

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

290 341

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1992 - 2553

(22) Přihlášeno: 19.08.1992

(30) Právo přednosti:
20.08.1991 DE 1991/4127495

(40) Zveřejněno: 17.03.1993
(Věstník č. 3/1993)

(47) Uděleno: 14.05.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.07.2002
(Věstník č. 7/2002)

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 K 9/00

C 12 P 19/26

A 61 K 38/00

A 61 K 31/715

(73) Majitel patentu:

HOECHST AKTIENGESellschaft, Frankfurt
am Main, DE;

(72) Původce vynálezu:

Müller Günter dr., Sulzbach, DE;
Tripier Dominique dr., Eppstein/Taunus, DE;
Müllner Stefan dr., Hochheim am Main, DE;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr. advokát, Žitná 25, Praha 1,
11504;

(54) Název vynálezu:

**Fosfoinositolglykanová sloučenina s účinkem
podobným inzulinu, způsob její výroby, léčivo
tuto látku obsahující a její použití**

(57) Anotace:

Řešení se týká fosfoinositolglykanových sloučenin s účinkem podobným inzulinu, získatelných štěpením adenosin-3',5'-cyklický monofosfát-vazebného proteinu a/nebo jeho fyziologicky přijatelných solí, obsahujících fosfoinositolglykan a ethanolamin a jejich fyziologicky přijatelných solí, způsobu jejich výroby a jejich použití, obzvláště jako léčiv, obzvláště pro ošetření diabetes mellitus nebo diabetes nezávislém na inzulinu.

CZ 290341 B6

Fosfoinositolglykanová sloučenina s účinkem podobným inzulinu, způsob její výroby, léčivo tuto látku obsahující a její použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká fosfoinositolglykanových sloučenin s účinkem podobným inzulinu, způsobu jejich výroby a jejich použití, obzvláště jako léčiv pro ošetření diabetes mellitus nebo diabetes, která není závislá na inzulinu.

10

Dosavadní stav techniky

15 Inzulin má větší počet účinků na tkáň, citlivé na inzulin. Nápadným efektem je rychlá redukce hladiny glukózy u savců v případě použití inzulinu, což je způsobeno rychlým přijímáním glukózy z krve svalovými a tukovými buňkami. Inzulin aktivuje dále glykogen-syntetázu a inhibuje lipolýzu. Inzulin podporuje syntézu proteinů z aminokyselin a zesiluje indukci pyruvátdehydrogenázy a fosfofruktokinázy a inhibuje tvorbu určitých enzymů glukoneogeneze, jako je pyruvátkarboxyláza a fruktózo-1,6-bifosfatáza.

20

Diabetes typu II, neinzulinová diabetes, působí s inzulinovou resistencí periferních tkání, jako jsou svalové tkáň a tukové tkáň. Tím redukováné zužitkování glukózy je způsobeno chybějící inzulinovou stimulací transportu glukózy a následujícím metabolickým procesem (glukogeneze, lipogeneze). Z této dvojité resistance se dá usuzovat na defekt na úrovni receptorů nebo post-receptorů, to znamená před výrobou „second messenger“ (Garvey, Diabetes/Metabolism Reviews, 5, (1989), 727-742).

25

Dosud nejsou známy žádné účinné látky, které obcházejí inzulinový receptor a přesto vykazují účinek podobný inzulinu.

30

Podstata vynálezu

35 Nyní bylo zjištěno, že fosfoinositolglykanové sloučeniny, které se mohou získat z vazebného proteinu adenosin-3',5'-cyklického monofosfátu (cAMP), vykazují in vitro účinek podobný inzulinu a také na inzulin-resistentních tkáních vykazují účinek podobný inzulinu.

Vynález se tedy týká fosfoinositolglykanových sloučenin, získatelných štěpením adenosin-3',5'-cyklický monofosfát-vazebného proteinu a/nebo jeho fyziologicky přijatelných solí.

40

Předmětem předloženého vynálezu tedy je fosfoinositolglykanová sloučenina s účinkem podobným inzulinu, obsahující fosfoinositolglykan a ethanolamin a její fyziologicky přijatelné soli.

45

Pod pojmem inzulin-resistentní tkáň se rozumí například krysí tukové buňky, které nemají žádný inzulinový receptor. cAMP-vazebné proteiny jsou proteiny, které mají vlastnost vázat adenosin-3',5'-cyklický monofosfát.

50 Dosavadní strukturní data fosfoinositolglykanové sloučeniny podle předloženého vynálezu předpokládají fosfoinositol s glykanovým podílem, obsahujícím galaktózu, glukózamin a manózu, který je přes fosforylethanolaminový zbytek vázán amidovou vazbou na karboxylovém konci peptidu. Tento se opět nachází uvnitř kovalentně vázaného glykolipidu, sloužícího jako výměnná skupina membrány, o podobné struktuře jako u plazmových membránových proteinů vyšších eukaryontů (Roberts a kol., J. Biol. Chem., 263, (1983), 18776-18784). Glykanový zbytek obsahuje glukózamin, galaktózu, manózu a alespoň dva fosfátové zbytky na mol. Peptid

55

obsahuje sekvenci –Aan–Cys–Tyr– a je spojen s karboxylovým koncem kyseliny asparagové přes amidovou vazbu na aminoskupině fosfoinositolového glykanu. Fosfoinositolglykanový podíl je potřebný pro aktivitu. Peptid zesiluje účinek podobný inzulinu. Dále se ukázalo, že účinek podobný inzulinu nevykazuje pouze úplný fosfoinositolglykanový peptid, ale také dílčí struktury. Účinek podobný inzulinu vykazují například také zkrácené peptidové sekvence, které jsou vázány na fosfoinositolglykan, nebo pouze fosfoinositolglykan bez peptidu.

