

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

205 145 B

(21) A bejelentés száma: 4792/88
(22) A bejelentés napja: 1988. 07. 07.
(30) Elsőbbségi adatok:
074 558 1987.07.17. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 88/02289
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 89/00580

(51) Int. Cl.⁵

C 07 K 7/40
A 61 K 37/26

(40) A közzététel napja: 1991. 01. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992.03.30. SZKV 92/03

(72) Feltalálók:

Katsoyannis, Panayotis G., Manhasset, New York (US)
Schwartz, Gerald P., Washingtonville, New York (US)

(73) Szabadalmas:

Mount Sinai School of Medicine of the City
University of New York, New York,
New York (US)

(54) **Eljárás új szuperaktív inzulin-analógok és ezeket hatóanyagként
tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás új (B10-aszparaginsav)-
humán-inzulin, dez-(pentapeptid-(B26-B30)-
[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulin, il-
letve dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Glu^{B10}, Tyr^{B25}-
d-karboxamid]-humán-inzulin előállítására.

A fenti származékok a természetes inzulinnál 4-6-
szor, 11-13-szor, illetve mintegy 20-szor aktívabbak.

A találmány tárgyát képezi még a fenti szuperaktív
inzulin származékokat hatóanyagként tartalmazó
gyógyászati készítmények előállítása is.

A találmány tárgya eljárás új, szuperaktív inzulinanalógok és ezeket hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására.

Az inzulin a gerincesek növekedésének és anyagcseréjének szabályozásában kulcsszerepet játszó hormon. Inzulin hiányában komoly metabolikus zavarok jelentkeznek annak következtében, hogy sok sejt nem képes a glükóz és az aminosavak normális hasznosítására. A glükóz metabolizálására való képtelenség emberben diabetes mellituszhoz vezet, amely egy olyan komplex krónikus metabolikus rendellenesség, amelyben a szénhidrát, zsír és fehérje anyagcseréje zavaros. Legkifejezettebb klinikai formájában a diabetes mellitusra az jellemző, hogy az inzulin vagy inzulin aktivitás abszolút vagy relatív hiánya áll fenn, amely cukor- és acetonürítéssel, a növekedés leállításával és negatív nitrogén egyensúllyal jár. Ezek a körülmények végül a zsírsavak korlátozatlan oxidációja által okozott akut metabolikus acidózis folytán halálhoz vezethetnek, vagy a ketontestek képződéséhez szükséges elegendő lipíd tarték hiányában kómához vezetnek. A kómához vezető állapotként definiálható, amelyre határozott gyengeség, rendkívüli tömegvesztés jellemző, és a metabolizmus a tartós és súlyos táplálék elégtelenség folytán csökken (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 25. kiadás).

Az inzulin és tisztítási módjának az 1920-as években való felfedezése és a diabetes mellitusval való kapcsolatba hozása lehetőséget nyújtott a betegségbe való beavatkozásba. [Bliss, The Discovery of Insulin (1983), University of Chicago Press, Chicago, Ill.]. Napjainkban a diabeteszes betegek inzulinvaló kezelése a betegség kezelésének elsődleges terápiás eszköze.

Az inzulin egy 6000 dalton molekulatömegű polipeptid, amely két rövid peptidláncból, az A és B peptidláncokból áll, amelyek egymáshoz állandó diszulfid hidakkal kötődnek. Szinte minden tanulmányozott inzulinban a 21 aminosavból álló A lánc egy belső diszulfid hidat is tartalmaz. A B lánc hossza 30 aminosav. Mint sok más eukarióta-fehérje, az inzulin is prekursor formájában szintetizálódik, amely poszt-szintetikus úton alakul az érett, két polipeptid láncot tartalmazó aktív hormonná.

Az inzulin közvetlen prekursora a proinzulin egy egyetlen láncból álló polipeptid, amely a B és az A láncokat egy összekapcsoló peptiddel összekötve tartalmazza, amely összekapcsoló peptid, a C peptid mintegy 31 aminosavból áll, és a B és A láncokhoz egy-egy pár bázikus aminosav-maradék révén kapcsolódik. A három peptid sorrendje a proinzulin molekulában a következő: NH_2 -(B lánc)-Arg-Arg-C-peptid-Lys-Arg-(A lánc)-COOH. Az inzulin mRNS transzlációs terméke azonban a preproinzulin, amely olyan proinzulin, amely az amino-terminálison egy 24 aminosavból álló, nagyrészt hidrofób szignál-peptidet tartalmaz, amely az olyan fehérjékre jellemző, amelyek a sejtmembránon áthatolnak vagy abba beépülnek.

A preproinzulin a hasnyálmirigy szövetében diszpergált Langerhans szigetekben lévő pankreász-sejtekben szintetizálódik. A szignál-peptid eltávolítása a

durva endoplazmatikus retikulumban történik, majd a teljesen összehajtogatódott oxidált proinzulin a Golgi-apparátusba jut, ahol szekréciós granulumokká alakul. Az összehajtogatódott proinzulint diszulfid kötések stabilizálják. A szekréciós granulumok érése során az összehajtogatódott proinzulin molekulákat a bázikus aminosav maradék párok mentén specifikus proteázok hasítják, így az inzulin és a C peptid válik szabaddá.

Amint azt az előzőekben már ismertettük, a diabetes mellitusz terápiájának részeként a diabetesben szenvedő betegnek szabályozott mennyiségű inzulin adagolnak. Az így adagolt inzulin többnyire állati pankréaszból, nevezetesen marha vagy sertés pankréaszból származik. A marha és sertés inzulinok a hormonális homeosztázis fenntartásában a humán inzulinhoz hasonló módon, körülbelül hasonló hatékonysággal működnek, de minthogy ezek idegen fehérjék, immunológiai választ válthatnak ki, ami a hatékonyságukat csökkenti. Újabban rekombináns DNS eljárással előállított humán inzulinvaló gazdagodott a terápiás fegyvertára. A rekombináns DNS eljárással, vagy egyéb eljárásokkal előállított humán inzulin használata nem váltja ki azokat a kedvezőtlen immunológiai hatásokat, amelyek az állati inzulinok használatának velejárói. Azonban még a természetes humán inzulin hozzáférhetősége esetén sem mindig elegendő a hormon adagolása a diabetesben szenvedő beteg normális anyagcseréjének helyreállítására. Így szükségese-k jobb aktivitású alternatív inzulinok vagy más, a diabetesben szenvedő betegek kezelésére alkalmas eszközök.

A családi (örökletes) hiperproinzulinémia genetikus rendellenesség, amelyre az jellemző, hogy a szérumban a proinzulin-szerű molekulák mennyisége jelentősen megnövekedett. Három, ezt a ritka rendellenességet mutató család vizsgálata során kettőnél szerkezetileg rendellenes proinzulin-szerű molekula volt található. A genetikus defektet olyan mutációként azonosították, amely a proinzulin egy aminosavjának helyettesítését okozza, ennek következtében a proinzulin proteázok által inzulinná történő hasítása nem tökéletes.

A harmadik család érintett tagjainál a proinzulinvaló mintegy azonos méretű proinzulin-szerű molekula képződött, amely receptorkötő vizsgálatokban a normális prohormonnak megfelelően viselkedett. Ennek a harmadik családnak két érintett tagjától nyert klónozott inzulin gének szekvencia analízise arra derített fényt, hogy egyetlen kód-mutáció folytán a proinzulin molekula B láncának 10-helyzetének megfelelő, egy aszparaginsav hisztidinre cserélődik [Chan és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 2194-2197 oldal, 1987]. A mutáció feltehetőleg megakadályozza a proinzulin felgyülemelését eredményezi. Annak a pontos módját, hogy a mutáció hogyan akadályozza a proinzulinvaló inzulinná való további átalakulását, még nem ismerjük. Egy humán inzulin analógot, a [B10-aszparaginsav]-humán-inzulint, szintetizáltunk, amely megfelel az előbbi mutáns proinzulinvaló, és amely a

természetes inzulinoknál nagyobb aktivitást mutat.

Azt is felismertük, hogy az inzulin B láncának karboxil terminálisán lévő elemek ugyancsak befolyásolják az inzulin biológiai aktivitását. Különösen a B25 hely tűnik befolyásolónak az inzulin analógok aktivitását illetően.

Az inzulin B láncának C-terminális pentapeptidjét eliminálva, és az újonnan képzett C-terminális, a Phe B25 karboxilcsoportját amidálva egy olyan analóg, a dez-pentapeptid(B26-830)-[Phe^{B25}- α -karboxamid]inzulin nyerhető, amely a természetes hormon aktivitásával összehasonlítható aktivitással bír [Nakagawa és mtsai, J. Biol. Chem. 261, 7332-41 (1986); Cosmatos és mtsai, Int.J. Pept. Prot. Res., 14, 457-71 (1979); Casareto és mtsai, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 368, 709-16 (1987)]. A phe B25-nek néhány más aminosav maradékkal való helyettesítése, valamint ezen helyettesített inzulinok B26-B30 szegmensének különféle módosítása olyan analógokat eredményezett, amelyek aktivitása a szinte teljes inaktivitástól a természetes inzulinénál nagyobb aktivitásig terjed [Nakagawa és mtsai, J. Biol. Chem., 261, ld. fent; Casareto és mtsai, ld. fent; Nakagawa és mtsai, J. Biol. Chem., 262, 10254-58 (1987)]. Ezek közül a dez-pentapeptid(B26-B30)-[Tyr^{B25}- α -karboxamid]inzulin és ennek His^{B25} analógja az inzulinhoz mérten 270-300%-os aktivitással bír. Ezen vizsgálatok alapján feltelették, hogy az inzulin B25 aminosav maradéka a receptorral kölcsönhatásba lép, ezáltal olyan szerkezeti változásokat indít meg az inzulin molekula eddig még nem meghatározott területein, amelyek érintik a hormon-receptor kötődést. A B25-receptor kölcsönhatás pozitív vagy negatív módon befolyásolható a B lánc C-terminális területe révén, attól függően, milyen természetű módosításokat hajtunk végre a B25 maradékon, és a B lánc C-terminális területe megváltoztatásának mértékétől függően [Nakagawa és mtsai, J. Biol. Chem., 261, ld. fent; Casareto, ld. fent; Nakagawa és mtsai, J. Biol. Chem. 262. éd. fent-].

Szintetizáltak egy másik humán inzulin-analógot is, a dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-inzulint, amely a természetes inzulinokénál nagyobb aktivitásúnak bizonyult.

A találmány tárgya egy szuperaktív inzulin analóg, az (I) képletű [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin előállítása. Ez az inzulin-analóg (a továbbiakban „10-aszparaginsav-B”) lényegesen nagyobb aktivitással bír, mint a természetes humán inzulin, amely a B lánc 10-helyzetében hisztidint tartalmaz.

A találmány tárgyát képezi továbbá a (II) képletű szuperaktív inzulin-analóg, a dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin (a továbbiakban „Asp^{B10} analóg”) előállítása is. Ebben az inzulinban a B lánc 10-helyzetében végrehajtott változtatáson kívül a B26-B30 szegmenst elimináltuk, és a Phe B25-t Tyr- α -karboxamiddal helyettesítettük. Ez az inzulin-analóg még nagyobb aktivitással bír, mint a [B10-aszparaginsav] humán inzulin.

A találmány tárgyát képezi továbbá a (III) képletű analóg, a dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Glu^{B10},

Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán inzulin (a továbbiakban „Glu^{B10} analóg”) előállítása is, amely vegyület az előbbi analógtól abban tér el, hogy a B10-helyzetben Asp helyett Glu-t tartalmaz. Ez az inzulin analóg legalább 20-szor aktívabb, mint a természetes inzulin.

A találmány tárgyát képezi diabetesben szenvedő betegek kezelésére alkalmas gyógyászati készítmények előállítása is, amely készítmények terápiásan hatásos mennyiségű [B10-aszparaginsav]-humán-inzulint, dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán inzulint, dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Glu^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulint tartalmaznak hatóanyagként, és emellett gyógyászati célra alkalmas hordozóanyagot tartalmaznak.

A következőkben röviden ismertetjük az ábrákat.

Az 1. ábrán nyers humán [B10-aszparaginsav] B lánc S-szulfonátának CM-cellulóz oszlopról való eluációját bemutató kromatogram látható. Az ábrán a 278 nm-nél mért abszorpciót mutatjuk be az elfolyó térfogat függvényében.

A 2. ábrán humán A lánc S-szulfonát és humán [B10-aszparaginsav] B lánc S-szulfonát kombinációs elegyének nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással kapott kromatogramja látható. A 2a. ábra a kezdeti kromatográfiás elválasztást mutatja, míg a 2b. ábrán a 2a. ábrán 32,32 percnél kapott csúcs ismételt kromatografálásának eredménye látható, a 278 nm-nél mért, abszorpciót mutatjuk be az eluációs idő függvényében.

A 3. ábrán ¹²⁵I-inzulin patkánymáj plazma inzulin-receptorokhoz való kötődésének kompetitív gátlását mutatjuk be [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin és marha-inzulin esetén, a kötés gátlást (a maximum %-ában) a kompetitor koncentráció függvényében mutatjuk be, az üres karikával jelzett körbe a módosított humán inzulinra, a kitöltött karikával jelzett marha inzulinra vonatkozik.

