

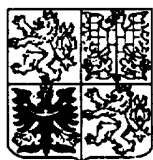
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 790

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **771-92**

(22) Přihlášeno: 13. 03. 92

(40) Zveřejněno: 15. 12. 93

(47) Uděleno: 21. 02. 96

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 04. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/62

A 61 K 38/28

// C 07 K 105:00

(73) Majitel patentu:

Ústav organické chemie a biochemie AVČR,
Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Svoboda Ivan RNDr., Praha, CZ;
Barth Tomislav RNDr. DrSc., Roztoky u
Prahy, CZ;
Jiráček Jiří RNDr., Praha, CZ;
Velek Jiří ing. CSc., Praha, CZ;
Bláha Ivo RNDr. CSc., Praha, CZ;
Pospíšek Jan ing. CSc., Praha, CZ;
Barthová Jana RNDr. CSc., Roztoky u
Prahy, CZ;
Ubík Karel ing. CSc., Praha, CZ;
Čapka Martin ing. DrSc., Praha, CZ;

(54) Název vynálezu:

**Analogy lidského insulinu a způsob jejich
přípravy**

(57) Anotace:

Analogy lidského insulinu se záměnamí v posici B-24 a B-25 za D-stereoisomerní formy fenylalaninu a mající buď ϵ -aminoskupinu lysinu v posici 29 substituovanou fenylacetylovou skupinou, nebo epsilon-aminoskupinu nechráněnou. Příprava látky s ϵ -aminoskupinou chráněnou fenylacetylovou skupinou kondenzací desoktapeptid insulinu s karboxyterminálním oktapeptidem s ϵ -aminoskupinou lysinu chráněnou fenylacetylovou skupinou za katalysy trypsinem v částečně nevodném prostředí obsahujícím maximálně 50 % hmot. vody. Připravený chráněný analog insulinu se oddělí od reakční směsi chromatografickými metodami, s výhodou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a podrobí se štěpení penicilinamidohydrolasou, která odštěpí fenylacetylovou sku-

pinu ϵ -aminoskupiny lysinu, čímž vznikne nechráněný analog, který se oddělí od ostatních komponent reakční směsi chromatografickými metodami s výhodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. K odštěpení kyseliny fenylacetylové skupiny se s výhodou použije nerozpustné formy penicilinamidohydrolasy zakotvené na inertním nosiči.

CZ 280 790 B6

Analogy lidského insulinu a způsob jejich přípravy

Oblast techniky

Vynález popisuje přípravu analogů lidského insulinu semisynthetickým způsobem.

Dosavadní stav techniky

Polohy B-24 a B-25 lidského insulinu patří k základním posicím karboxyterminální sekvence lidského insulinu, jejichž obměna výrazně ovlivňuje biologické účinky hormonů (R. A. Pullen et al., Nature 259, 369 až 373, 1976. R. C. Mirmira et al., J. Biol. Chem. 266, 1428 až 1436, 1991. H. Tager et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3181 až 3185, 1980. K. Inouye et al., Experientia 37, 811 až 813, 1981. L. M. Keefer et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 1229 až 1236, 1981). Řada záměn v těchto polohách však byla realizována v tzv. zkrácených insulinech, kdy byly připraveny semisyntheticky pouze desptapeptid insuliny (W. H. Fisher. Biol. Chem. Hoppe Seyler. 366, 521 až 525, 1985. M. Casaretto et al., Biol. Chem. Hoppe Seyler, 368, 709 až 716, 1987).

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou analogy lidského insulinu, u kterých jsou v posici B-24 a B-25 D-stereoisomerní formy zbytku fenylalaninu a ϵ -aminoskupina lysinu v posici 29 má vzorec NHX, kde X je vodík nebo fenylacetyl.

