

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

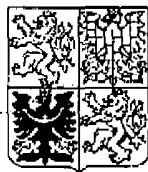
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2899-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18. 03. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 17.03.95

(31) Číslo prioritní přihlášky: 95/276

(33) Země priority: DK

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 01. 98**
(Věstník č. 1/98)

(86) PCT číslo: **PCT/DK96/00107**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/29344**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/62
A 61 K 38/28

(71) Přihlašovatel:

NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK;

(72) Původce:

Markussen Jan, Herlev, DK;

Jonassen Ib, Valby, DK;

Havelund Svend, Bagsvaerd, DK;

Brandt Jakob, Bronshøj, DK;

Kurtzhals Peter, Brookline, MA, US;

Hansen Per Hertz, Lyngby, DK;

Kaarsholm Niels Christian, Vanlose, DK;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273,
Praha 4, 14021;

gem inzulínu, který má rychlý nástup působení, a způsob léčení diabetes u pacienta.

A-řetězec
Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

B-řetězec
Xaa-Xaa-Xaa-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A-řetězec (pokr.)
Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Aan-Tyr-Cys-Xaa (sekv. id. č. 1)
13 14 15 16 17 18 19 20 21

B-řetězec (pokr.)
Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

B-řetězec (pokr.)
Phe-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa (sekv. id. č. 2)
25 26 27 28 29 30

(54) Název přihlášky vynálezu:

Insulinový derivát, farmaceutický prostředek pro léčení diabetes a způsob jeho léčení

(57) Anotace:

Inzulínový derivát obecné sekvence I, v níž Xaa v poloze A21 znamená jakoukoliv kodovatelnou aminokyselinu kromě Lys, Arg a Cys, Xaa v polohách B1, B2, B3, B26, B27, B28 a B29 znamenají nezávisle na sobě jakoukoliv kodovatelnou aminokyselinu vyjma Cys nebo jsou vynechány, Xaa v poloze B30 znamená jakoukoliv kodovatelnou aminokyselinu vyjma Cys, peptid neobsahující Cys nebo Arg nebo je vynechán a buď aminoskupina na N-konci aminokyseliny B-řetězce nebo karboxyskupina na C-konci aminokyseliny B-řetězce nese lipofilní skupinu W nebo Z s 12 až 40 atomy uhlíku a popřípadě obsahuje skupinu, která může být negativně nabitá. Je popsán také farmaceutický prostředek pro léčení diabetes, který obsahuje terapeuticky účinné množství uvedeného inzulínového derivátu, popřípadě ve směsi s inzulínem nebo analo-

Inzulínový derivát, farmaceutický prostředek pro léčení diabetes a způsob jeho léčení

Oblast techniky

Předložený vynález se týká inzulínového derivátu, farmaceutického prostředku pro léčení diabetes a způsobu jeho léčení. Podrobněji - předložený vynález se týká nového lidského inzulínového derivátu, který je rozpustný a má protražovaný profil působení, způsobu získávání tohoto derivátu, farmaceutického prostředku, který ho obsahuje, a použití tohoto inzulínového derivátu pro léčení diabetes.

Dosavadní stav techniky

Mnoho diabetických pacientů je léčeno vícekrát denně podávanými injekcemi inzulínu v takovém režimu, který zahrnuje jednu nebo dvě denní injekce protražovaného inzulínu, kterými se pokryje základní požadavek dodávání bolus injekcemi rychle působícího inzulínu pro pokrytí požadavků souvisejících s jídlem.

Prostředky s protražovaným inzulínem jsou dobře známy z oblasti techniky. Jeden z hlavních typů prostředků s protražovaným inzulínem zahrnuje injekčně podávané vodné suspenze krystalů inzulínu nebo amorfního inzulínu. V těchto prostředcích se jako sloučeniny inzulínu typicky používá protaminový inzulín, Zn-inzulín nebo protaminový Zn-inzulín.