Vhodné fyziologicky přijatelné soli fosfoinositolglykanového peptidu podle předloženého vynálezu jsou například soli s alkalickými kovy, kovy alkalických zemin nebo amonné, jakož i soli s fyziologicky přijatelnými organickými amonnými nebo trimethylaminovými bázemi.

Výroba fosfoinositolglykanových sloučenin podle předloženého vynálezu probíhá například tak, že se

- a) použijí organismy, obsahující adenosin–3',5'–cyklický monofosfát–vazebný protein,
- b) izoluje se adenosin–3',5'–cyklický monofosfát–vazebný protein,
- c) proteinový podíl adenosin–3',5'–cyklický monofosfát–vazebného proteinu se odštěpí úplně nebo s výjimkou terminálního asparaginu nebo s výjimkou terminálního tripeptidu Asn–Cys–Tyr a vzniklá glykosylfosfatidyl–inositolová sloučenina se popřípadě čistí,
- d) z produktu, získaného ve stupni c) se odštěpí monoacylglycerol nebo diacylglycerol a
- e) fosfoinositolglykanová sloučenina, získaná ve stupni d), se izoluje a popřípadě se převede na odpovídající fyziologicky přijatelné soli.

Adenosin–3',5'–cyklický monofosfát–vazebný protein se může získat z různých organismů, například z mikroorganismů, rostlin, hub nebo zvířecích orgánů. Vhodné jsou například také kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, obzvláště DSM 6649.

Výroba adenosin–3',5'–cyklický monofosfát–vazebného proteinu ze *Saccharomyces cerevisiae* se provádí fermentací v živném roztoku, který obsahuje zdroj uhlíku a dusíku, jakož i běžné anorganické soli. Vazebný protein se výhodně hromadí v plazmových membránách kvasinek.

Při pracovním stupni a) se nejlépe postupuje následujícím způsobem. Tvorba adenosin–3',5'–cyklický monofosfát–vazebného proteinu v *Saccharomyces cerevisiae* pobíhá dobře za běžných kultivačních podmínek pro *Saccharomyces cerevisiae*. Kultivace probíhá aerobně, tedy například submersně za třepání nebo míchání, v třepacích baňkách nebo ve fermentorech, popřípadě za přívodu vzduchu nebo kyslíku. Může se pracovat při teplotě v rozmezí 18 až 35 °C, výhodně při 25 až 30 °C, obzvláště při 28 až 30 °C. Rozmezí hodnoty pH by mělo být mezi 2 a 8, výhodně mezi 3 a 7. Kultivace kvasinek za těchto podmínek probíhá všeobecně až do koncentrace asi 10⁷ buněk/ml živného roztoku.

Při pracovním stupni b) se postupuje nejlépe tak, že se buňky kvasinek pro izolaci cAMP–vazebného proteinu oddělí od živného média a promyjí se pufrem. Izolace se provádí například postupem, popsáným Müllerem a Bandlowem (Biochemistry, 28, (1989), 9957–9967). K tomu se buňky kvasinek enzymaticky (zymolyasa) přemění na spheroplasty a v homogenizátoru se za přítomnosti inhibitorů proteáz za chladu (při teplotě v rozmezí 0 až 4 °C) rozmělní. Lyzát kvasinek se centrifuguje a buněčná sraženina se promyje pufrem a znovu centrifuguje. Kapaliny nad sedlinou se spojí a čistí se v gradientu ^RPercollu (28 % Percollu) a sacharózy (15 až 18 % sacharózy). Pomocí těchto centrifugačních kroků se od sebe oddělí cytoplazma, plazmové membrány, mikrozomy a mitochondrie.

Z frakce plazmových membrán se adenosin-3',5'-cyklický monofosfát-vazebný protein váže například na sloupci N⁶-(2-aminoethyl)-cAMP-sepharosy a vazebný protein se ze sloupce eluuje a odsolí.

- 5 Při pracovním stupni c) se nejlépe postupuje tak, že se proteinový podíl adenosin-3',5'-cyklický monofosfát-vazebného proteinu enzymaticky odštěpí. Pro enzymatické štěpení se používají například proteázy, jako je pronasa, endoproteáza Lys-C (Lysobacter enzymogene) nebo V8 proteáza (Staphylococcus aureus). Tím se dosáhne odbourání proteinového podílu. Pomocí proteázy V8 se získá glykosyl-fosfatidylinositol s peptidovou sekvencí Asn-Cys-Tyr; inkubace s proteázou pronasou poskytuje glykosyl-fosfatidylinositolovou sloučeninu, u které peptidový podíl sestává pouze z aminokyseliny Asn.

- 15 Proteáza se vysráží například kyselinami, jako je kyselina trichloroctová. Glykosyl-fosfatidylinositolové peptidy se od proteáz oddělí centrifugací, koncentrují se na sloupci fenylsepharosy a čistí se pomocí chromatografie na tenké vrstvě.

- 20 Při pracovním stupni d) se postupuje nejlépe tak, že se monoacylglycerinový nebo diacylglycerinový zbytek, vázaný na glykosyl-fosfatidylinositolové sloučenině, enzymaticky odštěpí a tím se uvolní fosfoinositolglykanová sloučenina. Pro enzymatické štěpení se použijí například fosfolipázy, jako je fosfatidylinositol specifická fosfolipáza C (Bacillus cereus). Tím se dosáhne odštěpení monoacylglycerinového nebo diacylglycerinového esteru, který je vázán na Myo-inositol přes fosfátovou skupinu. Zbytek obsahující glycerol, se zpracováním proteázami v pracovním stupni c) neodštěpí. Pracovní stupně c) a d) se mohou provádět také v obráceném pořadí.