A 4. ábra [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin és marha-inzulin patkány adipociták lipogenezisére kifejtett hatását mutatja grafikusán. A lipogenezis stimulálását (a maximum %-ában) az agonista koncentráció függvényében mutatjuk be. Az üres karikával jelzett görbe a módosított humán inzulinra, a kitöltött karikával jelzett marha inzulinra vonatkozik.

Az 5. ábrán a nyers humán dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr- α -karboxamid25] B lánc S-szulfonát CM-cellulóz oszlopról való eluálását bemutató kromatogram. A 278 nm-nél mért abszorpciót az eluációs idő függvényében mutatjuk be.

A 6. ábra humán A lánc S-szulfonát és humán dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr- α -karboxamid25]-B-lánc-S-szulfonát kombinációs elegyének eluációját bemutató kromatogram, amely nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással készült. A 6a. ábrán az első kromatográfiás elválasztás látható, a 6b. ábrán az a. ábra 36,86 perc időnél lejött eluátumának ismételt kromatografálásával kapott eredményt mutatjuk be. Az ábrákon a 278 nm-nél mért abszorpciót az eluációs idő függvényében mutatjuk be.

A 7. ábra ¹²⁵I-inzulin patkánymáj plazma inzulin-

receptorokhoz való kötődésének kompetitív gátlását mutatja be dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin és marha-inzulin esetén. A gátlás %-os értékét a kompetitív koncentráció függvényében mutatjuk be. Az üres karikával jelzett görbe a módosított humán inzulinra, a kitöltött karikával jelzett marha inzulinra vonatkozik.

A 8. ábrán dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin és marha-inzulin hatását látjuk lipogenezis stimulálására patkány adipocitákban. A lipogenezis stimulálását (a maximum %-ában) az agonista koncentráció függvényében mutatjuk be.

A találmány tárgya eljárás szuperaktív inzulin analógok, az (I) képletű [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin és a (II) képletű dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin és a (III) képletű Glu^{B10} homológ előállítására.

Inzulin analóg olyan proteint értünk, amelynek alapvető A lánc és B lánc szerkezete az emberi (és más fajok) inzulinnaal azonos helyzetben tartalmaz. Így az inzulin analógok megőrzik a természetes inzulinok diszulfid híd elrendezését. A hasznos inzulin analógok abban térhetnek el a natív inzulinoktól, hogy a molekula egyik vagy mindkét láncában egy vagy több aminosav többletként szerepel, hiányzik, más aminosavval helyettesített vagy módosított, de legalább részben meg kell őriznie az inzulin hatását [lásd a Katsoyannis, Treatment of Early Diabetes (1979), 319-327. oldal; Plenum Publ. Corp.; és a Blondell, Adv. Prot. Chem., 26, 330-362 (1972) szakirodalmi helyen].

A találmány szerint előállított inzulin analógok abban különböznek a humán inzulintól, hogy a B lánc 10-helyzetében aszparaginsavat tartalmaznak, vagy aszparaginsavat vagy glutaminsavat tartalmaznak a B lánc 10-helyzetű hisztidinje helyett, és emellett a B26-B30 szegmens hiányzik belőlük, és a PheB25 hely Tyr- α -karboxamiddal helyettesített. Ezek a vegyületek nem várt módon sokkal hatásosabbak, mint a természetes inzulinok, különösen hatásosabbak azoknál, amelyek a diabetesz terápiájában használatosak.

A [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin, a dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin vagy más B¹⁰-helyettesített analógok számos, szakember számára ismert eljárással előállíthatók. Például az inzulin analóg A és B lánc komponenseinek előállítása a peptidszintézis végrehajtására ismert alkalmazott bármely eljárással végrehajtható, köztük a szilárd fázisú peptidszintézis eljárásokkal és oldatban végrehajtott eljárásokkal, például fragmens kondenzációval [lásd például az Erickson és Merrifield, The Proteins (1976), 2. kötet, 3. fejezet, Academic Press, New York, és Blake és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 1556-1559 (1983) szakirodalmi helyeken]. A humán-inzulin analógok előállíthatók humán- vagy sertés-inzulin A láncának [10-aszparaginsav], dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr- α -karboxamid25] vagy Glu^{B10} B láncával való kombinálásával, a B lánc előállítható peptid-szintézis eljárásokkal. Ismeretes, hogy a humán és a sertés inzulin A

lánc aminosav szekvenciájában azonos egymással, így a sertés inzulin A lánc pótolhatja a humán inzulin A láncát minden olyan eljárásban, amelyben [10-aszparaginsav-B]-humán-inzulin, dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid] vagy Glu^{B10}-humán-inzulin-analógokat állítunk elő. A lánc kombinálható a találmány szerint megváltoztatott B láncsal.

A [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin, a dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin előállítására bármely ismert eljárással előállított humán vagy sertés inzulin A láncot bármely alkalmas eljárással előállított módosított humán B láncsal kombinálunk. Az A lánc és a módosított B lánc előnyösen stabilizált S-szulfonált formájúak, amelyek ismert eljárásokkal az inaktív humán inzulin analógokká rekombinálhatók. Ismert rekombinációs eljárások szerepelnek például a 3 420 810 számú [Katsoyannis] és a 4 421 685 számú (Chance és munkatársai) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban. Például a 4 421 685 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban olyan egyetlen lépésből álló eljárást ismertetnek inzulin előállítására, amelyben az S-szulfonált A láncot és az S-szulfonált B láncot egy tiol redukálószer jelenlétében, például ditiotritot vagy cisztein jelenlétében vizes közegben hozzák érintkezésbe. A rekombináció körülményei: 1) pH= 8-12, 2) az össz-protein koncentráció 0,1-50 mg/ml és 3) a tiol redukálószer olyan koncentrációban van jelen, amely mintegy 0,4-2,5 SH csoportot eredményez az elegyben lévő összes S-szulfonált A és B lánc minden egyes S-SO₃ csoportjára számítva. A [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin, a dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulinanalóg képződése akkor következik be, ha a reakcióelegyet 0 és 25 °C közötti hőmérsékleten tartjuk oxigénforrást biztosító környezetben, hogy az inzulin S-S kötései kialakuljanak.

Ha a rekombinációs reakció befejeződött, az inzulin-analóg elkülöníthető, tisztasága és aktivitása szakember számára ismert különféle eljárásokkal ellenőrizhető. Az inzulin és inzulin analógok tisztítására szokásosan alkalmazott eljárások kromatográfiás eljárások, például nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárás (HPLC), géliszűrés vagy ioncserlő kromatográfia. A termék tisztasága számos eljárással ellenőrizhető, köztük HPLC eljárással, poliakrilamid gél elektroforézissel, aminosav analízissel és aminosav szekvencia vizsgálattal.

Bár az inzulin analógok általában megőrznek némi maradék inzulin aktivitást, az ilyen analógok aktivitása általában a természetes inzulinokénál csak egy töredéke. A humán, marha és sertés inzulinok aktivitása az Amerikai Egyesült Államokban érvényes szabványok szerint mintegy 25-26 nemzetközi egység/mg fehérje. Nem várt módon a [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin az inzulin aktivitási vizsgálatokban 4-6-szor aktívabbnak bizonyult a természetes inzulinokénál, a dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin 11-13-szor aktívabb-

nak bizonyult a természetes inzulinnál.

Az inzulin aktivitásának vizsgálatára alkalmas módszerek többek között az 1) inzulin radioreceptor vizsgálat, amelyben egy inzulin relatív aktivitását úgy határozzák meg, hogy mérik az inzulin és inzulin analóg ahhoz szükséges arányát, hogy a sejtmembránokon, például patkánymáj plazma membrán frakción jelen lévő inzulin receptorokhoz fajlagosan kötődő ^{125}J -inzulin 50%-át helyettesítse; 2) lipogenezis vizsgálat, amelyet például patkány adipocitákon végeznek, amelyben az inzulin relatív aktivitását az inzulin az inzulin analóghoz való azzal az arányával határozzák meg, amely ahhoz szükséges, hogy a $[3\text{-}^3\text{H}]$ glükóz szerves-extrahálható anyaggá (például lipideké) való maximális átalakulásának 50%-át elérje; 3) glükóz oxidációs vizsgálat izolált zsírsejtekben, amelyekben az inzulin-analóg relatív aktivitását az inzulin az inzulin-analóghoz való azzal az arányával határozzák meg, amely a glükóz-1- $[^{14}\text{C}]$ $[^{14}\text{CO}_2]$ -dá való maximális átalakulásának 50%-a eléréséhez szükséges; 4) inzulin radioimmuno-vizsgálat, amellyel az inzulin-analógok immunogenitása határozható meg annak a hatékonyságnak a mérésével, amellyel az inzulin-analóg a ^{125}J -inzulinnal a fajlagos anti-inzulin antitestekhez való kötődésben verseng; és 5) egyéb olyan vizsgálatok, amelyekben az inzulin vagy inzulin-analógok ismert fajlagos inzulin detektorokkal bíró sejtekhez, például tenyésztett limfocitákhoz való kötődését mérik. A relatív inzulin aktivitás mérésére szolgáló standard vizsgálatokban például az előzőekben ismertetett 1), 2) és 5) vizsgálatokban a [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin 4-6-szor aktívabbnak bizonyult a természetes inzulinnál, a dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin 11-13-szor hatásosabbnak bizonyult a természetes inzulinoknál, és a Glu^{B10} analóg 20-szor aktívabbnak bizonyult a természetes inzulinnál.

A találmány szerint előállított humán inzulin analógok diabeteszes betegek kezelésére alkalmas gyógyászati készítményekké formálhatók. A gyógyászati készítmények [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin, a dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid] vagy [Glu^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin analógot tartalmaznak olyan mennyiségben, amely terápiásan hatásos a diabeteszes beteg hormonális egyensúlya elérésének elősegítésére. A fenti készítmények a megadott hatóanyagok mellett gyógyászati célra alkalmas hordozóanyagokat is tartalmaznak. Mint minden más, a diabeteszes kezelésére szolgáló inzulin esetén, a találmány szerint előállított készítmények esetén is az adott beteg hormonális egyensúlyának eléréséhez szükséges alkalmas terápiás hatóanyag mennyiséget betegenként kell meghatározni. A terápiás mennyiség meghatározásánál figyelembe kell venni a diabeteszes állapot súlyosságát, és a készítmény adagolásának módját. A beteget kezelő adott orvos döntésére van bízva a gyógyászati készítmény mennyiségének, és az adagolás módjának meghatározása.

A természetes inzulinokat általában olyan terápiás

dózisban adják a betegnek, amely 0,02-5 egység humán inzulin aktivitás (testtömeg kg/nap) értéket eredményez (lásd a 4 652 547 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban).

Mivel a találmány szerint előállított új inzulin analógok in vitro jóval hatékonyabbak a természetes inzulinnál, feltehetően a diabeteszes beteg egyensúlyának elérésére szükséges terápiás mennyisége kevesebb, mint a diabeteszes kezelésre napjainkban használt természetes inzulinok terápiás mennyisége. A találmány szerint előállított inzulin analógok további fontos előnye, a diabeteszes beteg véréből való gyorsabb kiválasztás. Ismeretes, hogy az inzulin kiválasztását (clearance) a vérből a sejteken lévő inzulin receptorok közvetítik. Mivel a [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin az inzulin receptorokhoz mintegy 5-szor szorosabban kötődik, a dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin 11-13-szor, a Glu^{B10} analóg 20-szor szorosabban kötődik, mint a természetes inzulin, feltehető, hogy ezek az inzulin analógok a beteg véréből gyorsabban választódnak ki, mint a természetes inzulinok. Ennek következtében feltehető, hogy a diabeteszes betegek kezelése során a keringő inzulin növekedésgátló hatásával kapcsolatos ér-toxicitás csökken, amennyiben a [B10-aszparaginsav]-humán-inzulinnal dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin, a Glu^{B10} analóggal, kezeljük a beteget.

A terápiásan hatásos mennyiségű [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin, dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin, Glu^{B10} analóg hatóanyagot tartalmazó készítmények az inzulin kezelésre szoruló diabeteszes betegnek parenterálisan adagolhatók. Előnyösen intramuszkulárisan, szubkután vagy intravénásan adagoljuk ezeket a készítményeket. A készítmények adagolhatók a betegnek orra fújt permet formájában is. Más eljárás szerint, hosszú időtartamú szabályozott egyensúly biztosítására a készítmények implantálható szivattyúba építve alkalmazhatók. Az ilyen implantálható eszközök, amelyek biztosítják, hogy a hatóanyag hosszú időtartamon keresztül szabályozottan jusson a betegbe, szakember számára ismertek. A készítmények a hatóanyagon kívül gyógyászati célra alkalmas hordozóanyagot is tartalmaznak, amelyek nem lehetnek károsak a betegre. A hordozóanyagnak nem szabad kedvezőtlen hatást gyakorolnia a készítmény hatóanyagára, azaz a humán-inzulin analógra sem. A terápiásan hatékony mennyiségű [B10-aszparaginsav]-humán-inzulint vagy dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulint, vagy Glu^{B10} analógot hatóanyagként tartalmazó készítmények megfelelő hordozóanyagai és egyéb adalékanyagai például a 4 652 547 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban az inzulin tartalmú készítmények hordozóanyagaiként és adalékanyagaiként leírt anyagok.