S používáním inzulínových suspenzí souvisí některé nevýhody. Aby se zajistilo přesné dávkování, musí být inzulínové částice homogenně suspendovány mírným třepáním před tím, než se z ampulky odebere definovaný objem suspenze nebo než se definovaný objem vytlačí z krabičky. Při skladování suspenzí inzulínu musí být teplota udržována v užších mezích než u inzulínových injekcí, abychom se vyhnuli tvorbě kousků nebo koagulaci.

I když bylo dříve předpokládáno, že protaminy nejsou imu-

nogenní, nyní se ukázalo, že protaminy mohou být u člověka imunogenní a že jejich použití pro lékařské účely může vést k tvorbě protilátek [Samuel a spol.: Studies on the immunogenicity of protamines in humans and experimental animals of a micro-complement fixation test, Clin. Exp. Immunol. 33, 252 až 260 (1978).].

Byl zjištěn také důkaz toho, že komplex protamin-inzulín je sám imunogenní [Kurtz a spol.: Circulating IgG antibody to protamine in patients treated with protamine-insulins, Diabetologica 25, 322 až 324 (1983).]. U některých pacientů je tedy nutné vyhnout se použití protrahovaných inzulínových prostředků obsahujících protaminy.

Jiným typem protrahovaných inzulínových prostředků jsou roztoky, které mají pH pod fyziologickým pH, při němž se inzulín bude srážet, protože pH se zvyšuje, když se roztok podává injekčně. Nevýhodou je to, že pevné částice inzulínu působí jako lokální dráždivé činidlo, které způsobuje zánět tkáně v místě injekce.

Spis WO 91/12817 (Novo Nordisk A/S) popisuje protrahované, rozpustné inzulínové prostředky obsahující inzulínové komplexy trojmocného kobaltu. Protrahování těchto komplexů je pouze střední a biologická životaschopnost je snížena.

Lidský inzulín má tři primární aminové skupiny: N-koncovou skupinu A-řetězce a B-řetězce a ϵ -aminovou skupinu Lys^{B29}. V oblasti techniky jsou známy některé inzulínové deriváty, které mají substitovanou jednu nebo více z těchto skupin. Tak USA patent č. 3 528 960 (Eli Lilly) se týká N-karboxyaroylinzulínů, v nichž jedna, dvě nebo tři primární aminové skupiny molekuly inzulínu mají karboxyaroylovou skupinu. Nebyly popsány žádné specificky N^{B29} substituované inzulíny.

Podle britského patentového spisu č. 1 492 997 (Nat. Res. Dev. Corp.) bylo zjištěno, že inzulín s karbamyllovou substitucí

na N^{B29} má zlepšený profil hypoglykemického účinku.

Japonský patentový vykládací spis č. 1-254669 (Kodama Co., Ltd.) popisuje inzulin, v němž je mastná kyselina navázána na aminovou skupinu Phe^{B1} nebo na ϵ -aminovou skupinu Lys^{B29} nebo na obě tyto skupiny. Stanoveným účelem této derivatizace je získat farmakologicky přijatelný, stabilní inzulinový přípravek.

Inzulíny, které mají v poloze B30 aminokyseliny s alespoň 5 atomy uhlíku, které nemusí být nutně kódovány tripletem nukleotidů, jsou popsány v japonském patentovém vykládacím spisu č. 57-067548 (Shionogi). Inzulínové analogy jsou nárokovány jako užitečné při léčení diabetes mellitus, zvláště u pacientů, kteří jsou resistantní na inzulin díky vzniku protilátek na hovězí nebo prasečí inzulin.

USA patent 5 359 030 (Ekwuribe, Protein Delivery, Inc.) popisuje konjugaci - stabilizované polypeptidové prostředky pro orální nebo parenterální podávání obsahující polypeptid kovalentně kondenzovaný s polymerem zahrnujícím lineární polyalkylenovou část a lipofilní část. Tyto části jsou uspořádány navzájem vůči sobě tak, že polypeptid má zvýšenou in vivo resistenci na enzymatickou degradaci.