- 25 Enzymatické reakce v pracovních stupních c) a d) se provádějí za podmínek, které jsou pro enzymatické reakce vhodné. Na základě známých reakčních podmínek pro uvedené enzymy není pro odborníky těžké zjistit optimální reakční podmínky.

- 30 Při pracovním stupni e) se postupuje nejlépe tak, že se fosfolipázy vysrážejí pomocí kyselin, jako je například kyselina trichloroctová. Fosfoinositolglykanová sloučenina se od fosfolipázy oddělí centrifugací, čistí se na sloupci Biogelu P-4 a koncentruje se pomocí elektroforézy na tenké vrstvě.

- 35 Fosfoinositolglykanové sloučeniny podle předloženého vynálezu a jejich fyziologicky přijatelné soli slouží v první řadě jako účinné látky pro farmaceutické přípravky pro aplikaci při diabetes mellitus nebo při diabetes nezávislé na inzulinu.

- 40 Předmětem předloženého vynálezu jsou tedy také léčiva, obsahující účinné množství fosfoinositolglykanové sloučeniny a/nebo alespoň jednu z jejich fyziologicky přijatelných solí v rozpuštěné, amorfní a/nebo krystalické formě.

- 45 Léčiva jsou výhodně roztoky nebo suspenze pro injekční účely s hodnotou pH 3,0 až 9,0, výhodně 5,0 až 8,5, které obsahují vhodné izotonické činidlo, vhodný konzervační prostředek a popřípadě vhodný pufr, jakož i popřípadě také depotprincip, vše přírodní ve sterilním vodném roztoku nebo suspensi. Zbytek součástí přípravku kromě účinné látky tvoří nosič.

- Vhodná izotonická činidla jsou například glycerol, glukóza, manit chlorid sodný a sloučeniny vápníku nebo hořčíku, jako je například chlorid vápenatý nebo chlorid hořečnatý.

- 50 Jako vhodné konzervační prostředky je možno uvést například fenol, m-kresol, benzylalkohol a/nebo estery kyseliny p-hydroxybenzoové.

- 55 Jako pufrovací substance, obzvláště pro nastavení hodnoty pH na rozmezí asi 5,0 až 8,5 se mohou použít například octan sodný, citrát sodný nebo fosforečnan sodný. Jinak jsou pro

nastavení hodnoty pH také vhodné fyziologicky neškodné zředěné kyseliny (typickým příkladem je kyselina chlorovodíková), popřípadě louhy (typickým příkladem je hydroxid sodný).

5 Za účelem variace profilu účinku léčiv podle předloženého vynálezu je možno přimísit také modifikované (viz EP-B 132 769 a EP-B 132 770) a/nebo nemodifikované inzuliny, například hovězí, vepřový nebo lidský inzulin, obzvláště lidský inzulin.

10 Léčiva se vyrobí tak, že se fosfoinositolglykanový peptid a/nebo alespoň jedna z jeho fyziologicky přijatelných solí, popřípadě společně s modifikovanými a/nebo nemodifikovanými inzuliny nebo deriváty inzulinu, s fyziologicky neškodnými nosiči a popřípadě s vhodnými přídatnými a pomocnými látkami, převede na vhodnou aplikační formu.

Příklady provedení vynálezu

15

Předložený vynález je blíže objasněn pomocí následujících příkladů provedení.

Příklad 1

20

Fermentace *Saccharomyces cerevisiae* DSM 6649

Saccharomyces cerevisiae DSM 6649 se kultivuje aerobně ve fermentoru. V jednom litru vody jsou obsaženy následující součásti:

25

25	kvasničný extrakt	3 g
	glukóza	1 g
	dihydrogenfosforečnan draselný	1 g
	chlorid amonný	1 g
30	chlorid vápenatý dihydrát	0,5 g
	chlorid sodný	0,5 g
	síran hořečnatý hydrát	0,6 g
	chlorid železitý	0,3 ml 1% vodného roztoku
	kyselina mléčná	22 ml 90% roztoku.

35

Hodnota pH roztoku se nastaví na 5,5. Aerace se provádí vzduchem v množství 1 1/1 objemu fermentoru. Buňky se pěstují až do dosažení koncentrace 1×10^7 buněk/ml kultivačního média; výtěžek činí asi 3 g vlhké hmoty na jeden litr kultivačního roztoku. Buňky se oddělí centrifugací (5 minut 3000 x g) a promyjí se fosfátovým pufrům pH 6.

40

Příklad 2

Izolace cAMP-vazného proteinu

45

Buňky z příkladu 2 se přemění enzymaticky (Zymolase, 2000, Seikagaku Kogyo, Tokio) na sféroplasty a při teplotě 0 °C se rozmělní ve skleněném homogenizátoru (Arthur H. Thomas and Co.). Následující izolační kroky probíhají za přítomnosti inhibitorů proteáz (fenylmethan-sulfonylfluorid /PMSF/, leupeptin, aprotinin, alfa₂-makroglobulin, trypsin-inhibitor; Boehringer Mannheim). Buněčný lyzát se centrifuguje (1000 x g, 3 minuty, 4 °C), buněčný sediment se promyje SEM-pufrům (0,25 M sacharóza, 0,5 mM kyselina ethylendiamintetraoctová /EDTA/, 20 mM kyselina 3-/N-morfolino-/propansulfonová (MOPS)/KOH, pH 7,4) a znovu se centrifuguje. Kapaliny nad sedimenty se spojí a centrifugují se v ^RPercoll-gradientu (Pharmacia, Freiburg; 28 % Percoll, SEM-pufr, 0,5 mg proteinu/ml) (18 000 x g, 15 minut, 4 °C). V tomto gradientu se od sebe oddělí cytoplazma, plazmové membrány, mikrozomy a mitochondrie.

55

Plazmové membrány flotují v horní třetině gradientu. Vyjmou se z gradientu pomocí stříčky, zředí se pětinasobným objemem SEM-pufu a centrifugují se (48 000 x g, 30 minut, 4 °C).