A találmányt a továbbiakban nem korlátozó példákban mutatjuk be közelebbről. Bár a példákban a [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin és a dez-penta-

peptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin előállítását írjuk le, azonos eljárások alkalmazhatók a Glu^{B10}, az α -B10 homológok előállítására is.

1. példa

[B10-Aszparaginsav]-humán-inzulin előállítása

A [B10-aszparaginsav]-humán-inzulint fragmens-kondenzációs eljárást alkalmazó peptidszintézis eljárással állítjuk elő [lásd például a Blake és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 1556-1559 (1983) szakirodalmi helyen]. Minden peptidszármazék közti termék homogenitását vékonyrétegekromatográfiás eljárással 6060 jelölésű szilikagél lemezen (Eastman kromatográfiás lemez) vizsgáljuk. A kromatogram kifejlesztéséhez alkalmazott oldószer kloroform, metanol és víz (45:10:1; 89:10:1; és 200:75:13) arányú elegye.

A [B10-aszparaginsav]-humán-inzulint S-szulfonált humán inzulin A láncaának szintetikus humán inzulin [10-aszparaginsav Blánc] S-szulfonált származékával diitotereitol jelenlétében a 4 421 685 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban szereplő eljárás szerint végzett kombinálásával állítjuk elő. Az S-szulfonált humán A láncot, amely a megfelelő sertés inzulin láncsal azonos, [Nicol és mtsai., Nature, 181, 483-485 (1960)] sertés inzulinból oxidatív szulfitolízissel, majd a kapott S-szulfonált A és B láncok [Katsoyannis és mtsai, Biochemistry, 6, 2635-2624 (1967)] eljárása szerint oszlopkromatográfiás eljárással való elválasztásával állítjuk elő. Az S-szulfonált humán-[10-aszparaginsav] B láncot az S-szulfonált természetes humán B láncból Schwartz és Katsoyannis [J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 2894-2901 old. (1973)] eljárásával állítjuk elő. A C-terminális hexadekapeptid (B¹⁵-B³⁰ szekvencia) szomszédos hexapeptiddel (B⁹-B¹⁴) való kapcsolása révén a C-terminális dokozepeptidet (B⁹-B³⁰) nyerjük. Ezt ezután az N-terminális oktapeptiddel (B¹-B⁸) kapcsolva nyerjük a védett B lánc analógot, amelyet folyékony hidrogén-fluoriddal reagáltatunk, majd a kapott szulfhidril-származékot oxidatív szulfitolízisével nyerjük az S-szulfonált [10-aszparaginsav] B láncot.

Az I. táblázatban felsorolunk a peptidek szintézisében alkalmazott néhány vegyületet és amino védőcsoportot, és megadjuk ezek alkalmazott rövidítését.

I. táblázat

benzil-csoport	Bzl
tercier-butoxi-karbonil-csoport	Boc
tercier-butil-csoport	Bu ^t
ciklohexil-csoport	cHex
diciklohexil-amin	DCHA
dimetil-formamid	DMF
Dimetil-szulfoxid	DMSO
difenil-metil-csoport	DPM
N,N'-diciklohexil-karbodiimid	DDC
1-hidroxi-benzotriazol	HOBT
benzil-oxi-karbonil-csoport	Z
A. S-szulfonált [10-aszparaginsav] B lánc szintézise	
Z: Glu(cHex):OH, DCHA (1. vegyület) előállítása	

Ezt a vegyületet a megfelelő Boc-származékból (Pensinsula Laboratories) állítjuk elő a védőcsoportnak trifluor-ecetsavval való eltávolításával, és a kapott terméknek benziloxi-karbonilezésével. A kapott származékot éterből diciklohexil-amin-sója formájában kristályosítjuk. A kapott termék olvadáspontja 131-132 °C.

Elemzési eredmények a C₃₁H₄₉N₂O₆ képlet alapján:

10 számított: C: 86,4, H: 8,88, N: 5,4%,
talált: C: 68,3, H: 9,11, N: 5,1%.

Z: Glu(cHex)-Ala. OBU^t (2. vegyület)

9,8 g 1. vegyületet 0,2 n kénsav és etil-acetát között megosztunk, a szerves fázist elkülönítjük, vízzel mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, majd szárazra pároljuk. A visszamaradó oldatot 30 ml DMF-ban oldjuk, 0 °C hőmérsékletre hűtjük és hozzáadunk 5,6 g Z-Ala.OBU^t-ből Schwartz és Katsoyannis (lásd fent) eljárásával előállított H-Ala.OBU^t-t, majd 2,3 g HOBT-t és 3,7 g DCC-t adunk hozzá. Az elegyet 24 órán át szobahőmérsékleten hagyjuk állni, majd kiszűrjük belőle a karbamid mellékterméket, a szűrletet 500 ml etil-acetáttal hígítjuk, és egymást követően 1 mól/literes nátrium-hidrogén-karbonáttal, vízzel, 0,2 n hidrogén-kloriddal, majd vízzel mossuk, szárítjuk, majd vákuumban szárazra pároljuk. 90%-os hozammal 8 g terméket nyerünk olaj formájában, amely vékonyrétegekromatográfiás vizsgálat alapján homogénnek bizonyul. Ezt a terméket a 3. vegyület előállítására további ellenőrzés nélkül alkalmazzuk.

Z.Val-Glu(cHex)-Ala.OBU^t (3. vegyület) előállítása

8 g 2. vegyületet 150 ml metanolban 2 g 10% fémtartalmú szénhordozós palládiumkatalizátor jelenlétében 3 órán át hidrogénezünk. Ezután a katalizátort kiszűrjük, és a szűrletet vákuumban szárazra pároljuk. A visszamaradó elegyet 4,1 g Z.Val.OH, 2,7 g HOBT és 3,3 g DCC 30 ml DMF-ban készült aktiváló elegyével elegyítjük (az aktiválást szobahőmérsékleten 30 percig végzzük az amino-komponens hozzáadását megelőzően). 24 óra múlva a terméket a 2. vegyületre leírt módon elkülönítjük. 85%-os hozammal 8,7 g olajat nyerünk. Ez az anyag vékonyrétegekromatográfiás vizsgálat tanúsága szerint homogén, a következő szintézislépésben további jellemzés nélkül alkalmazzuk.

45 Z.Leu-Val-Glu(cHex)-Ala.OBU^t (4. vegyület) előállítása

8 g 3. vegyületet az előzőekben leírt módon hidrogénezünk, majd a kapott olajos maradékot 30 ml DMF-ban oldjuk. A kapott oldathoz 5,5 g Z-leucin-(p-nitrofenil)-észtert és 1,8 g HOBT-t adunk. 48 óra elteltével az elegyet 250 ml etil-acetáttal meghígítjuk, majd egymást követően 0,5 n ammónium-hidroxiddal, vízzel, 0,2 n hidrogén-kloriddal, majd vízzel mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, majd vákuumban szárazra pároljuk. A visszamaradó anyagot 95%-os etanolból kristályosítjuk. Így 88%-os hozammal 8,4 g terméket nyerünk, amelynek olvadáspontja 190-194 °C. [α]_D²⁶ = -20,3° (c=1, DMF).

Elemzési eredmények a C₃₇H₅₈N₄O₉ képlet alapján:

számított: C: 63,2, H: 8,31, N: 8,0%
talált: C: 62,9, H: 8,37, N: 8,1%.

Boc.Asp(cHex)-Leu-Val-Glu(cHex)-Ala.OBu⁺ (5. vegyület) előállítás

1,5 g 4. vegyületet az előzőekben leírt módon hidrogénezünk, és a visszamaradó anyagot hozzáadjuk 10 ml DMF-ban lévő 0,8 g Boc.Asp(cHex).OH (Peninsula Laboratories), 0,34 g HOBT és 0,52 g DCC (az amino komponens hozzáadása előtt 30 percig szobahőmérsékleten aktivált) aktiváló elegyhez. 24 óra múlva a reakcióelegyet a 2. vegyületnél leírt módon feldolgozzuk, a terméket etil-acetát és petroléter elegyből való ismételt kicsapással tisztítjuk. Így 85%-os hozammal 1,5 g terméket nyerünk, amelynek olvadáspontja 203–205 °C.

$[\alpha]_D^{26} = -8,9^\circ$ (c=1, DMF).

Elemzési eredmények a $C_{344}H_{75}N_5O_{12}$ képlet alapján:

számított: C: 61,0, H: 8,72, N: 8,1%,
talált: C: 60,7, H: 8,56, N: 7,8%.

Boc.Ser(Bzl)-Asp(cHex)-Leu-Val-Glu(cHex)-Ala.OH (6. vegyület) előállítás

1 g 5. vegyület 10 ml trifluor-ecetsavban készült oldatát 2 órán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd vákuumban szárazra pároljuk, és a visszamaradó anyagot hideg éterrel eldörzsöljük. A szilárd, védőcsoporttól megfosztott pentapeptid-trifluor-ecetsav sót kiszűrjük, majd kálium-hidroxidon szárítjuk. Aktiváló elegyet készítünk 1,2 g Boc.Ser(Bzl).OH-ból, 0,5 g HOBT-ból és 0,6 g DCC-ből 10 ml DMF-ban, majd 30 perces inkubálás után az elegyet beleszűrjük a pentapeptid trifluor-ecetsav-só 10 ml DMSO-ban készült, 0,13 ml N-metil-morfolint tartalmazó oldatába. 24 óra múlva a reakcióelegyet 100 ml hideg vízzel meghígítjuk, majd a kicsapódott terméket kiszűrjük, szárítjuk, majd etil-acetát és petroléter elegyből ismételt kicsapjuk. Így 90%-os hozammal 0,9 g terméket nyerünk, amelynek olvadáspontja 200–203 °C.

$[\alpha]_D^{26} = -17,8^\circ$ (c=1, DMF).

Elemzési eredmények a $C_{50}H_{78}N_6O_{14}$ képlet alapján:

számított: C: 60,8, H: 7,96, N: 8,5%,
talált: C: 61,4, H: 8,25, N: 8,7%.

Az aminosav arány savas hidrolízist követően a következő: Asp_{1,0}Ser_{0,8}Glu_{1,0}Ala_{1,0}Val_{1,1}Leu_{1,0}.

Boc.Ser(Bzl)-Asp(cHex)-Leu-Val-Glu(cHex)-Ala-Leu-Tyr(Bzl)-leu-Val-Cys(Dpm)-Gly-Glu(Bzl)-Arg(NO₂)-Gly-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-Thr-Pro-Lys(Z)-Thr(Bzl)-OBzl (7. vegyület) előállítás

Schwartz és mtsai [Int. J. Pept. Protein Res. 17, 243–255 (1981)] eljárásával előállított 400 mg humán inzulin B lánc részlegesen védett hexadekapeptidet (B¹⁵–B³⁰ szekvencia) szabad bázis formájában, 494 mg 6. vegyületet és 80 mg HOBT-t tartalmazó szuszpenziót oldódásig keverünk. Az oldathoz 100 mg DCC-t adunk, majd 4 °C hőmérsékleten 48 órán át keverjük, ezután 150 ml 95%-os etanollal meghígítjuk. A kicsapott dokozapeptidet (B⁹–B³⁰ szekvencia) kiszűrjük, 95%-os etanollal mossuk, majd szárítjuk. Így 88%-os etanollal mossuk, majd szárítjuk. Így 88%-

os hozammal 450 mg terméket nyerünk. Hidrolízist követően végzett aminosav analízis alapján az alábbi, molarányokban megállapított összetételt határoztuk meg:

5 Asp_{1,1}Thr_{2,0}Ser_{1,0}Glu_{2,1}Pro_{1,0}Gly_{2,2}Ala_{0,9}Val_{1,9}Leu_{2,9}Tyr_{1,9}Phe_{2,0}Lys_{1,1}Arg_{0,7}. (A ciszteint nem vizsgáltuk).

H.Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO₃) Gly-Ser-Asp-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(SO₃) -Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr.OH (humán inzulin [10-aszparaginsav] B lánc S-szulfonát) (8. vegyület) előállítása

400 mg 7. vegyület 10 ml 7:3 térfogatarányú trifluor-ecetsav-ecetsav elegyben készült oldatát szobahőmérsékleten 1 órán át tároljuk, majd éterrel meghígítjuk. A dokozapeptid kicsapott trifluor-ecetsavas sóját kiszűrjük, éterrel mossuk, majd szárítjuk. A terméknek 6 ml, 0,1 ml trietil-amint is tartalmazó N-metil-pirrolidonban és 6 ml DMF-ban készült oldatát éterrel meghígítjuk és szárítjuk. Ezt a terméket és 500 mg Schwartz és Katsoyannis [J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 2894–2901 (1973)] eljárásával készült Boc-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(Dpm)-Gly.OH-t 90 mg HOBT-t tartalmazó 5 ml DMF és 5 ml DMSO elegyben oldjuk, majd 100 mg DCC-t adunk hozzá. Az elegyet 48 órán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd 5 ml 1 n ammónium-hidroxidot tartalmazó 250 ml hideg vízbe öntjük, és a kicsapódott védett triakontapeptidet kiszűrjük, vízzel 50%-os metanollal, majd metanollal mossuk, szárítjuk, majd DMF és metanol elegyből ismételt kicsapjuk. Így 90%-os hozammal 400 mg terméket nyerünk.