Evropská patentová přihláška 511600 A2 se týká, mimo jiné, proteinových derivátů obecného vzorce [protein][Z]_n, v němž [protein] znamená protein s n aminovými skupinami, z nichž každá je odvozena od aminové skupiny odstraněním jednoho z jejích atomů vodíku místo aminových skupin, [Z] znamená skupinu obecného vzorce -CO-W-COOH, v němž W znamená dvojvaznou uhlovodíkovou skupinu s dlouhým řetězcem, která může obsahovat také některé heteroatomy a n znamená průměrný počet amidových vazeb mezi [Z] a [proteinem]. Je uvedeno, že proteinové deriváty podle vynálezu mají mimořádně prodloužený poločas životnosti sera při srovnání s proteiny, od nichž jsou dovozeny, a že nevykazují žádnou antigeničnost. Také se uvádí, že inzulin je jedním z proteinů, z nichž lze vyrobit deriváty podle vynálezu, ale

v evropské patentové přihlášce 511600 nejsou popsány žádné specifické inzulínové deriváty ani nejsou uvedeny výhodné [Z] nebo (a) poloha (polohy), do nichž by měl být [Z] zaveden, aby se získaly užitečné inzulínové deriváty.

Kdykoliv je v předloženém spisu použit pojem inzulín v několikerém významu nebo ve významu generickém, zahrnuje jak v přírodě se vyskytující inzulíny, tak analogy inzulínu a jeho deriváty. Pojem "derivát inzulínu" se zde rozumí polypeptid, který má molekulární strukturu podobnou struktuře lidského inzulínu včetně disulfidových můstků mezi Cys^{A7} a Cys^{B7} a mezi Cys^{A20} a Cys^{B19}, vnitřní disulfidový můstek mezi Cys^{A6} a Cys^{A11} a který má inzulínovou aktivitu.

Existuje však ještě potřeba protrahovaných injekčně podaných inzulínových prostředků, kterými jsou roztoky, které obsahují inzulíny, které zůstávají po podání injekcí v roztoku a mají minimální zánětlivé a imunogenní vlastnosti.

Jedním z předmětů předloženého vynálezu je získat lidské inzulínové deriváty s protrahovaným profilem účinku, které jsou rozpustné při fyziologických hodnotách pH.

Jiným předmětem předloženého vynálezu je získání farmaceutického prostředku obsahujícího lidské inzulínové deriváty podle vynálezu.