5 Sediment se suspenduje v MOPS-pufu (5 mg proteinu/ml) a v ultrazvukové lázni se při teplotě 4 °C inkubuje po dobu 60 minut s N-³H/acetyl-concanvalinem A (Amersham Buchler, Braunschweig; 1 mg proteinu s 55 µCi, v 500 µl MOPS-pufu /Boehringer Mannheim), 20 mM, pH 7,4, 0,5 mM EDTA, 50 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 200 µg hovězího sérového albuminu; Behring Werke, Marburg). Vazba Concanvalinu A slouží jako marker. Suspense se pipetují na gradienty sacharózy (15 až 28 % sacharózy v MOPS-pufu) a centrifugují se (25 000 otáček za minutu, 10 90 minut, 4 °C, Beckmann SW 27 Rotor). Sacharózové gradienty se frakcionují a radioaktivní frakce (asi 23 % sacharózy) se spojí, třikrát se zředí MOPS-pufem (50 mM Concanvalinu A; Sigma Deinsenhofen, 250 mM KCl) a centrifugují se (200 000 x g, 60 minut, 4 °C, Beckman TL-100-Rotor). Sediment se promyje SEM-pufem (250 mM KCl), centrifuguje se a v SEM-pufu bez KCl se resuspenduje (2,5 mg proteinu/ml).

15 Asi 500 µg plazmového membránového proteinu se solubilizuje v pufru (25 mM MOPS/KOH, pH 7,0, 150 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 0,4 mM EGTA /kyseliny ethylenglykol-bis(beta-aminoethylether)tetraoctová/, 0,5 mM DTT (dithiothreitol), 0,5 % desoxycholátu, 0,1 mM IBMX /izobutylmethylxanthin/, 0,1 mM PMSF, 50 µM leupeptinu, 0,1 mM aprotininu (2 mg/ml)). 20 Roztok se nanese na sloupec 2 ml N⁶-(2-aminoethyl)-cAMP-sepharasy (Pharmacia Freiburg) při teplotě 4 °C, který byl equilibován stejným pufem. Sloupec se pětikrát promyje vždy 2 ml pufru (25 mM MOPS/KOH, pH 7,2, 100 mM Na-citrátu, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 250 mM sacharózy, 7,5 % ethylenglykolu /Merck, Darmstadt/, 10 % glycerinu, 1 mg/ml hovězího sérového albuminu, 1 mM IBMX).

25 Eluuje se při teplotě 4 °C 2 ml stejného pufru, který obsahuje ještě 100 µM cAMP. Prvních 250 µl eluátu se po centrifugaci odsolí na sloupci 1 ml sephadexu G-25, který byl equilibován pufem (25 mM MOPS/KOH, pH 7,0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 50 µM EDTA, 50 µM PMSF, 0,1 % desoxycholátu, 5 % glycerinu. Odsolený materiál se inkubuje se stejným 30 objemem 8% polyethylenglykolu 4000 (Pharmacia, Freiburg) v pufru (10 mM MOPS/KOH, pH 7,2, 1 mM EDTA) po dobu 30 minut při teplotě 4 °C. Po patnáctiminutové centrifugaci se sediment rozpustí v pufru (20 mM MOPS/KOH, pH 7,2, 1 mM EDTA, 100 µM PMSF, 0,5 % desoxycholátu) (2 mg proteinu/ml).

35 Příklad 3

Výroba fosfoglykanových peptidů

40 a) Trávení s pronasou (*Streptomyces griseus*; Boehringer Mannheim):

100 µg cAMP-vazebného proteinu se inkubuje po dobu 10 hodin při teplotě 50 °C v 1 ml 0,1M kyseliny N-2-hydroxyethylpiprazin-N-2-ethansulfonové (HEPES)/KOH (pH 8,0), 15 mM CaCl₂, 1% tritin X-1000 (Boehringer Mannheim) se 450 µg/ml pronasy. Po přidavku 1 % SDS 45 (natriumdodecylsulfát) inkubace pokračuje s druhým alikvotním podílem pronasy po dobu 7 hodin při teplotě 50 °C. Automatizované Edmannovo odbourávání ukazuje, že odbourávání pomocí pronasy vede k fosfoinositolglykanu s amidicky vázaným asparaginem na aminovém konci ethanolaminu.

50 Takto získaný fosfoinositolglykanový peptid je v následujícím označován jako PIG-N.

b) Trávení s endoproteinázou Glu-C, EC 3.4.21.19, (V8 Proteáza) (*Staphylococcus aureus*; Boehringer Mannheim):

100 µg cAMP-vazebného proteinu se inkubuje po dobu 18 hodin při teplotě 37 °C v 1 ml 20 mM uhličitanu amonného (pH 7,8), 0,5 % oktylglykózy (Boehringer Mannheim) se 300 µg V8 proteázy. Automatické Edmannovo odbourávání ukazuje, že trávení V8 proteázou vede k fosfoinositolglykanu s peptidem Asn-Cys-Tyr. Aminokyselina kyselina asparagová je vázána na fosfoinositolglykan karboxylovým koncem.

Získaný fosfoinositolglykan s tripeptidem Asn-Cys-Tyr je v následujícím označován jako PIG-NCY.

c) Trávení endoproteázou lys-C (Lysobacter enzymogenes; Boehringer Mannheim):

100 µg cAMP-vazebného proteinu se inkubuje po dobu 18 hodin při teplotě 37 °C v 0,5 ml 50 mM (NH₄)₂CO₃ (pH 8,2), 0,5 % oktylglykózy s 55 µg endoproteázy Lys-C.