Ezt a terméket a védőcsoportnak folyékony hidrogén-fluoriddal való eltávolításával, majd ezt követően Schwartz és Katsoyannis (lásd fent) humán inzulin B lánc S-szulfonát előállítására leírt eljárásával végzett oxidatív szulfitolízissel S-szulfonált [10-aszparaginsav] B láncá alakítjuk. 200 mg védett triakontapeptidet 1 ml m-krezolt tartalmazó 9 ml vízmentes folyékony hidrogén-fluoriddal regagáltatunk 0 °C hőmérsékleten 1 órán át. Ezután a hidrogén-fluoridot eltávolítjuk, és a visszamaradó anyagot egymást követően etil-acetáttal, majd petroléterrel eldörzsöljük. Ezt a terméket 20 ml 8 mól/literes guanidin-hidrogén-kloridban oldjuk, majd az oldathoz 700 mg nátrium-szulfidot és 500 mg nátrium-tetratónátot adunk. Az elegyet 3 órán át szobahőmérsékleten reagáltatjuk, majd dialízis csőbe, például Spectrapor^R membrán No. 3 csőbe helyezzük, egyenként 4 liter vízzel szemben 4 °C hőmérsékleten 24 órán át dializáljuk, a műveletet négyszer ismételtük meg, majd a terméket liofilizáljuk.

Tisztítás céljára a liofilizált anyagot 3 ml karbamid-acetát pufferben oldjuk (0,04 mól/liter acetát – 8 mól/liter karbamid, pH=4,0) és az oldatot 2,5 x 40 cm-es CM-cellulóz oszlopra visszük, amelyet azonos pufferrel izokratikusan eluálunk. [Lásd például a Katsoyannis és mtsai, Biochemistry 6, 2635–2642 (1967) szakirodalmi helyen.] Az oszlopról elfolyó eluátumot spektrofotométerrel (ISCO Model U-5A) ellenőrizve

az 1. ábrán bemutatott elúciós mintát kapjuk. A fő csúcs eluátumát (125–168 ml) gyűjtjük, az előzőekben leírt módon dializáljuk, és liofilizálás után 22 mg S-szulfonált [10-aszparaginsav] B láncot nyerünk belőle fehér por formájában. A tisztított lánc savas hidrolízist követő aminosav analízise a következő molarányokban megadott összetételt eredményezte, amely arányok az elméletileg kaphatónak megfelelnek: Asp_{2,1} Thr_{2,1} Ser_{1,1} Pro_{1,1} Glu_{3,0} Gly_{2,9} Ala_{1,0} Val_{3,0} Leu_{3,8} Tyr_{1,8} Phe_{2,9} Lys_{1,1} His_{1,0} Arg_{0,9} (a ciszteint nem határoztuk meg).

B. [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin szintézise és elkülönítése

40 mg S-szulfonált humán (sertés) A lánc és 20 mg S-szulfonált humán [B10-aszparaginsav]-lánc 10 ml 0,1 mól/literes pH= 10,6-os glicin-pufferben készült oldathoz 4 °C hőmérsékleten 7 mg ditiotreitol adunk. Az elegyet 24 órán át 4 °C hőmérsékleten tartjuk, majd 1 ml ecetsavval meghígítjuk, és a kapott csapadékot centrifugálással (International Centrifuge, Model HN; 3000 fordulat/perc) eltávolítjuk. Az aktív anyagot tartalmazó felülúszót 0,45 µ-os cellulóz-acetát szűrőn (Sartorius) átengedjük, majd fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiás rendszerhez kapcsolt 0,45 x 25 cm-es Vydac^R 218 TP oszlop alkalmazásával végzünk. Egyenként mintegy 5 mg fehérjét tartalmazó adagokat kromatografáljuk 0,5 ml/perc áramlási sebességgel 2-propanolnak 0,1%-os trifluoracettsavban 10–50%-ig növekvő lineáris gradiensevel 70 percen át. A kapott kromatogramot a 2a. ábrán mutatjuk be. A 2–4. példákban leírt biológiai vizsgálatok kimutatták, hogy csak a mintegy 32,3 percnél lejjövő eluátum tartalmaz lényeges inzulinaktivitást. Azonos kromatográfiás körülmények mellett a marha inzulin 30 percnél eluálódik. Az aktív anyagot tartalmazó frakciókat besűrítjük, és azonos oszlopon ismételt kromatografáljuk, ebben az esetben 0,1%-os trifluoracettsavas 2-propanolt alkalmazunk 20–35%-ig lineárisan növekvő gradiens szerint 0,5 ml/perc áramlási sebességgel 85 percen át. Az elúciós mintát a 2b. ábrán mutatjuk be. Az aktív anyagot tartalmazó frakció mintegy 47,2 percnél eluálódik, ezt a frakciót összegyűjtjük, besűrítjük és a 2–4. példákban leírt biológiai vizsgálatokhoz használjuk fel. Azonos kromatográfiás körülmények között a marha inzulin mintegy 38 percnél eluálódik. Az A és B láncok előzőekben leírt kombinálásának eredménye 2 mg nagy tisztaságú termék. A tisztított, szintetikus úton előállított anyag savas hidrolízist követő aminosav analízise révén a következő, molarányokban kifejezett összetételt állapítottuk meg, amely jó egyezésben van az elméletileg várható értékekkel:

Asp_{4,0} Thr_{2,8} Ser_{3,1} Pro_{1,0} Glu_{7,0} Gly_{5,0} Ala_{1,1} Val_{3,4} Ile_{1,4} Leu_{5,9} Tyr_{3,6} Phe_{2,9} Lys_{1,1} His_{1,0} Arg_{1,0} (a ciszteint nem határoztuk meg).

2. példa

[B10-aszparaginsav]-humán inzulin aktivitásának vizsgálata inzulin receptor kötődési vizsgálattal

A receptor kötődési vizsgálatot patkánymáj plazma

membrán alkalmazásával végezzük Kitagawa és mtsai [Biochemistry 23, 1405–1413 (1984)] eljárásával. A patkánymáj plazma membránokat Horvat és mtsai [Biochem. Biophys. Acta 382, 609–620 (1975)] eljárásával nyerjük.

Röviden összefoglalva, három párhuzamos, 0,2 ml-es mintát inkubálunk, amelyek mindegyike 3x10⁻¹⁰ mól/liter ¹²⁵I inzulint, jelzetlen inzulint vagy az 1. példa szerint előállított [10-aszparaginsav-B] humán inzulint, és 0,6% marha szérum albumin V frakciót tartalmazó, 0,1 mól/literes pH= 7,4-es nátrium-foszfátban lévő, 20–40 µg fehérjének megfelelő plazma membránt tartalmaz. Az elegyet 45 percig 24 °C hőmérsékleten inkubáljuk, majd 2,0 ml jéghideg, 0,1% marha szérum albumin V frakciót tartalmazó 0,1 mól/literes, pH= 7,4-es nátrium-foszfáttal meghígítjuk, és azonnal cellulóz-acetát szűrőn szűrjük. A szűrőket a jéghideg pufferrel kétszer mossuk, szárítjuk, majd radioaktivitásukat szcintillációs számlálóval, Filtron-X^R alkalmazásával mérjük. Minden értékből levonjuk a nem specifikus kötődést, amelyet annak a mintának a szűrőn maradó radioaktivitásával határozzunk meg, amely 1x10⁻⁵ mól/liter jelzetlen inzulint tartalmaz az inkubációs elegyben. A relatív aktivitást a ¹²⁵I-inzulin receptor készítményhez való fajlagos kötődésének 50%-os gátlásához szükséges jelzetlen inzulin és ugyanezt a gátlást kiváltó [10-aszparaginsav-B] humán inzulin koncentrációjának arányaként nyerjük.

A 3. ábrán marha inzulin és [10-aszparaginsav-B] humán inzulin ¹²⁵I-inzulinnal patkánymáj-plazma membrán inzulin receptoraihoz való kötődésben való versengési képességét mutatjuk be. A kötődés gátlását a maximum %-ában kifejezve ábrázoljuk a kompetitor anyag koncentrációjának függvényében (kompetitív gátlás). A 3. ábrán szereplő adat pontok három meghatározás átlagát jelentik egy olyan vizsgálatban, amelyet négyszer ismételtünk. Ezekben a vizsgálatokban a maximális kötődés a bevitt radioaktivitás 8,2%-át teszi ki.

Amint az a 3. ábráról látható, a [10-aszparaginsav-B] humán inzulin és a marha inzulin dózis – hatásgörbéje lényegében párhuzamos. A [10-aszparaginsav-B] humán inzulinhoz viszonyított aktivitása – az előzőek szerint számolva – mintegy 543± 146%.

3. példa

[B10-aszparaginsav]-humán-inzulin aktivitásának vizsgálata lipogenezis vizsgálattal

Az inzulin-analógok aktivitásának meghatározását szolgáló lipogenezis vizsgálatokat Kitagawa és munkatársai (lásd fent) eljárásával végeztük. A vizsgálattal az inzulin analógnak azt a képességét hasonlítjuk marha inzulinéhoz, ahogy a [3-³H]-glükózt lipidekké alakítja.

Adipocitákat úgy nyerünk, hogy 200–300 g testtömegű hím patkányokból nyert mellékhere és vese körüli zsírpárnákat 1,0 mg/ml kollagenázzal 60 perce ná

zen, ezt követően sűrű szitájú selymen szűrjük át. A sejteket felhasználásra való szuszpendálást megelőzően klinikai centrifugán kétszer flotáljuk. A sejtek inkubálásához Krebs-Ringer hidrogén-karbonát oldatot alkalmazunk, amely az ajánlott kalciumnak a felét, 0,5 $\mu\text{mol/liter}$ glükózt és 3% zsírsavmentes marha szérum albumint tartalmaz, az inkubálásnál alkalmazott gázfázis 95% oxigént és 5% szén-dioxidot tartalmaz. A lipogenezis vizsgálatot három párhuzamos minta inkubálásával végezzük. A minták 1,0 ml adipocita szuszpenziót (20–40 mg száraz sejtömeg) és marha inzulint vagy az 1. példa szerint előállított [B10-aszparaginsav]-humán-inzulint tartalmaznak. A sejteket a $[3\text{-}^3\text{H}]$ glükóz adagolása előtt 37 °C hőmérséklete n45 percen át inkubáljuk. Az inkubálást a glükóz hozzáadása után 60 percig folytatjuk, majd a reakciót 0,2 ml 5 n kénsav hozzáadásával állítjuk le, és 0,2 ml kukoricaolajat adunk az elegybe a lipidek extrakciójának elősegítésére. A mintákat 10 ml Soluscint-OR-val 30 percig szobahőmérsékleten extraháljuk, mielőtt a radioaktivitást szcintillációs számlálóval mérnénk. Ezen körülmények mellett a $[3\text{-}^3\text{H}]$ glükóz nem extrahálódik a szcintillátort tartalmazó szerves fázisba, így lényegében nem járul hozzá a mért értékhez. Az inzulin nélkül, illetve a $9,1 \times 10^{-10}$ mol/liter (5,5 ng/ml) inzulin jelenlétében észlelt radioaktivitást határozzuk meg, mint a lipogenezis fokozásának 0 és 100%-át. A relatív aktivitást a lipogenezis maximális fokozásának 50%-a eléréséhez szükséges inzulin és [10-aszparaginsav B] humán inzulin koncentráció-arányaként kapjuk.

A 4. ábrán $[3\text{-}^3\text{H}]$ glükóznak szerves-extrahálható anyagokká (azaz lipidekké) való átalakulásának fokozását mutatjuk be izolált patkány adipocitákban az 1. példa szerint előállított [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin és marha-inzulin hatására. A lipogenezis fokozását a maximum %-ában kifejezve az agonista koncentráció függvényében ábrázoljuk. Az adat pontok három meghatározás átlagát jelentik olyan vizsgálatban, amelyet négyszer ismételtünk. A vizsgálatokban a 0% és 100% stimulálás 0,3 illetve 3,5 nmol glükóz/mg sejt/óra értéknek felel meg.

A 4. ábrán látható értékek azt mutatják, hogy a [10-aszparaginsav-B] humán inzulin a vizsgálatokban teljes agonistaként hat, a lipogenezisnek ugyanazt a maximális fokozását éri el, mint a természetes marha inzulin.

A [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin relatív aktivitását azonban számítások szerint a marha-inzulinénak $435 \pm 144\%$ -aként állapítottuk meg.

A [B10-aszparaginsav]-humán-inzulinnak a 2. példa szerinti receptor kötődési vizsgálatban, valamint a jelen lipogenezis vizsgálatban kapott aktivitási értékeit nem találtuk statisztikailag különbözőnek (Student t-tesztel 0,4p0,3).

Így nyilvánvalóvá válik, hogy a [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin szuperaktív inzulin, amely in vitro a természetes inzulin aktivitásának mintegy ötszörösével bír.