Předmětem vynálezu je dále způsob přípravy analogů lidského insulinu, který spočívá v tom, že se kondenzuje desoktapeptid insulinu s karboxyterminálním oktapeptidem B-řetězce, kde v poloze 24 a 25 je D-Phe, a s ϵ -aminoskupinou lysinu chráněnou fenylacetylovou skupinou za katalysy trypsinem v částečně nevodném prostředí obsahujícím maximálně 50 % hmot. vody za vzniku analogu lidského insulinu s ϵ -aminoskupinou chráněnou fenylacetylovou skupinou. Chráněný analog insulinu se s výhodou oddělí od reakční směsi chromatografickými metodami, například vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a podrobí se štěpení penicilinamidohydrolasou, zakotvenou na inertním nosiči, která odštěpí fenylacetylovou skupinu z ϵ -aminoskupiny lysinu, za vzniku nechráněných analogů lidského insulinu, které se od ostatních komponent reakční směsi oddělí chromatografickými metodami, s výhodou potom vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Protože biologická potence analogů vyhodnocená in vitro ukázala na zachování malé části aktivity i při záměně fenylalaninu v poloze B-24, nebo B-25, nebo B-24 a B-25 D-stereoisomery, rozhodli jsme se připravit nezkrácený analog lidského insulinu s D-fenylalaniny v posicích B-24 a B-25, jejichž přítomnost by měla ovlivnit metabolickou stabilitu této části molekuly, prostorové uspořádání a interakční schopnosti se Zn. (Liang Dong Cai et al., Scientia Sinica. Serie B 28, 472 až 483, 1985).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava D-Phe^{B-24}, D-Phe^{B-25}, N ϵ -fenylacetyl Lys^{B-29} insulínu. 100 mg oktapeptidu Gly-D-Phe-D-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys(Pac)-Thr (Pac = fenyloctová skupina) bylo rozpuštěno v 300 μ l 0,05 M octanu vápenatého. K roztoku peptidu bylo přidáno 100 mg desoktapeptid B-29 - B-30 insulínu a 20 mg vepřového trypsinu. Hodnota pH byla upravena přidáním 30 μ l 4-methylmorfolinu na hodnotu 6 až 8 (hodnota udaná je hodnotou zdánlivou, naměřenou kombinovanou skleněno-kalomelovou elektrodou. Reakce probíhající 7 h za jemného míchání byla při teplotě 20 °C ukončena přidáním 5 ml 10 % kyseliny octové (CH₃COOH). Reakční směs byla chromatografována na koloně Sephadexu G-50 za laboratorní teploty a použití 10 % CH₃COOH jako eluentu. Po oddělení nízkomolekulárních komponent byl chráněný derivát lidského insulínu dělen vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na koloně Vydac C 18 koncentračním gradientem acetonitrilu v 0,1 obj. trifluoroctové kyseliny (TFA). Homogenita D-Phe^{B-24,B-25}, Lys^{B-29} (Pac) lidského insulínu byla potvrzena kapilární elektroforesou v kyselém a zásaditém prostředí. Složení peptidu bylo ověřeno aminokyselinovou analýsą a hmotnostní spektrometrií (5926 Da).

Příklad 2

Příprava D-Phe^{B-24,B-25} lidského insulínu

Látka připravená podle příkladu 1 s ϵ -aminoskupinou lysinu v pozici B-29 substituovanou fenyloctovou skupinou (1,5 mg) byla rozpuštěna v 0,1 ml BM močoviny a ke vzorku byl přidán 50 mM Na-fosfátový pufr o pH 6,5 (0,7 me). Roztok této látky byl přečerpáván rychlostí 0,1 ml/min přes kolonu se zakotvenou penicilinamidohydrolasou na chemicky ošetřeném skle (5 mg enzymu na 200 mg poresního skla). Volná kyselina fenyloctová se uchytila na koloně Dowexu (1x8). Po 4 hodinách reakce byl chráněný derivát D-Phe^{B-24,B-25} lidského insulínu převeden na volný, reakce byla monitorována pomocí HPLC, a produkt izolován stejnou metodou za podmínek popsáných v příkladě 1. Složení produktu bylo ověřeno aminokyselinovou analýsą a hmot. spektrometrií.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Analogy lidského insulinu, kde v posici B-24 a B-25 jsou D-stereoisomerní formy fenylalaninu a ϵ -aminoskupina lysinu v posici 29 má vzorec NH-X, kde X je vodík nebo fenylacetyl.
2. Způsob přípravy analogů podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že se kondenzuje desoktapeptid insulinu s karboxyterminálním oktapeptidem B-řetězce, kde v poloze 24 a 25 je D-Phe, a s ϵ -aminoskupinou lysinu chráněnou fenylacetylovou skupinou za katalysy trypsinem v částečně nevodném prostředí obsahujícím maximálně 50 % hmot. vody za vzniku analogu lidského insulinu s ϵ -aminoskupinou chráněnou fenylacetylovou skupinou.
3. Způsob podle nároku 2 pro přípravu analogů podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že chráněné analogy insulinu se oddělí od reakční směsi, zejména chromatografickými metodami a podrobí se štěpení penicilinamidohydrolasou, zakotvenou na inertním nosiči, za vzniku nechráněných analogů lidského insulinu, které se od ostatních komponent reakční směsi oddělí, zejména chromatografickými metodami.

Konec dokumentu