Automatické Edmannovo odbourávání ukazuje, že endoproteáza Lys-C vede k fosfoinositolglykanu s peptidem Asn-Cys-Tyr-Glu. Vazba peptidu na fosfoinositolglykan probíhá přes karboxylový konec asparaginu.

Získaná sloučenina je v následujícím označována jako PIG-NCYE.

d) Odstranění karboxy-koncové aminokyseliny:

Pronasou natrávený cAMP-vazebný protein (viz a)) se podrobí manuálnímu Edmannovu odbourávání. Vzniklý fosfoinositolglykan bez aminokyseliny se v následujícím označuje jako PIG.

Po proteolytickém štěpení se proteázy odstraní precipitací s 5% kyselinou trichloroctovou (TCA). Po centrifugaci (15 minut, 10 000 × g) se fosfoinositolglykan-peptidové deriváty, obsažené v kapalině nad sedimentem, jakož i fosfoinositolglykany z Edmannova odbourávání koncentrují vazbou na sloupci fenylsepharose a čistí se. Po eluci 2% oktylphenol(ethylenglykoletherem) (TX-100) se fosfoinositolglykan-peptidové deriváty čistí pomocí chromatografie na tenké vrstvě za pomoci dvou různých rozpouštědlových systémů. Po prvním průběhu v kyselém systému (chloroform/acetone/methylalkohol/ledová kyselina octová/voda 10 : 4 : 2 : 2 : 1) se fosfoinositolglykanové peptidy eluují v blízkosti nanášecího místa na silikagelové destičce (typ 60) methylalkoholem a potom se rechromatografuje ve druhém stupni v bazickém systému (chloroform/methylalkohol/amoniak/voda 45 : 45 : 3,5 : 10). Fosfoinositolglykan-peptidové deriváty se znovu z destičky eluují (R_f = 0,45) a extrahují se směsí chloroformu a methylalkoholu (2 : 1). Organická fáze se promyje a evaporuje a materiál se suspenduje ve fosfátovém pufru s 0,5 % TX-100.

e) Fosfoinositolglykany nebo fosfoinositolglykanové peptidy, získané podle postupu a) až d), se inkubují s 10 jednotkami fosfatidylinositol-specifické fosfolipázy C, EC 3.1.1.5, (Bacillus cereus; Sigma, Deisenhofen) v 0,2 ml 0,2 M fosforečnanu draselného (pH 7,2), 2 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0,05 % TX-100 po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Po přidavku 10 mM EDTA se štěpné produkty navzájem oddělí pomocí chromatografie na tenké vrstvě v bazickém rozpouštědlovém systému (viz d)). Materiál se v bezprostřední blízkosti nanášecího místa z destičky eluuje a smísí se s 2% poly(ethylenglykol)-mono-(oktylphenyletherem) (TX-114). Zahřátím a centrifugací se zahájí dělení fází. Vodná fáze se koncentruje v koncentrátoru Speedvac.

f) Pro standardizování fosfoglykanových peptidů se dusík volného glukózaminu materiálu získaného ve stupních a) až d) převede permethylací na radioaktivně značený trimethylamoniový kation. K tomu se vzorek ve vakuu vysuší a smísí se s 100 µl dimethylsulfoxidu. Po zpracování ultrazvukem (1 minuta) se přidá 10 mg hydroxidu sodného a 40 µl (¹²⁵J)/methyljodidu (0,2 µCi; NEN-Dupont, Dreieich). Po míchání po dobu 45 minut při teplotě 25 °C se rozpouštědlo ve

Speedvacu odstraní a přidá se 400 µl vody. Vzorek se třikrát promyje chloroformem a chloroformové extrakty se třikrát promyjí vodou. Chloroform se pod dusíkem odstraní. Permethylace probíhá v širokém koncentračním rozmezí lineárně a kvantitativně. V testech na účinek podobný inzulinu se používají ekvivalentní objemy (stejně hodnoty dpm) fosfoinositolglykanových peptidů (1–100 „arbitrary units“).

g) Inkubace materiálu, získaného ve stupních a) až d) s kyselinou dusitou vede ke štěpení fosfoinositolglykanu.

10

Příklad 4

Strukturní znaky fosfoinositolglykanových peptidů

15 a) Buňky kvasinek se nechaly nasáknout, jak je uvedeno v příkladě 1, za přítomnosti radioaktivně značených substancí (firma NEN–Dupont, Dreieich):

kyselina stearová
myo–inositol
20 ethanolamin
glukózamin nebo
manóza.

25 Celková plazmová membránová frakce nebo cAMP–protein, vyčištěný pomocí afinitní chromatografie (viz příklad 2) se podrobí SDS–polyakrylamidové gelové elektroforéze. Zbarvení komponent pomocí Coomassie blue nebo autoradiografií ukazuje, že všechny výše uvedené komponenty (radioaktivní) se do fosfoinositolglykanového peptidu zabudovávají.

30 b) Fosfoinositolglykanový peptid, získaný podle příkladu 3a), se chemicky a enzymaticky dále štěpí. Štěpné produkty se analyzují pomocí chromatografie na tenké vrstvě a měřením rozdělení radioaktivity (^3H /kyselina stearová a ^{14}C /myo–inositol).

35 Zbylá radioaktivně značená struktura se z destičky eluuje a podrobí se příští štěpné reakci. Ze struktury, vzniklé pronasovým trávením, se deaminací pomocí kyseliny dusité uvolní fosfatidylinositol (PI). Tento se přemění pomocí fosfolipázy D na kyselinu fosfatidylovou nebo pomocí fosfolipázy C na diacylglycerol. Při tom se značení myo–inositolem ztratí, radioaktivní značení kyselinou stearovou však zůstane zachováno. Fosfatidylová kyselina se potom převede acetolysou na diglyceridacetát. Z této struktury se stejně jako z diacylglycerolu konečně uvolní alkalickou hydrolysou kyselina stearová.