4. példa

[B10-aszparaginsav]-humán-inzulin radioimmunológiai vizsgálata

Kitagawa és mtsai (lásd fent) eljárásával radioimmunológiai vizsgálatot végzünk annak megállapítására, hogy a [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin immunológiailag megkülönböztethető-e a természetes inzulintól.

Sértés inzulin elleni tengerimalac antiszérumot és kecske anti-tengerimalac- γ -globulint alkalmazunk a vizsgálati pufferben 1:25 hígításban. Pufferként 0,04 mol/liter es pH= 7,6-os nátrium-foszfát puffert alkalmazunk, amely 0,154 mol/liter nátrium-kloridot, 0,1% zselatint és 0,01% thimerosalt is tartalmaz. Párhuzamos vizsgálatokat végzünk, egy-egy cső 0,1 ml antiinzulin antiszérumot, 0,072 ng ^{125}I -inzulint és 0,06–0,36 ng marha-inzulint vagy 1–4,0 ng, az 1. példa szerint előállított [B10-aszparaginsav]-humán-inzulint tartalmaz 0,8 ml össz-térfogatban. Az elegyet éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 0,2 ml precipitáló antitestet (kecske anti-tengerimalac- γ -globulin) adunk hozzá, és a csöveket éjszakán át szobahőmérsékleten tovább inkubáljuk. Az immunprecipitátumot cellulóz-acetát szűrőn gyűjtjük, és egymást követően kétszer 1,0–1,0 ml jéghideg vizsgálati pufferrel mossuk. A szűrőket szárítjuk, és a radioaktivitást szcintillációs számlálón mérjük (Filtron-XR-ban). A C_1/C_2 pontokból alkotott egyenes alapján lineáris regressziós analízist végzünk Hales szerint [Biochem. J. 88, 137–146 (1963)] és a [B10-aszparaginsav]-humán-inzulinnak a marha-inzulinhoz viszonyított aktivitását a fenti pontokból adott egyenesek meredekségének arányaként adjuk meg.

A szintetikus előállított [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin mintegy azonos aktivitást mutatott a radioimmunológiai vizsgálatban marha és sertés inzulinnal szemben. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a B¹⁰ helyzetben lévő hisztidinnek aszparaginsavra történő kicserélése nem okozott jelentős hatást a molekula immunogén determinánsaira.

5. példa

dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin előállítása

Dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulint állítunk elő peptidszintézissel fragmens kondenzációs eljárást alkalmazva. [Lásd például a Blake és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 1556–1559 (1983) szakirodalmi helyen.] Minden peptidszármazék köztitermék homogenitását vékonyrétegekromatográfiás vizsgálattal ellenőrizzük 6060 jelű szilikagél lemezen (Eastman kromatográfiás lemez). A kromatogram kifejlesztésére oldószer-rendszerként kloroform, metanol és víz elegyét alkalmazzuk (45:10:1; 89:10:1; és 200:75:13 arányban).

dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulint állítunk elő az S-szulfonált-humán-inzulin A láncnak a szintetikus előállított S-szulfonált-humán-inzulindez-pentapeptid (B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr- α -karboxamid 23] B láncsal

ditiotreitol jelenlétében a 4 421 685 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett módon végzett kombinálásával. Az S-szulfonált humán A láncot, amely a sertés inzulin megfelelő láncával azonos [Nicol és mtsai., *Nature*, 181, 483-485 (1960)] sertés-inzulin oxidatív szulfitolízisével állítjuk elő, és a kapott S-szulfonált A és B láncokat Katsoyannis és mtsai [Biochemistry 6, 2635-2624 (1967)] oszlopkromatográfiás eljárásával különítjük el egymástól. Az S-szulfonált, kétszeresen módosított B lánc szintézisét lépésenkénti szilárd fázisú szintézissel valósítjuk meg, amelyhez szilárd hordozóként 1 g 4-metil-benzhidril-amin gyantát (0,5 mmól amin/g) alkalmazunk a Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149-54 (1963) és Barany és mtsai „The Peptides”, kiadó Gross és mtsai, 2, 1-284, Academic Press (New York, 1980) szakirodalmi helyen leírt eljárások szerint. Az N védelmére Boc csoportot alkalmazunk, kivéve az N-terminális fenilalanin-egységet, amelyet benzil-oxi-karbonil-csoporttal védünk.

A II. táblázatban néhány, a peptidszintézis során alkalmazott védendő vegyületet és aminosav védőcsoportot tüntetünk fel.

II. táblázat

Védőcsoport	Védett vegyület
benzil-csoport	szerin
ciklohexil-csoport	glutaminsav és aszparaginsav
benzil-oxi-metil-csoport	hisztidin
2,6-diklór-benzil-csoport	tirozin
N ^G -p-toluol-szulfonil-csoport	arginin
4-metil-benzil-csoport	cisztein

Manuális, kettős kapcsolási eljárást követünk Merrifield és mtsai eljárásával [Biochem., 21, 5020-31 (1982)] aktivált védett aminosavaknak (1-hidroxibenzotriazol-dicikloheptil-karbodiimid dimetil-formamidban) háromszoros feleslegben való alkalmazásával. A reakció lejártszódását kvalitatív ninhidrin teszttel Kaiser és mtsai eljárásával [Anal. Biochem., 34: 595-98 (1970)] követjük nyomon, a teszt minden kettős kapcsolás után negatív.

A lánc kialakítása után a gyantához kötött peptidet metilén-kloriddal és metanollal alaposan kimossuk, majd 3,0 g végső tömegig szárítjuk. Ennek a terméknek egy 700 mg-os részéről a védőcsoportokat alacsony-magas hidrogén-fluorid eljárással Tam és munkatársai szerint [J. Am. Chem. Soc., 105, 6442-55 (1983)] eltávolítjuk. Az első lépésben a peptid-gyantát 1 ml p-krezolt, 6,5 ml dimetil-szulfidot és 2,5 ml folyékony hidrogén-fluoridot tartalmazó eleggyel reagáltatjuk. Az elegyet 2 órán át 0 °C hőmérsékleten tartjuk, majd vákuumban bepároljuk, és a visszamaradó anyagot 10 ml folyékony hidrogén-fluoriddal 1 órán át 0 °C hőmérsékleten reagáltatjuk. Ezután a hidrogén-fluoridot eltávolítjuk, és a visszamaradó anyagot etil-acetáttal és petroléterrel eldörzsöljük. A terméket

0,1 mól/literes, pH= 8,8-as trisz-HCl pufferrel puffertolt 20 ml 8 mól/literes guanidin-hidrogén-kloridban szuszpendáljuk, és a szuszpenzióhoz 700 mg nátrium-szulfidot és 500 mg nátrium-tetratónát adunk. Az elegyet 3 órán át szobahőmérsékleten reagáltatjuk, majd kiszűrjük belőle a gyantát, és a szűrletet Spectrapor No 3 membrán csőbe helyezzzük, és egyenként 4 liter vízzel szemben a víz négyszeri váltásával 4 °C hőmérsékleten 24 órán át dializáljuk. A dializátum liofilizálásával 250 mg nyers S-szulfonált B lánc analógot nyerünk fehér por formájában.

A liofilizált anyagot 0,02 mól/liter pH= 7,5-ös trisz.HCl puffert tartalmazó, 2:1 térfogatarányú víz - 2-propanol elegyben oldjuk, és nagynyomású folyadékkromatográfiás ioncserélő eljárással tisztítjuk, amelyet LKB folyadékkromatográfiás rendszerhez kapcsolt Synchropak AX 300 oszlopon (1x25 cm) végzünk. Mintegy 70 mg fehérjét tartalmazó adagokat kromatografálunk, az előzőekben említett oldószert alkalmazzuk 0,5 mól/liter nátrium-klorid 0-80% közötti lineáris gradiensevel, 1,5 ml/perc áramlási sebességgel 140 percen át. A kromatogramot az 5. ábrán mutatjuk be. A fő csúcsot kitevő eluátumot (mintegy 60 percnél jön le) vákuumban eredeti térfogatának mintegy felére sűrítjük be, desztillált vízzel szemben dializáljuk (Spectrapor No 3 membráncső), majd liofilizáljuk. A 250 mg nyerstermékből 150 mg tisztított terméket nyerünk fehér, laza por formájában. A tisztított S-szulfonált B lánc analóg savas hidrolízist követő aminosav analízise a következő, molarányokban kifejezett összetételt eredményezte, amely összetétel az elméleti értékek alapján várt összetételnek megfelelő, az elméleti értékeket zárójelben tüntetjük fel: Asp_{1,9(2)} Ser_{1,0(1)} Glu_{3,0(3)} Gly_{3,0(3)} Ala_{1,1(1)} Val_{2,7(3)} Leu_{3,8(4)} Tyr_{1,9(2)} Phe_{2,0(2)} His_{0,9(1)} Arg_{1,0} (1) (A ciszteint nem határoztuk meg.)

5. Példa

Dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulin előállítása és elkülönítése

20 mg S-szulfonált humán (sertés) A lánc és 10 mg S-szulfonált humán dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp¹⁰, Tyr-α-karboxamid²⁵] B lánc 6 ml 0,1 mól/literes, pH= 10,6-os glicin pufferben készült, 4 °C hőmérsékletre hűtött oldatához 3,5 mg ditiotreitolat majd 1 ml jégcettel meghígítjuk, és a kapott csapadékot centrifugálással (international Centrifuge, Model HN; 3000 fordulat/perc) eltávolítjuk. Az aktív anyagot tartalmazó felülúszót 0,45 μ-os cellulóz-acetát szűrőn (Sartorius) átengedjük, majd fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással tisztítjuk, amelyet LKB folyadékkromatográfiás rendszerhez kötött Vydac^R 218 TP oszlopon (0,45x25 cm) végzünk. Egyenként 5 mg fehérjét tartalmazó adagokat kromatografálunk, 0,1% trifluor-ecetsavas 2-propanolt alkalmazunk 10-50% lineáris gradiens szerint, 0,5 ml/perc áramlási sebességgel 70 percen át. A kromatogramot a 6a. ábrán mutatjuk be. Az inzulin meghatározás alapján azonosított aktív anyag tartalmú

frakciót besűrítjük, és azonos oszlopon ismételtén kromatografáljuk. A kromatografálást 0,1% trifluor-ecetsav-2-propaniol 20–35% lineáris gradiensével végezzük 0,5 ml/perc áramlási sebességgel 110 percen át. A kromatogramot a 6b. ábrán mutatjuk be. Az aktív anyagot tartalmazó frakciót, amely mintegy 63,1 percenél jön le, összegyűjtjük és liofilizáljuk. Az A és B láncok fenti elegyéből 1,4 mg nagy tisztaságú terméket nyerünk. A tisztított szintetikus anyag hidrolízist követő aminosav analízise az alábbi, molarányokban kifejezett összetételt mutatja, amely értékek jó egyezésben vannak az elméleti értékekkel (utóbbiak zárójelben):

Asp_{4,1(4)} Thr_{0,9(1)} Ser_{3,0(3)} Glu_{7,0(7)} Gly_{3,8(4)}
Ala_{1,1(1)}
Val_{3,3(4)} Ile_{1,4(2)} Leu_{6,0(6)} Tyr_{3,8(4)} Phe_{2,0(2)} His_{1,0(1)} Arg_{0,9(1)} (A ciszteint nem határoztuk meg.)

7. példa

Dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulin aktivitásának meghatározása inzulin receptor kötődési vizsgálattal

A 2. példában ismertetett vizsgálatot végezzük el.

A 7. ábrán marha-inzulinak és dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulinak ¹²⁵J-inzulinnal való kompetícióját mutatjuk be patkánymáj-plazma membrán inzulin receptorjaihoz való kötődés vizsgálatában. A kötődés gátlását – a maximum százalékában kifejezve – a kompetitor koncentráció függvényében tüntetjük fel. A 7. ábrán szereplő adat-pontok három meghatározás átlagát jelentik olyan vizsgálatban, amelyet négy alkalommal ismételtünk meg a szintetikusan előállított vegyület három különféle készítményének alkalmazásával. Ezekben a vizsgálatokban a ¹²⁵J-inzulinnak kompetitor távollétében való kötődése a bevitt radioaktivitás 9,1%-át tette ki, míg a nem-specifikus kötődés az összes kötődésnek 9,6%-a volt.

Amint az a 7. ábrából látható, a szintetikus vegyületek az a koncentrációja, amelyben a fajlagosan kötött ¹²⁵J-inzulin 50%-át helyettesíti, több mint tízszer alacsonyabb, mint a természetes inzulin hasonló hatást kiváltó koncentrációja. Az előzőekben ismertetett számítások szerint a dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulin aktivitása a marha inzulin aktivitásának mintegy 1166 ± 31,2%-a.

8. példa

Dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulin aktivitásának meghatározása lipogenezis vizsgálattal

A 3. példában leírt vizsgálatot végezzük el.

A 8. ábrán látható az 5. példa szerint előállított dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulin és marha-inzulin izolált patkány adipocitában kiváltott [³H]-glükóz szerves extrahálható anyagokká (azaz lipidekké) való átalakulását stimuláló hatása. A maximum %-ában kifejezett stimuláló hatást az agonista koncentráció függvényében ábrázoljuk.

