

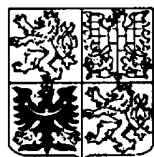
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 694

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **736-92**

(22) Přihlášeno: 12. 03. 92

(40) Zveřejněno: 15. 12. 93

(47) Uděleno: 06. 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**

(73) Majitel patentu:

Ústav organické chemie a biochemie AVČR,
Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

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

(54) Název vynálezu:

Způsob přípravy lidského insulínu

(57) Anotace:

Příprava lidského insulínu z derivátu lidského insulínu, který vznikne jako prekursor při kondenzaci desoktapeptidu insulínu s karboxyterminálním oktapeptidem B-řetězce, jenž má ε-aminoskupinu v pozici Lys^{B29} chráněnou skupinou fenylacetylovou, za katalysy trypsinem v částečně nevodném prostředí. Prekursor se od reakční směsi oddělí vysokoučinnou kapalinovou chromatografií a podrobí se štěpení penicilinamidohydrolasou, která je v nerozpustné formě zakotvena na inertním nosiči, přičemž se odštěpí fenylacetylová skupina z ε-aminoskupiny lysinu a vznikne lidský insulin, který se od ostatních komponent oddělí, s výhodou vysokoučinnou kapalinovou chromatografií.

CZ 280 694 B6

Způsob přípravy lidského inzulinu

Oblast techniky

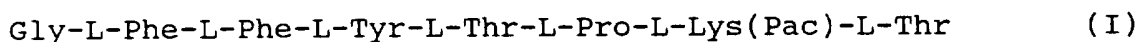
Vynález popisuje způsob semisyntetické přípravy derivátu lidského inzulinu a lidského inzulinu.

Dosavadní stav techniky

Dosavadní způsoby semisyntetické přípravy lidského inzulinu z desoktapeptidu B23-B30 inzulinu (DOI) a C-koncového oktapeptidu B-řetězce lidského inzulinu vycházejí z oktapeptidu, který má Lys v poloze B29 chráněný skupinami terc. butylkarbonyl, florenyl-methyloxykarbonyl, benzyloxykarbonyl, odštěpitelnými v kyselém prostředí (HF, HCl) (Inouye K., Watanabe K., Morihara K., Tochino Y., Kanaya T., Emura J., Sakakibara S. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 751 až 752). Kyselému prostředí je ovšem vystavena celá molekula inzulinu, což se může projevit v nižších výtěžcích biologicky aktivního lidského inzulinu.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob přípravy lidského inzulinu, který spočívá v tom, že se kondenzací desoktapeptidu inzulinu s karboxyterminálním oktapeptidem B řetězce vzorce I



kde Pac je fenylacetylová skupina, za katalýzy trypsinem v částečně nevodném prostředí, obsahujícím maximálně 50 % hmot. vody, připraví derivát lidského inzulinu s ϵ -aminoskupinou Lys^{B29} chráněnou fenylacetylovou skupinou, potom se derivát lidského inzulinu oddělí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a podrobí se štěpení penicilinamidohydrolazou v nerozpustné formě, zakotvenou na inertním nosiči, přičemž se odštěpí fenylacetylová skupina z ϵ -aminoskupiny lysinu a vznikne lidský inzulin, který se od reakční směsi oddělí, s výhodou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Metodika přípravy karboxyterminálního oktapeptidu B-řetězce lidského inzulinu s ϵ -aminoskupinou Lys^{B29} chráněnou fenylacetylovou skupinou je popsána v CZ patentu 280 690.