40

45 c) Struktura, získaná podle příkladu 3a) až 3e), se usuší, zpracuje se fluorovodíkem (60% ve vodě, 16 hodin, 0 °C) a získané oligosacharidy se hydrolysují pomocí 2M kyseliny trifluoroctové (4 hodiny, 100 °C). Potom se reakční roztok vysuší a přítomný cukr se redukuje (1% NaBH_4 , v 0,1 M hydroxidu amonném, 1 hodina, 37 °C) a nakonec se acetyluje (směs pyridinu a anhydridu kyseliny octové 1 : 1, 1 hodina, 60 °C). Chromatografie se provádí na plynovém chromatografu firmy Packard, model 428; sloupec 100/120 Supelcoport (Supleco, Bellefonte, USA) při teplotě 60 °C. Získá se následující kvalitativní složení:

50 manóza
galaktóza
myo–inositol
glukózamin.

55 d) Struktura, získaná podle příkladu 3a) až 3e) se stejně, jako je popsáno v odstavci c), hydrolysuje fluorovodíkem (60 °C ve vodě) a 4M kyselinou chlorovodíkovou po dobu 16 hodin

při teplotě 100 °C. Po rozdělení na analyzátoru aminokyselin (Biotronic, LC 6001) se získají následující součásti:

- 5 kyselina asparagová
NH₃
ethanolamin
glukózamin

- 10 S ohledem na podmínky hydrolysy, poměr kyseliny asparagové, jakož i na výsledky podle příkladu 3a), je v nativním fosfoinositolglykanovém peptidu danou aminokyselinou asparagin.

Příklad 5

- 15 Biologická aktivita fosfoinositolglykanových peptidů podle předloženého vynálezu (PGP) byla zjišťována za použití preparativně izolovaných tukových buněk a kousků diafragmy z krys.

- Výraz „PIG“ značí fosfoinositolglykan bez peptidu, získaný podle příkladu 3d) a 3e); výraz „PIG-N“ značí fosfoinositolglykan s asparaginem, získaný podle příkladu 3a) a 3e); výraz „PIG-NCY“ značí fosfoinositolglykan s peptidem Asn-Cys-Tyr, získaný podle příkladu 3b) a 3e); výraz „PIG-NCYE“ značí fosfoinositolglykan s peptidem Asn-Cys-Tyr-Glu, získaný podle příkladu 3c) a 3e); výraz „PIG-NCY (na)“ značí materiál získaný podle příkladu 3b) a 3e), který byl rozštěpen kyselinou dusitou (viz příklad 3g)). Výraz „basální“ značí aktivitu bez stimulace, „inzulin“ značí lidský inzulin a „dpm“ značí radioaktivní rozpad za minutu.

25 Preparace tukových buněk z krys se provádí následujícím způsobem:

- 30 Tuková tkáň z okolí varlat (krysy Wistar, 160–180 g, žádné omezení krmiva) se natráví kollagenásou a vzniklé uvolněné buňky se flotací několikrát promyjí.

Preparace kousků diafragmy se provádí následujícím způsobem:

- 35 Z několikrát promyté hemi-diafragmy (krysy Wistar, 60–70 g, žádné omezení krmiva) se nařežou malé kousky tkáně (5 mm průměr).

- Pro inaktivaci inzulinového receptoru tukových buněk krys se buňky zpracují 10 až 40 µg/ml trypsinu. Po přidavku inhibitoru proteáz se buňky dvakrát flotací promyjí a inkubace pokračuje 15 minut při teplotě 37 °C. Tyto buňky se potom použijí pro test na stimulaci lipogeneze fosfoinositolglykanovými peptidy. Kontrolní inkubace s inzulinem ukázala, že trypsinem zpracované buňky mají pouze velmi nepatrnou inzulinem stimulovatelnou lipogenezi a tedy pouze správně ohraničený počet funkčních inzulinových receptorů.

- 45 Pro inaktivaci inzulinového receptoru v krysí diafragmě se části tkáně inkubují za stálého zavádění kyslíku v KHR pufri (0,1 mM glukózy v přítomnosti 50 µg/ml forbolesteru tetra-dekanoylforbolacetátu) po dobu 90 minut při teplotě 25 °C. Potom se kousky tkáně dvakrát promyjí KRH pufrem a použijí se pro odpovídající testy.

- 50 V následujících pokusech jsou výsledky pokusů, které byly docíleny s buňkami nebo tkáněmi, v nichž byly inzulinové receptory inaktivovány, vždy uvedeny v závorkách. V žádném z následujících testů nevykazoval PIG-NCYE účinek.

a) Glykogeneze

5 Tento test zjišťuje inzulinem stimulovatelnou syntézu glykogenu ve svalových buňkách, která zahrnuje transport glukózy přes plazmové membrány a přeměnu glukózy na glykogen, jakož i inzulinovou signální přenášecí kaskádu.

10 Kousky diafragmy se inkubují v KRH-pufu s 50 μ M D-/U- 14 C/glukózy v přítomnosti nebo nepřítomnosti inzulinu a PGB po dobu 15 minut při teplotě 37 °C. Po odsátí média se kousky tkáně intensivně promyjí, zmrazí se při teplotě -70 °C a potom se homogenizují při teplotě 2 °C v polytronovém homogenizátoru. Získaný homogenizát se centrifuguje (2000 g) a kapalina se pipetuje na filtrační papír. Pro zjištění vytvořeného glykogenu se filtr převede do TCA (5%), promyje se ethylealkoholem a acetonem, vysuší se a stanovuje se radioaktivita scintilačním měřením (14 C/glykogen/dmp* 10^{-3} /).

15 Jednotky pro fosfoinositolglykované peptidy jsou „arbitrary units“, definované v příkladu 3f).

Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 1.