Az adat-pontok három meghatározás átlagát jelentik, olyan kísérletben, amelyet négyszer ismételtünk meg a szintetikus úton előállított vegyület három különböző készítményét alkalmazva. A vizsgálatokban a 0 és 100% stimulálás 11,4, illetve 78,8 nmól glükóz/mg sejt/óra értékekre vonatkozik.

A 8. ábrán bemutatott adatok azt mutatják, hogy a dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulin a lipogenezis stimulálása maximumának felét lényegesen alacsonyabb koncentrációban váltja ki, mint a természetes marha-inzulin. A dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulinnak a marha inzulinra vonatkoztatott relatív aktivitását 1352 ± 114% értéknek találtuk. A lipogenezis maximális stimulálása a két vegyület esetén azonos.

A fentiekből nyilvánvaló, hogy a dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulin, amely in vitro körülmények között 11–13-szor nagyobb aktivitású a természetes inzulinnál.

Az Asp^{B10} analóg előállításával azonos módon előállított és elkülönített dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Glu^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulin a természetes inzulinhoz viszonyítva hússzoros aktivitásúnak bizonyult.

9. példa

Dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulin radioimmunológiai vizsgálata

A 4. példában leírt vizsgálati módszert követjük.

A szintetikus úton előállított dez-pentapeptid-(B26–B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}-α-karboxamid]-humán-inzulin a radioimmunológiai vizsgálatban közelítőleg azonos aktivitást mutat marha és sertés inzulinra. Ez az eredmény azt mutatja, hogy azok a szerkezeti változások, amelyek az inzulin receptorokhoz való erősebb kötődést eredményezik, és amelyek egyidejűleg magasabb in vitro inzulin-szerű aktivitást eredményeznek, nem okoznak a szintetikus úton előállított vegyületben a molekula immunogén meghatározóira jelentős hatást.

Az alábbiakban a példákban kapott eredményeket értékeljük.

Korábban Rtg-sugár elemzések kimutatták, hogy a B¹⁰ helyzetben lévő hisztidin az inzulin monomer felszínén található, és jelentős szerepe van a cink-inzulin hexamerek képződésében [lásd a Blondell és mtsai, Adv. Prot. Chem., 26, 279–402 (1972) szakirodalmi helyen]. A korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a B¹⁰-helyzetű hisztidinnak leucinra, lizinre vagy aszparaginra való kicserélése révén kapott szintetikus inzulin analógok csökkent biológiai aktivitással bírnak, aktivitásuk a természetes hormonra vonatkoztatva mintegy 14–45%. [Lásd a Schwarz és mtsai, J. Chem. Res. (S), 220–221 (1977); J. Chem. Res. (M), 2453–2469 (1977); Schwartz és mtsai, J. Prot. Chem., J. Prot. Chem., 177–189 (1982); Burke és mtsai, Int. J. Protein Res., 23, 394–401 (1984) szakirodalmi helyeken]. A vizsgálatokból az a következtetés vonható le,

hogy a B¹⁰-helyzetben lévő egység hidrofíli jellege viszonylag kevésbé fontos az inzulin biológiai aktivitásának szempontjából, és egy erősen bázikus aminosav maradéknak ebben a helyzetben való előfordulása, káros e tekintetben. Azt is feltételezték továbbá, hogy az a körülmény, hogy a fiziológiai állapothoz közeli pH-n a B¹⁰-helyzetű egység protonált vagy nem protonált állapotban is képes legyen jelen lenni, ami a hisztidin egységre önmagára jellemző, a nagy biológiai aktivitás szempontjából szükséges. [Lásd Burke és munkatársai (fent) szakirodalmi helyen.] Azonban a [B10-aszparaginsav]-humán-inzulint, amely fiziológiai pH-n a B¹⁰-helyzetben negatív töltéssel bír, a példák tanúsága szerint in vitro néhányszor aktívabbnak találtuk a természetes inzulinnál.

A [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin szuperaktivitása láthatóan az inzulin receptorokhoz való erősebb kötődéséből adódik. Feltételezzük, hogy az analógnak a receptorhoz való erősebb kötődése az analóg konformációjában bekövetkezett olyan változás következménye, amely alkalmasabbá teszi a receptorhoz való kötődésre, és ez a változás a B¹⁰-helyzetben lévő negatív töltést érintő intramolekuláris kölcsönhatások eredménye (például egy só híd). Más lehetőség szerint az erősebb kötődés származhat a receptornak egy pozitív töltéssel bíró komplementer felületével való közvetlen kölcsönhatásból is. A fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárásnál, amint azt a 2. ábrán bemutattuk, a [B10-aszparaginsav]-humán inzulin két különböző kromatográfiás körülmény megvalósítása esetén is szignifikánsan később eluálódott, mint a természetes inzulin. Ez a viselkedés azt jelzi, hogy a szintetikus analóg az apolárosabb molekula. A természetes inzulin, és a [B10-aszparaginsav]-humán-inzulin polaritása közötti nagy differencia nem tulajdonítható annak, hogy egy hidrofíli maradékot egy másikkal helyettesítettünk. A polaritásban jelentkező különbség legésszerűbb magyarázatának azt tartjuk, hogy a polaritás-különbség egy konformációbeli változást tükröz, amely feltehetően az analógnak az inzulin receptorhoz való erősebb kötődését eredményezi.

A dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin két módosulatot foglal magában, amelyek az inzulin molekulába külön bevive a természetes hormonénál nagyobb aktivitással bíró analógok létrejöttéhez vezetnek. Ezek a módosulatok a következők: i) a B26-B30 szegmens eliminációja és a Phe B25 helyen Tyr- α -karboxamid helyettesítő és ii) a His B10 helyettesítése Asp-val. Ez az analóg, a dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin, az ezideig leírt leghatásosabb inzulin. Biológiai aktivitása nagyobb, mint a bármelyik módosulatot önmagában tartalmazó analógok aktivitásának összege. Ez a felismerés arra a feltételezésre vezet, hogy a B25 és B10 helyek az inzulin külön receptor-kötő területeinek konformációját nagy receptor-kötő affinitással bíró helyekké módosíthatják. Valójában az inzulin-receptor komplex különböző szövetekben lévő nagy asszociációs konstansa (mintegy 10⁹ M

¹) feltehetőleg néhány kötődő faj összehangolt hatását teszi szükségessé. A B10-helyzetben lévő hisztidin maradék nem tartozik azok közé a részek közé, amelyekről feltételezzük, hogy hozzájárul ahhoz, hogy a receptor felismerje az inzulint [Blundell és mtsai., Adv. Protein Chem., 26, 279-482 (1972); Blundell és mtsai., Nature (London), 257, 197-203 (1975); Pullen és mtsai., Nature (London), 259, 369-72 (1976)]. Azonban az [Asp^{B10}]-inzulin ([10-aszparaginsav-B] inzulin) megnövekedett aktivitása, valamint a [Leu^{B10}]-, [Asn^{B10}]- és [Lys^{B10}]-inzulinok csökkent aktivitása, Schwartz és mtsai., J. Chem. Res., 220-21 (1977); Schwartz és mtsai., J. Protein Chem. 1, 177-89 (1982); Burke és mtsai., Int. J. Pept. Prot. Res., 23, 394-401 (1984)], azt mutatják, hogy az ebben a helyzetben történő helyettesítések mélyreható hatással bírnak a kapott molekulának az inzulin receptorral való kölcsönhatási képességére, és egy biológiai válasz elindítására. A hozzáférhető adatokból nem dönthető el egyértelműen, vajon a B10 hely része-e egy receptor-kötődési területnek, vagy a B10 helyen bekövetkező módosítás egy távolodó kötődési területre van hatással. Ezen analógok igen nagy aktivitásának számbavételével számos modell feltételezhető. A B25 és B10 helyek lehetnek az inzulin külön receptor kötési helyeinek elemei, amelyek a B25 és B10 helyzetben lévő egységek módosításával külön változtathatók és a találmány szerinti, receptor kötődés iránt nagy affinitási állapotú analógokhoz vezetnek. Ezen kívül a B25 és B10 egységek módosítása egymástól függetlenül és egymással összhangban kedvezően befolyásolhatja más, az inzulin fontos receptor kötési területeit képező régiók konformációját.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az (I) képletű szuperaktív humán-inzulin-analóg előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az inzulin-analóg ismert módon előállított S-szulfonát formájú A és B láncát – előnyösen diitiotreitől – redukálószer jelenlétében egyesítjük. (Elsőbbsége: 1987.07.17.)

2. Eljárás a (II) és (III) képletű, a B10 helyzetben aszparaginsavat vagy glutaminsavat tartalmazó dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin-analógok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az inzulin-analóg ismert módon előállított S-szulfonát formájú A és B láncát – előnyösen diitiotreitől – redukálószer jelenlétében egyesítjük. (Elsőbbsége: 1988.07.07.)

3. Eljárás diabetesz kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerint előállított [10-aszparaginsav-B]-humán-inzulin szuperaktív humán-inzulin-analógot gyógyászati célra alkalmas hordozó- és/vagy segédanyaggal összekeverjük, és gyógyászati készítménnyé alakítjuk. (Elsőbbsége: (1987.07.17.)

4. Eljárás diabetesz kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 2. igénypont szerint előállított dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Asp^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin

vagy dez-pentapeptid-(B26-B30)-[Glu^{B10}, Tyr^{B25}- α -karboxamid]-humán-inzulin szuperaktív humán-inzulin-analógot gyógyászati célra alkalmas hordozó- és/vagy segédanyaggal összekeverjük, és gyógyászati készítménnyé alakítjuk. (Elsőbbsége: 1988.07.07.)

5. A 3. igénypont szerinti eljárás intramuszkuláris adagolásra alkalmas készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy intramuszkuláris készítmények előállítására szokásosan használt hordozó- és/vagy segédanyagokat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1987.07.17.)

6. A 3. igénypont szerinti eljárás szubkután adagolásra alkalmas készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy szubkután adagolású készítmények előállítására szokásosan alkalmazott hordozó- és/vagy segédanyagokat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1987.07.17.)

7. A 3. igénypont szerinti eljárás intravénás adagolás céljára alkalmas készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy intravénás adagolású készítmények előállítására szokásosan használt hordozó- és/vagy segédanyagokat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1987.07.17.)

8. A 3. igénypont szerinti eljárás beültethető szivattyúval adagolható készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy beültethető szivattyúval adagolható készítmények előállítására szokásosan használt hordozó- és/vagy segédanyagokat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1987.07.17.)

9. A 3. igénypont szerinti eljárás orr-permet formájában adagolható készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy orr-permet formájában adagolható készítmények előállítására szokásosan használt hordo-

zó- és/vagy segédanyagokat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1987.07.17.)

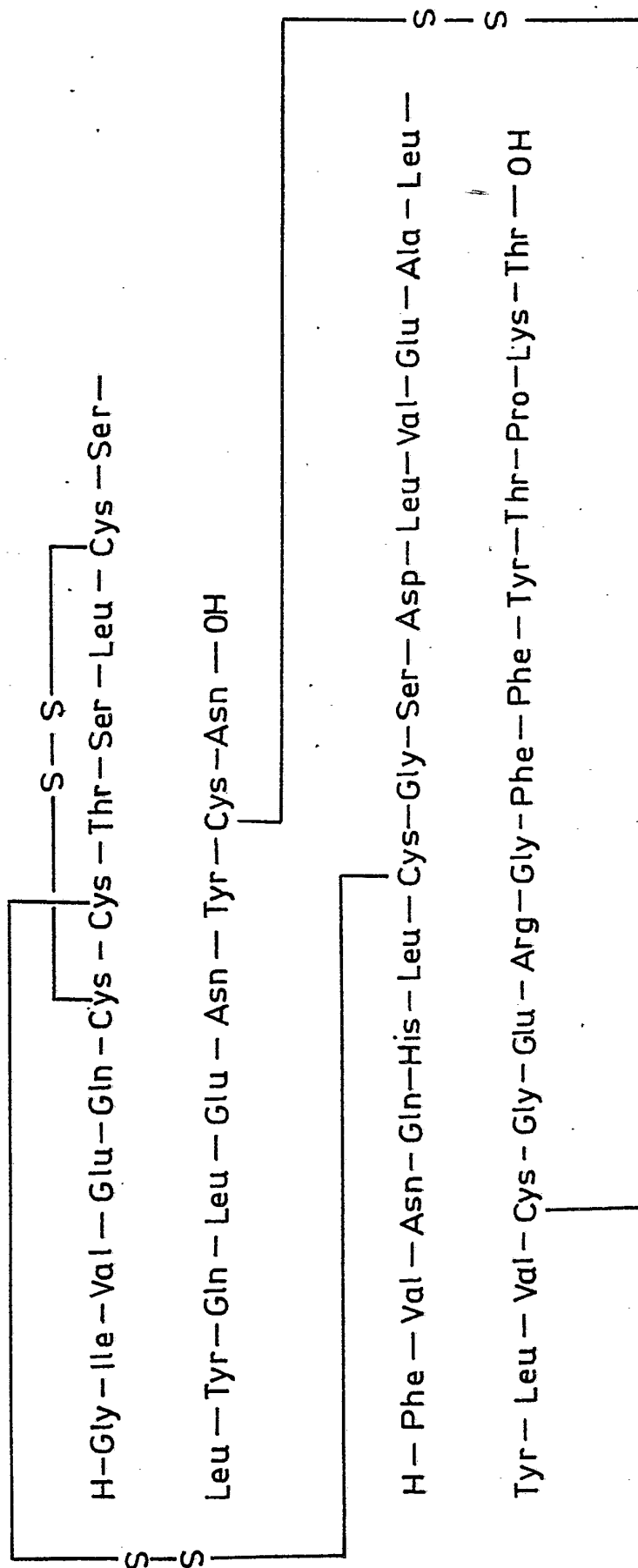
10. A 4. igénypont szerinti eljárás intramuszkuláris adagolásra alkalmas készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy intramuszkuláris készítmények előállítására szokásosan használt hordozó- és/vagy segédanyagokat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988.07.07.)