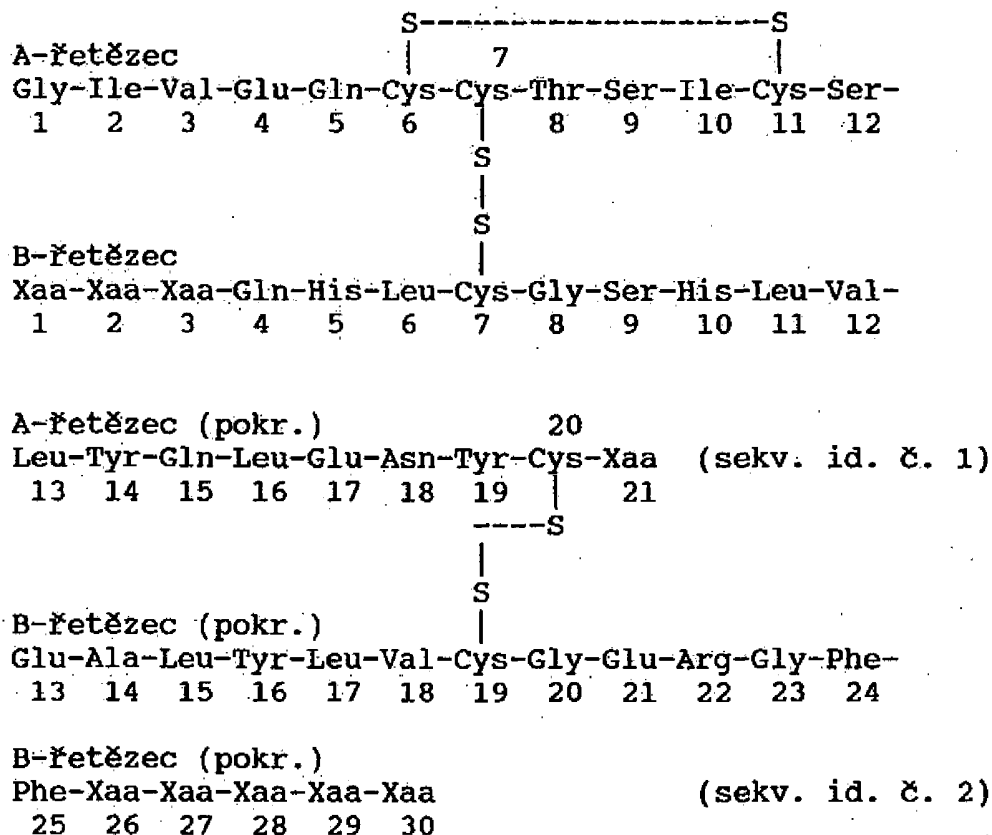
Dalším předmětem vynálezu je získat způsob výroby lidských inzulínových derivátů podle vynálezu.

Podstata vynálezu

Prekvapivě bylo zjištěno, že některé inzulínové deriváty, v nichž buď aminová skupina N-koncové aminokyseliny B-řetězce má napojený lipofilní substituent s 12 až 40 atomy uhlíku nebo v nichž skupina karboxylové kyseliny na C-konci aminokyseliny B-řetězce má napojený lipofilní substituent s 12 až 40 atomy

uhlíku, mají protrahovaný profil účinku a jsou rozpustné při fyziologických hodnotách pH.

Předložený vynález se tedy ve svém nejširším aspektu týká inzulínového derivátu následující obecné sekvence



v níž

Xaa v poloze A21 znamená jakoukoliv kódovatelnou aminokyselinu kromě Lys, Arg a Cys,

Xaa v polohách B1, B2, B3, B26, B27, B28 a B29 znamenají nezávisle na sobě jakoukoliv kódovatelnou aminokyselinu vyjma Cys nebo jsou vynechány,

Xaa v poloze B30 znamená jakoukoliv kódovatelnou aminokyselinu vyjma Cys, dipeptid neobsahující Cys nebo Arg, tripeptid neobsahující Cys nebo Arg, tetrapeptid neobsahující Cys nebo Arg nebo je vynechán, a buď aminoskupina N-konce aminokyseliny B-řetězce má lipofilní skupinu W na ni připojenou, při čemž tato skupina má 12 až 40 atomů uhlíku a popřípadě obsahuje skupinu, která může být negativně nabitá, nebo karboxyskupina na