20

Tabulka 1 Glykogeneze (dpm . 10^{-3})

	basal	Inzulin	PIG	PIG-N	PIG-NCY	PIG-NCY (na)
10 nM	3,3(3,4)	8,4(4,1)				
1			3,2(3,1)			
5			3,6(3,5)			
25			4,4(3,9)			
100						
1				3,0(2,5)		
10				4,2(3,8)		
100				6,7(6,2)		
1					3,2(2,7)	
5					4,8(4,3)	
25					6,5(5,8)	
100					8,0(7,1)	
1						3,0(2,5)
10						3,2(2,9)
100						3,6(3,4)

b) Syntéza glykogenu

25

Tento test stanovuje inzulinem stimulovatelnou přeměnu aktivované glukózy (UDP-glukóza) na glykogen (glykogensyntetázová aktivita), zahrnující funkční inzulinovou signální přenášecí kaskádu. Transport glukózy a aktivace glukózy byly pominuty (na rozdíl od měření syntézy glykogenu podle odst. a)).

30

35 Kousky diafragmy se inkubují s D-glukózou (0,1 mM) za přítomnosti nebo nepřítomnosti inzulinu a PGB po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Připraví se homogenát a tento se centrifuguje (20000 $\times$ g). Kapalina se potom inkubuje s U- 14 C/UDP-glukózou (0,3 mM) za přítomnosti buď 0,1 mM nebo 10 mM glukózo-6-fosfátu po dobu 60 minut při teplotě 37 °C. Směsi se transferují na filtrační papír a tento se zpracuje jak je uvedeno výše. Glykogensyntetázová aktivita se počítá jako frakcionální rychlost mezi I-formou enzymu (nezávislý na glukózo-6-fosfátu, defosforylovaný, odpovídá množství aktivního enzymu v homogenátu) a D-formou enzymu

(závislý na glukózo-6-fosforylovaný, odpovídá celkovému množství aktivovatelného enzymu v homogenátu) ($^{14}\text{C}/\text{glykogen}/\text{dpm} \cdot 10^{-3}/$).

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2

5

Tabulka 2 Glykogensyntetáza ($\text{dpm} \cdot 10^{-3}$)

	basal	Inzulin	PIG	PIG-N	PIG-NCY	PIG-NCY (na)
10 nM	4,4(3,5)	10,1(6,0)				
1			3,9(3,5)			
5			4,8(3,8)			
25			5,7(4,5)			
100			6,7(6,0)			
1				3,9(3,5)		
10				5,7(5,0)		
100				7,2(6,2)		
1					3,8(3,4)	
5					5,7(5,1)	
25					7,2(6,4)	
100					8,8(8,1)	
1						3,2(3,0)
10						4,0(3,5)
100						4,5(4,0)

10 c) Lipogeneze

Pomocí tohoto testu se zjišťuje inzulin-stimulovatelná přeměna glukózy na produkty rozpustné v toluenu (triglyceridy, fosfolipidy, mastné kyseliny), která vyžaduje transport glukózy a syntézu triglyceridů (fosfolipidů) mastných kyselin (glycerin-3-P-syntéza, esterifikace) za zahrnutí inzulinové signální přenosové kaskády.

Kryší tukové buňky se inkubují v KRH-pufu s D/3- ^3H /glukózou (0,2 mM nebo 1 mM konečné koncentrace) za přítomnosti nebo za nepřítomnosti inzulinu a PGP po dobu 90 minut při teplotě 37 °C. Přídavkem v toluenu rozpustného scintilačního kokteilu se buňky otevrou a lipidy se oddělí od ve vodě rozpustných produktů a inkubačního média. Po rozdělení fází se radioaktivita, inkorporovaná do lipidů stanovuje přímo scintilačním měřením bez odstraňování vodné fáze ($^3\text{H}/\text{lipid}/\text{dpm} \cdot 10^{-3}/$).

Výsledky testu jsou uvedeny v následující tabulce 3.

25

Tabulka 3 Lipogeneze (dpm*10⁻³)

	basal	Inzulin	PIG	PIG-N	PIG-NCY	PIG-NCY (na)
10 nM	1,0(1,0)	11,2(1,9)				
1			1,0(0,9)			
5			2,1(1,5)			
25			3,1(3,0)			
100			4,2(3,5)			
1				1,0(1,2)		
10				3,5(3,3)		
100				5,4(4,8)		
1					1,0(0,9)	
5					3,5(3,0)	
25					5,5(5,2)	
100					6,8(5,9)	
1						1,0(0,9)
10						1,0(1,5)
100						2,1(2,5)

5 d) Vlastní aktivita transportu glukózy.

Izolovaná plazmová membránová vezikula se získají z krysích tukových buněk (viz příklad 5), přičemž se tukové buňky dvakrát promyjí v homogenizačním pufru (20 mM trihydroxyamino-methanu (Tris)(HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,25 M sacharózy) a potom se při teplotě 4 °C
10 homogenizují ve 20 ml stejného pufru (skleněný homogenizátor s teflonovými tloučky).

Homogenizát se centrifuguje (16000 × g, 15 minut), sediment se suspenduje ve stejném pufru a znovu se centrifuguje. Sediment se suspenduje v 5 ml homogenizačního pufru a navrství se na sacharózovou vrstvu (1,12 M sacharózy, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA). Po centrifugaci
15 (100 000 × g, 70 minut) se interní fáze s plazmovými membránovými vezikuly pomocí hrotu odebere, zředí se 45 ml pufru a znovu se centrifuguje (48 000 × g, 45 minut). Sediment se suspenduje v 10 ml pufru, znovu se centrifuguje a nakonec se znovu suspenduje ve 3 ml pufru.