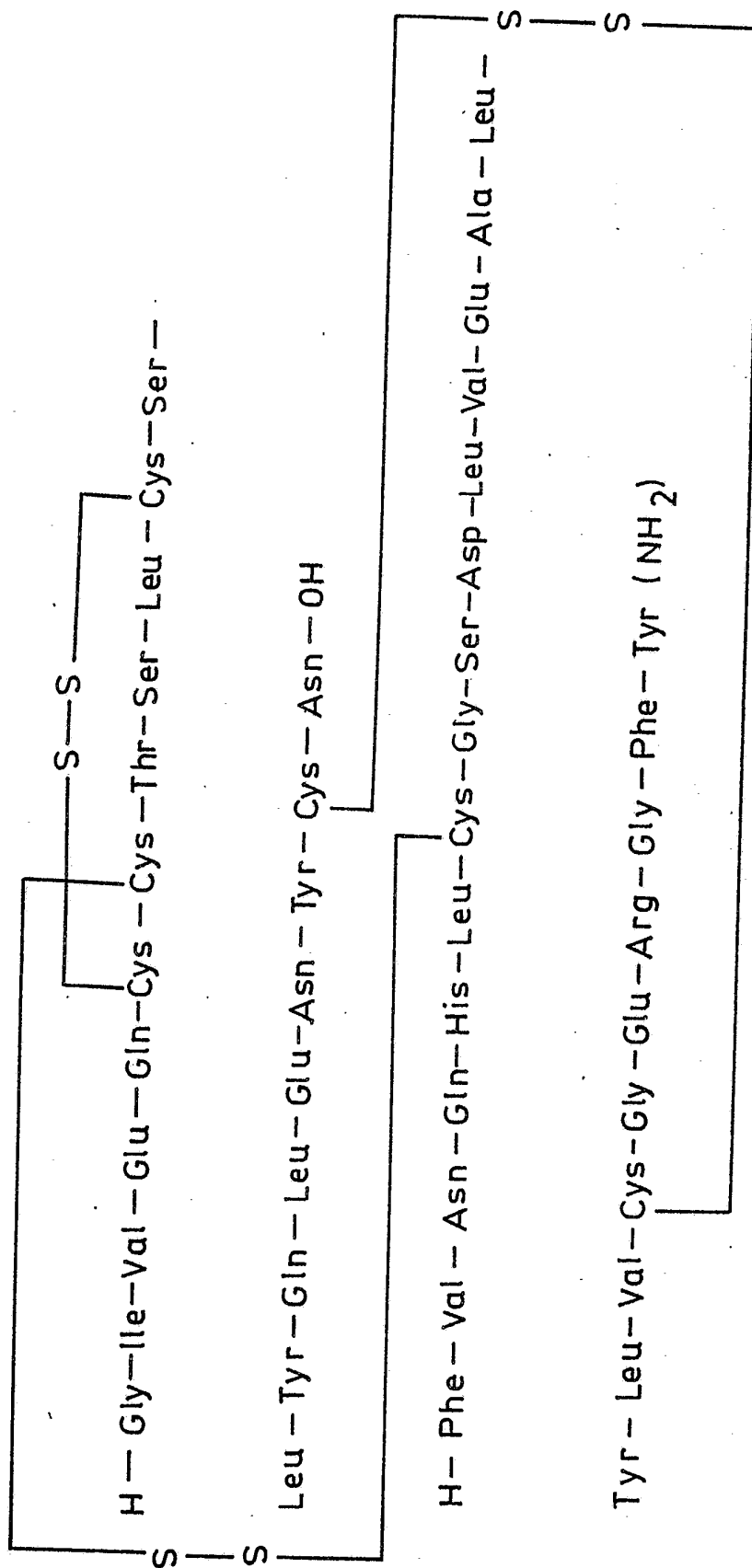
11. A 4. igénypont szerinti eljárás szubkután adagolásra alkalmas készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy szubkután adagolású készítmények előállítására szokásosan alkalmazott hordozó- és/vagy segédanyagokat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988.07.07.)

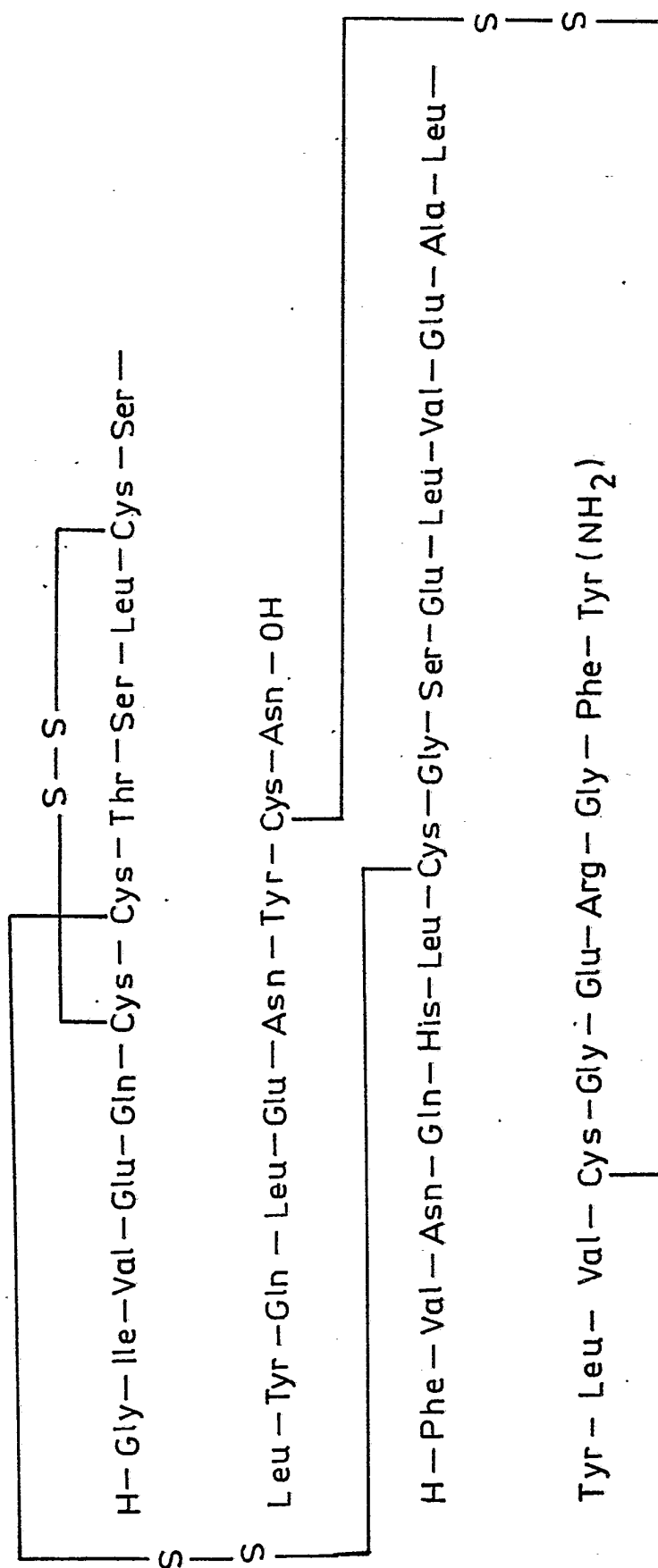
12. A 4. igénypont szerinti eljárás intravénás adagolás céljára alkalmas készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy intravénás adagolású készítmények előállítására szokásosan használt hordozó- és/vagy segédanyagokat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988.07.17.)

13. A 4. igénypont szerinti eljárás beültethető szivattyúval adagolható készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy beültethető szivattyúval adagolható készítmények előállítására szokásosan használt hordozó- és/vagy segédanyagokat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988.07.07.)

14. A 4. igénypont szerinti eljárás orr-permet formájában adagolható készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy orr-permet formájában adagolható készítmények előállítására szokásosan használt hordozó- és/vagy segédanyagokat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988.07.07.)

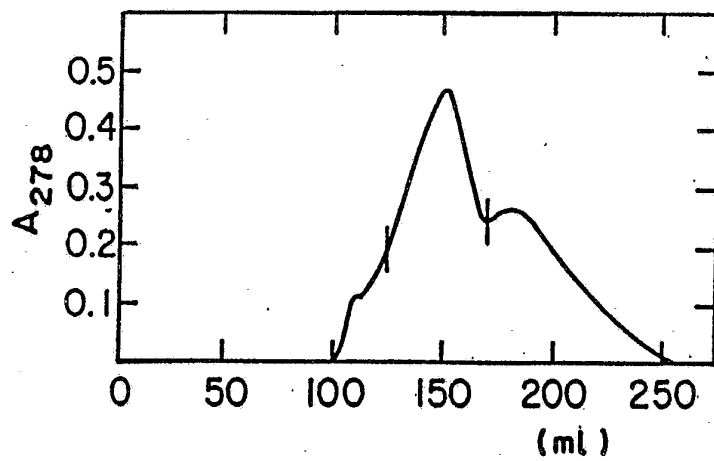




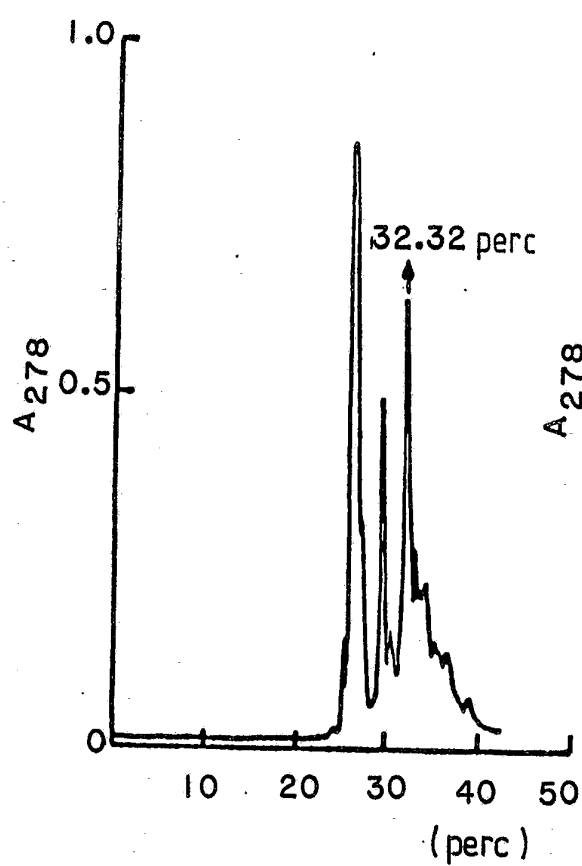


(III)