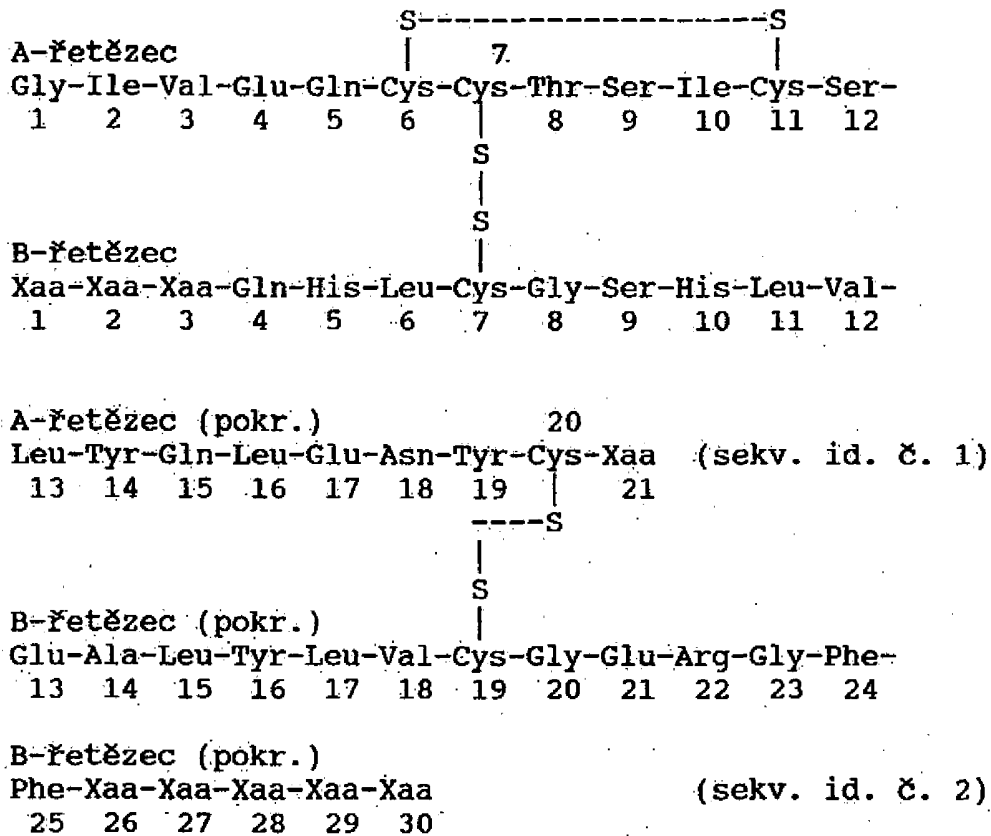
C-konci aminokyseliny B-řetězce má lipofilní skupinu Z na ni připojenou, při čemž tato skupina má 12 až 40 atomů uhlíku a popřípadě obsahuje skupinu, která může být negativně nabitá, s tím, že jestliže jedna nebo více aminokyselin v poloze B1, B2 a B3 je deletováno, potom číslo N-koncové aminokyseliny se spočte odpočítáním od Cys⁶⁷, který je vždy označen číslem 7, a že

a) jestliže B1-B2-B3 znamená Phe-Val-Asn, A21 znamená Asn a B26-B27-B28-B29-B30 znamená Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr nebo Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala, potom W nebo Z vždy obsahuje skupinu, která může být negativně nabitá,

b) jestliže B29 a B30 jsou deletovány a shora uvedená skupina Z je přítomna na C-konci aminokyseliny B-řetězce a ani B1, ani B2 ani B3 není deletována, potom B1-B2 neznámá Phe-Val nebo B26-B27-B28 neznámá Tyr-Thr-Pro nebo jak B1-B2 tak B26-B27-B28 znamenají jiné než uvedené sekvence, a

c) jestliže B29 a B30 jsou deletovány, shora uvedená skupina Z je přítomna na C-konci aminokyseliny B-řetězce a jedna z B1, B2 nebo B3 je deletována, potom N-koncová aminokyselina B-řetězce neznámá Val nebo sekvence B26-B27-B28 neznámá Tyr-Thr-Pro nebo jak N-koncová aminokyselina B-řetězce tak sekvence B26-B27-B28 neznámá Val, respektive Tyr-Thr-Pro.