Izolovaná plazmová membránová vezikula se inkubují za přítomnosti nebo nepřítomnosti
20 inzulinu nebo PGB po dobu 30 minut při teplotě 25 °C. Potom se vezikula inkubují s 50 μM D-(3-³H)-glukózy a L-(1-¹⁴C)-glukózy stejné specifické radioaktivity po dobu 90 sekund při teplotě 25 °C. Směsi se potom rychle odsají přes nitrocelulózový filtr. Filtr se dokonale promyje a vysuší. Jeho radioaktivita se zjišťuje pomocí kapalinového scintilačního měření. Specifický
25 transport (D-³H/glukóza /L-¹⁴C/glukóza /dpm*10⁻³/) se počítá jako diference mezi ³H/- a ¹⁴C/- radioaktivitou.

Výsledky testu jsou uvedeny v následující tabulce 4.

Tabulka 4 Vlastní transport glukózy

	basal	Inzulin	PIG	PIG-N	PIG-NCY	PIG-NCY (na)
10 nM	2,4(2,6)	2,5(2,3)				
1			2,3(2,5)			
5			2,9(2,7)			
25			2,7(2,7)			
100			2,9(3,3)			
1				2,7(2,6)		
10				3,5(3,7)		
100				4,0(3,8)		
1					2,3(2,7)	
5					3,5(3,7)	
25					4,7(4,6)	
100					6,9(5,8)	
1						2,5(2,3)
10						2,6(2,7)
100						2,7(3,0)

5 e) Syntéza proteinů

Na rozdíl od předchozích stanovení, měřených metabolickými účinky inzulinu, patří stimulace syntézy proteinů k dlouhodobým účinkům inzulinu (jako růstový hormon). Zkouška zahrnuje inzulinovou signální kaskádu.

10

Kryší tukové buňky se inkubují v Dulbeccově modifikovaném esenciálním médiu (DMEM), ochuzeném o leucin, v primární kultuře s 50 μM L- ^3H -leucinu za přítomnosti inzulinu a PGP po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C. Buňky se oddělí pomocí techniky olejové centrifugace od okolního média a smísí se se scintilačním médiem kompatibilním s vodou. Po centrifugaci se sraženina proteinů promyje acetonem, suspenduje se v 1% SDS a smísí se se scintilačním konteilem. Radioaktivita asociovaná buňkami, zjištěná scintilačním měřením, slouží jako míra proteosyntézy a transportu aminokyselin přes plazmové membrány (^3H /leucin /dpm* 10^{-4}).

15

Výsledky testu jsou uvedeny v následující tabulce 5.

20

Tabulka 5 Syntéza proteinů

	basal	Inzulin	PIG	PIG-N	PIG-NCY	PIG-NCY (na)
10 nM	3,5(3,4)	10,1(4,0)				
1			3,5(3,3)			
5			3,55(3,5)			
25			4,0(3,5)			
100			3,8(3,3)			
1				3,4(3,3)		
10				4,1(3,2)		
100				5,3(4,2)		
1					3,8(3,7)	
5					4,4(4,2)	
25					5,1(5,0)	
100					6,9(5,8)	
1						3,7(3,5)
10						3,8(3,7)
100						4,1(3,8)

5

PATENTOVÉ NÁROKY

10

1. Fosfoinositolglykanová sloučenina s účinkem podobným inzulinu, obsahující fosfoinositolglykan a ethanolamin a její fyziologicky přijatelné soli.

15

2. Fosfoinositolglykanová sloučenina podle nároku 1, obsahující dodatečně asparagin nebo tripeptid Asn-Cys-Tyr.

20

3. Fosfoinositolglykanová sloučenina podle nároku 1, obsahující alespoň jeden zbytek glukózaminu, galaktózy, manózy, myo-inositolu, kyseliny fosforečné a ethanolaminu a peptidový zbytek se sekvencí Asn-Cys-Tyr.

25

4. Fosfoinositolglykanová sloučenina podle nároku 2, obsahující asparagin.

5. Způsob výroby fosfoinositolglykanových sloučenin podle jednoho nebo několika nároků 1 až 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se

30

a) použijí organismy obsahující adenosin-3',5'-cyklický monofosfát-vazebný protein,

b) izoluje se adenosin-3',5'-cyklický monofosfát-vazebný protein,

c) proteinový podíl adenosin-3',5'-cyklický monofosfát-vazebného proteinu se odštěpí úplně nebo s výjimkou terminálního asparaginu nebo s výjimkou terminálního tripeptidu Asn-Cys-Tyr a vzniklá glykosylfosfatidyl-inositolová sloučenina se popřípadě čistí,

35

d) z produktu, získaného ve stupni c) se odštěpí monoacylglycerol nebo diacylglycerol a

e) fosfoinositolglykanová sloučenina, získaná ve stupni d), se izoluje a popřípadě se převede na odpovídající fyziologicky přijatelné soli.

6. Způsob podle nároku 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se použijí buňky kvasinek a proteinový podíl se enzymaticky odštěpí.
- 5 7. Způsob podle nároku 5 nebo 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se pořadí pracovních kroků c) a d) vymění.
8. Způsob podle jednoho nebo několika nároků 5 až 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se použije *Saccharomyces cerevisiae* DSM 6649, endoproteáza Glu-C, EC 3.4.21.19 a/nebo fosfolipáza C, LC 3.1.1.5.
- 10 9. Léčivo, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje účinné množství fosfoinositolglykanové sloučeniny podle jednoho nebo několika nároků 1 až 4.
- 15 10. Léčivo podle nároku 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje inzulin, výhodně hovězí, vepřový nebo lidský inzulin.
- 20 11. Použití fosfoinositolglykanové sloučeniny podle jednoho nebo několika nároků 1 až 4 pro výrobu léčiv pro aplikaci při diabetes mellitus nebo při diabetes nezávislém na inzulinu.

Konec dokumentu