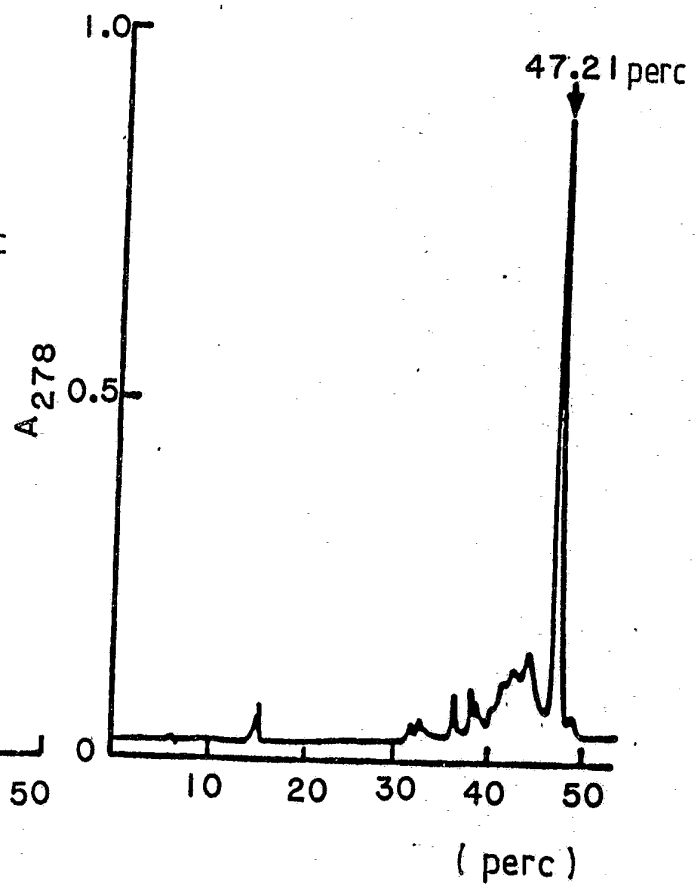
HU 205 145 B
Int. Cl.⁵: C 07 K 7/40



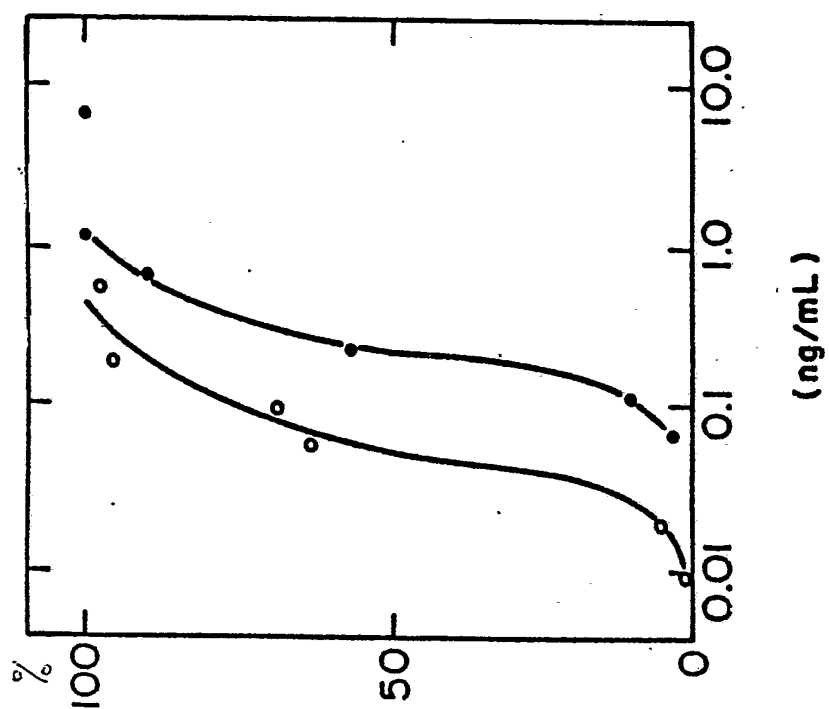
1. ábra



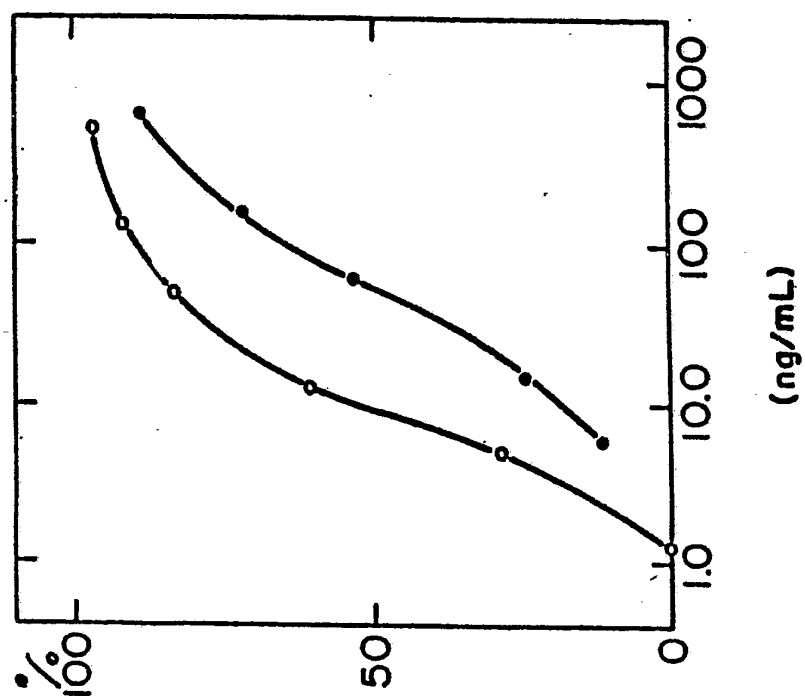
2.a ábra



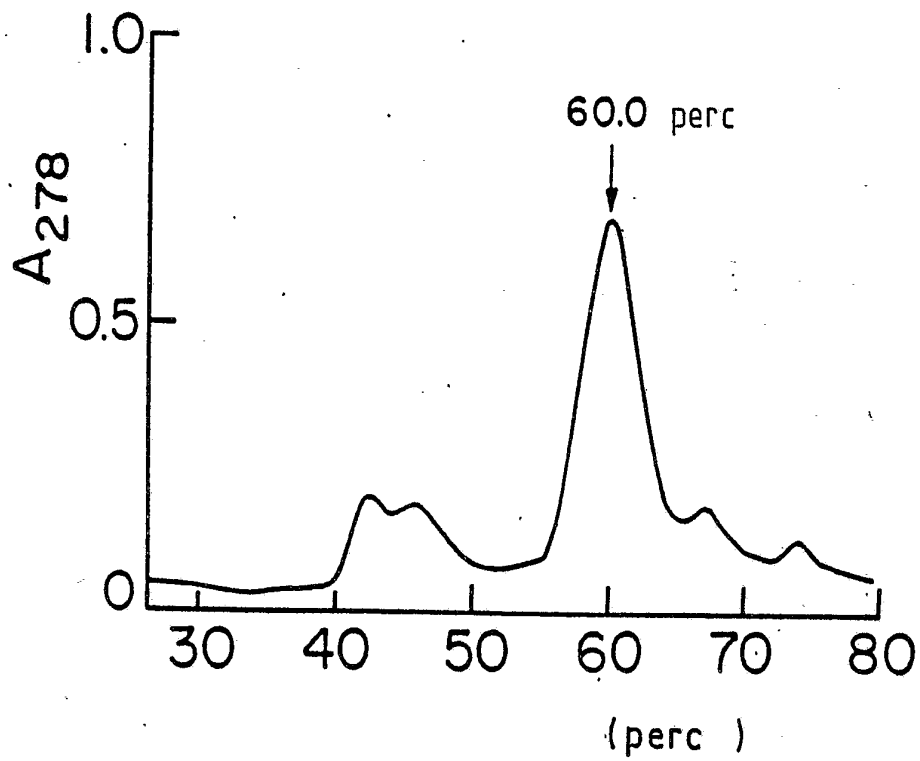
2.b ábra



4. abra

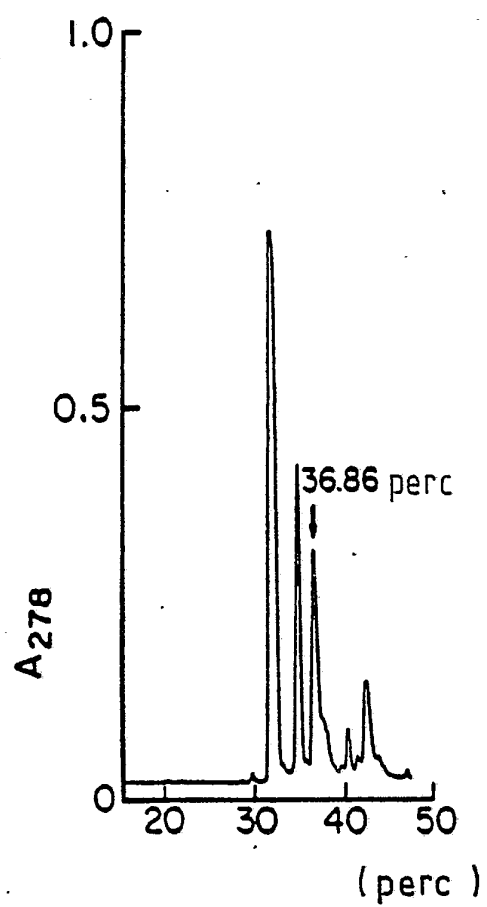


3. abra

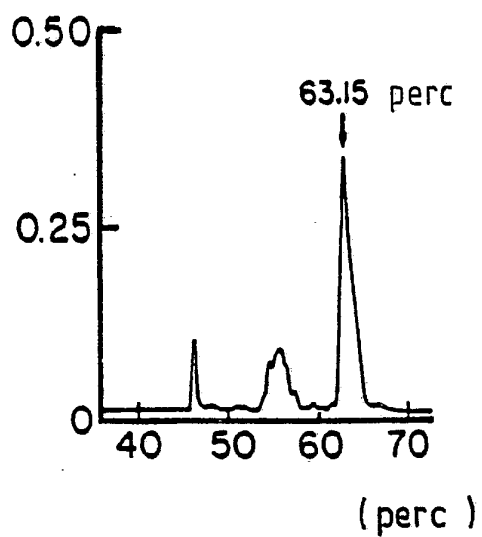


5. ábra

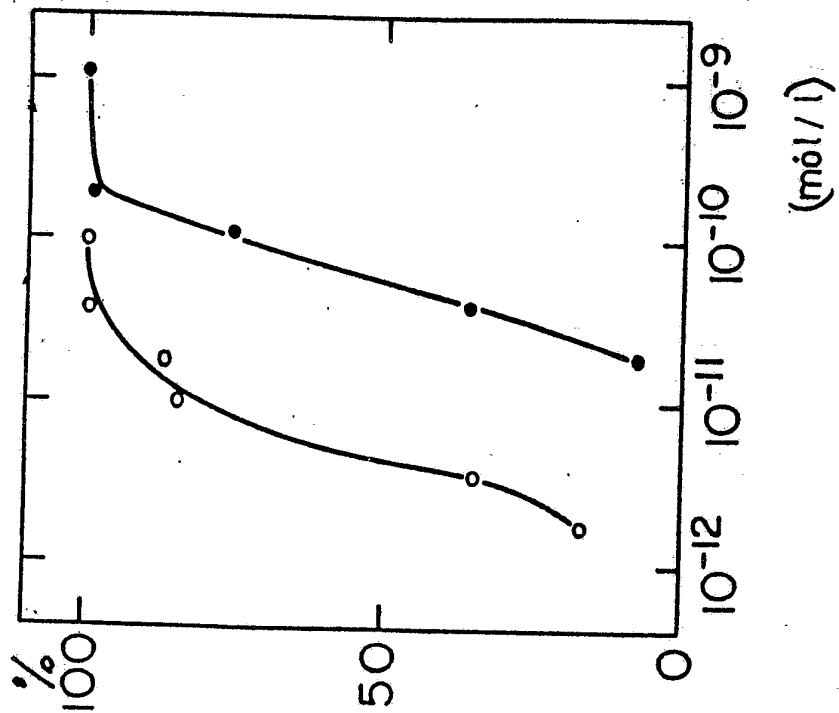
HU 205 145 B
Int. Cl.⁵: C 07 K 7/40



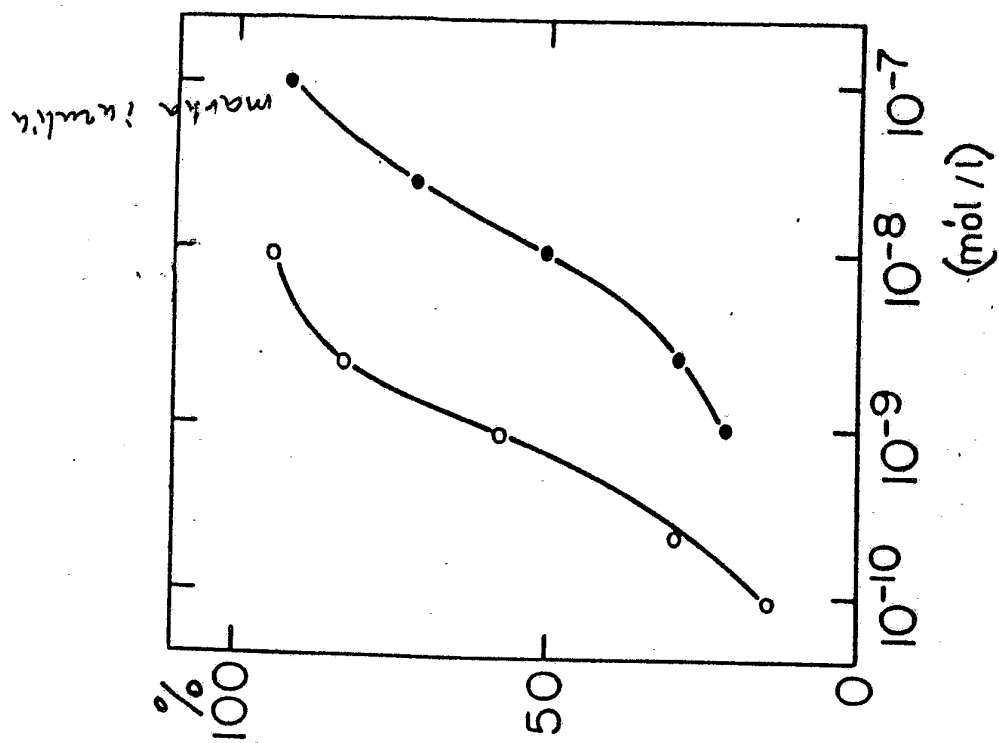
6.a ábra



6.b ábra



8. ábra



7. ábra