vagy Ser."

(xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO. 1:

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

1 5 10 15

Leu Glu Asn Tyr Cys Xaa

20

(2) Információk a SEQ ID NO. 2-ről:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 30 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: polipeptid

(ix) Tulajdonságok:

(A) Név/kulcs: Variábilis hely

(B) Hely: 1

(C) Azonosítási módszer:

(D) Egyéb információ: "Ez az aminosav vagy Phe vagy Asp."

(ix) Tulajdonságok:

(A) Név/kulcs: Variábilis hely

(B) Hely: 3

(C) Azonosítási módszer:

(D) Egyéb információ: "Ez az aminosav vagy Asn vagy Asp."

(ix) Tulajdonságok:

(A) Név/kulcs: Variábilis hely

(B) Hely: 26

(C) Azonosítási módszer:

(D) Egyéb információ: "Ez az aminosav Ala, Gly, Val, Leu, Ile vagy
Pro."

(xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO. 2:

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

1

5

10

15

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

20

25

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy inzulin analóg, amelynek képlete SEQ ID NO.1 megfelelően keresztötésekkel összekötve a SEQ ID NO.2-vel, vagy ennek egy gyógyászatilag elfogadható sója, azzal jellemezve, hogy a SEQ ID NO.1 21-es pozíciójában levő Xaa jelentése az alábbi csoportból választható aminosav: Asn, Asp, Glu, Gln, Ala, Gly vagy Ser, a SEQ ID NO.1 1-es pozíciójában levő Xaa jelentése Asp vagy Phe, a SEQ ID NO. 2 3-as pozíciójában levő Xaa jelentése Asp vagy Asn, és a SEQ ID NO. 2 26-os pozíciójában levő Xaa jelentése az alábbi csoportból választható aminosav: Ala, Gly, Val, Leu, Ile és Pro.
2. Az 1. igénypont szerinti inzulin analóg, azzal jellemezve, hogy a SEQ ID NO.1 21-es pozíciójában levő aminosav Asn.
3. A 2. igénypont szerinti inzulin analóg, azzal jellemezve, hogy a SEQ ID NO.2 1-es pozíciójában levő aminosav Phe.
4. A 3. igénypont szerinti inzulin analóg, azzal jellemezve, hogy a SEQ ID NO.2 3-as pozíciójában levő aminosav Asn.
5. A 4. igénypont szerinti inzulin analóg, azzal jellemezve, hogy a SEQ ID NO.2 26-os pozíciójában levő aminosav Ala.
6. Gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy egy gyógyászatilag elfogadható higítószerben egy inzulin analógot tartalmaz, amelynek képlete: SEQ ID NO.1 megfelelően keresztötésekkel összekötve a SEQ ID NO.2-vel, vagy ennek egy gyógyászatilag elfogadható sója, azzal jellemezve, hogy a SEQ ID NO.1 21-es pozíciójában levő Xaa jelentése az alábbi csoportból választható aminosav: Asn, Asp, Glu, Gln, Ala, Gly vagy Ser, a SEQ ID NO.1 1-es pozíciójában levő Xaa jelentése Asp vagy Phe, a SEQ ID NO. 2 3-as pozíciójában levő Xaa jelentése Asp vagy Asn,

és a SEQ ID NO. 2 26-os pozíciójában levő Xaa jelentése az alábbi csoportból választható aminosav: Ala, Gly, Val, Leu, Ile és Pro.

7. A 6. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy a SEQ ID NO.1 21-es pozíciójában levő Xaa jelentése Asn, a SEQ ID NO.2 1-es pozíciójában levő Xaa jelentése Phe, a SEQ ID NO.2 3-as pozíciójában levő Xaa jelentése Asn, A SEQ ID NO.2 26-os pozíciójában levő Xaa jelentése az alábbi csoportból választható aminosav: Ala, Gly, Val, Leu, Ile és Pro.

8. A 7. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy a SEQ ID NO.2 26-os pozíciójában levő Xaa jelentése Ala.

9. Eljárás az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti inzulin analóg előállítására, azzal jellemezve, hogy a SEQ ID NO.1 vegyület és a SEQ ID NO.2 vegyület között keresztkötéseket hozunk létre.

10. Inzulin analóg, azzal jellemezve, hogy a 9. igénypont szerint állítjuk elő.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.O. és K. Nemzetközi
Szabadalmi Irodák tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-523

sz. u. l. l. l.
Gua a a