Výhodou tohoto způsobu přípravy je v použití mírného prostředí, kdy se chráněná skupina Pac odštěpí z postranního řetězce lysinu zakotvenou penicilinamidohydrolazou. Tento způsob byl popsán v CZ patentu 280 690.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava lidského (Pac)-Lys^{B29}-inzulinu (Pac = fenylacetyl)

100 mg oktapeptidu I se rozpustí v 30 μ l dimethylformamidu (DMF) a 130 μ l 50 mM roztoku octanu vápenatého. Potom se přidá 100 mg desoktapeptid B23-B30-inzulinu (DOI) a 20 mg trypsinu v 100 μ l 50 mM roztoku octanu vápenatého. pH (zdánlivé, měřeno kombinovanou elektrodou skleněná-kalomelová) bylo upraveno pomocí 30 μ l 4-methylmorfolinu na hodnotu 6,8. Výsledná koncentrace vody byla 40 % obj. (měřeno coulometrickou metodou podle Karla Fischera). Roztok byl slabě míchán za teploty 20 °C po dobu 7 hodin. Reakce byla zastavena přidáním 5 ml 10 % obj. kyseliny octové. Tento roztok byl nasazen na kolonu Sephadexu G-50f (3x70 cm). Chromatografie probíhala v 10 % obj. kys. octové při teplotě 20 °C rychlostí 0,9 ml/min. Frakce obsahující analog inzulinu a DOI byly spojeny a lyofilizovány. Získáno bylo 46 mg. Část této směsi byla rozdělena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) na koloně Vydac C18 (1x25 cm) při gradientu acetonitrilu v 0,1 % obj. trifluoroctové kyseliny (TFA).

Získáno bylo 2 mg čistého lidského (PAC)-Lys^{B29}-inzulinu. Tento produkt byl homogenní za podmínek RP-HPLC a kapilární elektroforézy v kyselém i zásaditém prostředí. Složení produktu bylo ověřeno aminokyselinovou analýzou i hmot. spektrometrií (5926 Da).

Příklad 2

Lidský inzulin s ϵ -aminoskupinou Lys^{B29} chráněnou fenyloctovou skupinou (1 mg) byl rozpuštěn v 0,1 ml 8 M močoviny a k vzniklému roztoku bylo přidáno 0,7 ml 50 mM Na-fosfátového pufru o pH 6,5. Tento roztok pomocí peristaltického čerpadla cirkuloval při pokojové teplotě přes kolonku s 200 mg porézního skla s 5 mg imobilizované a předem purifikované penicilinamidohydrolazy (Barth a kol. CS 275 449). Do systému byla dále zapojena kolonka s 4 mg Dowexu 1x8 (Strongly Basic Anion Exchanger, Fluka, Buchs, SRN). Tento silný anex byl použit za účelem vychytávání vznikající fenyloctové kyseliny, která jako produkt hydrolytické reakce inhibuje aktivitu enzymu. Obě kolonky byly před pokusem promyty 50 mM Na-fosfátovým pufrem o pH 6,5. Průběh reakce byl sledován pomocí RP-HPLC na koloně Vydac C18 (1x25 cm) při gradientu acetonitrilu v 0,1 obj. TFA. Po zhruba 230 minutách reakce byl substrát konvertován v nechráněný lidský inzulin.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Způsob přípravy lidského inzulinu, v y z n a ě n ý
t í m, že se kondenzací desoktapeptidu inzulinu s karboxytermi-
nálním oktapeptidem B řetězce vzorce I

Gly-L-Phe-L-Phe-L-Tyr-L-Thr-L-Pro-L-Lys(Pac)-L-Thr (I)

kde Pac je fenylacetylová skupina, za katalýzy trypsinem v čás-
tečně nevodném prostředí, obsahujícím maximálně 50 % hmot. vody,
připraví derivát lidského inzulinu s ϵ -aminoskupinou Lys^{B29} chrá-
něnou fenylacetylovou skupinou, potom se derivát lidského inzuli-
nu oddělí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a podrobí se
štěpení penicilinamidohydrolazou v nerozpustné formě, zakotvenou
na inertním nosiči, přičemž se odštěpí fenylacetylová skupina
z ϵ -aminoskupiny lysinu, a vznikne lidský inzulin, který se od
reakční směsi oddělí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Konec dokumentu