Ve výhodném provedení se předložený vynález týká inzulinového derivátu následujícího obecné sekvence:



v níž

Xaa v poloze A21 znamená jakoukoliv kódovatelnou aminokyselinu kromě Lys, Arg a Cys,

Xaa v polohách B1, B2, B3, B26, B27, B28, B29 a B30 znamená nezávisle na sobě jakoukoliv kódovatelnou aminokyselinu vyjma Cys nebo je vynechána a buď aminoskupina N-koncové aminokyseliny B-řetězce má lipofilní skupinu W na ni připojenou, při čemž tato skupina má 12 až 40 atomů uhlíku a popřípadě obsahuje skupinu, která může být negativně nabitá, nebo karboxyskupinu na C-konci aminokyseliny B-řetězce má lipofilní skupinu Z na ni připojenou, při čemž tato skupina má 12 až 40 atomů uhlíku a popřípadě obsahuje skupinu, která může být negativně nabitá s tím, že jestliže jedna nebo více aminokyselin v poloze B1, B2 a B3 je deletováno, potom číslo N-koncové aminokyseliny se zjistí odpočítáním od Cys^{B7}, který je vždy označen číslem 7 a že

a) jestliže B1-B2-B3 znamená Phe-Val-Asn, A21 znamená Asn a B26-B27-B28-B29-B30 znamená Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr nebo Tyr-Thr-

-Pro-Lys-Ala, potom W nebo Z vždy obsahuje skupinu, která může být negativně nabitá,

b) jestliže B29 a B30 jsou deletovány a skupina shora uvedená Z je přítomna na C-konci aminokyseliny B-řetězce a ani B1, ani B2 ani B3 není deletována, potom B1-B2 neznámá Phe-Val nebo B26-B27-B28 neznámá Tyr-Thr-Pro nebo jak B1-B2 tak B26-B27-B28 znamenají jiné než uvedené sekvence, a

c) jestliže B29 a B30 jsou deletovány, shora uvedená skupina Z je přítomna na C-konci aminokyseliny B-řetězce a jedna z B1, B2 nebo B3 je deletována, potom N-koncová aminokyselina B-řetězce neznámá Val nebo sekvence B26-B27-B28 neznámá Tyr-Thr-Pro nebo jak N-koncová aminokyselina B-řetězce tak sekvence B26-B27-B28 neznámá Val, respektive Tyr-Thr-Pro.

Jestliže je lipofilní skupina W připojena na α -aminovou skupinu N-koncové aminové skupiny B-řetězce, potom vazba mezi α -aminovou skupinou a W s výhodou znamená amidovou vazbu, v níž N-koncová aminová skupina B-řetězce znamená aminovou část a skupina obsažená ve W znamená karboxylovou část.

Jestliže je lipofilní skupina Z napojena na karboxylovou skupinu C-koncové aminokyseliny B-řetězce, potom vazba mezi karboxylovou skupinou a Z s výhodou znamená amidovou vazbu, přičemž C-koncová karboxylová skupina znamená karboxylovou skupinu a aminová skupina obsažená v Z znamená aminovou část.

V jiném výhodném provedení se vynález týká shora popsaného inzulínového derivátu, v němž lipofilní skupina W je připojena na α -aminovou skupinu N-koncové aminokyseliny B-řetězce.

V jiném výhodném provedení se vynález týká shora popsaného inzulínového derivátu, v němž lipofilní skupina Z je připojena na karboxylovou skupinu C-koncové aminokyseliny B-řetězce.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového

derivátu, v němž aminokyselina v poloze A21 je vybrána ze skupiny sestávající z Ala, Asn, Gln, Glu, Gly a Ser.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž aminokyselina v poloze B1 znamená Phe. V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž aminokyselina v poloze B1 je vynechána.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž aminokyselina v poloze B2 je vybrána ze skupiny sestávající z Ala a Val.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž aminokyselina v poloze B3 je vybrána ze skupiny sestávající z Asn, Gln, Glu a Thr.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž aminokyselina v poloze B26 znamená Tyr.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž aminokyselina v poloze B27 znamená Thr.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž aminokyselina v poloze B28 znamená Pro.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž aminokyselina v poloze B29 znamená Lys nebo Thr.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž aminokyselina v poloze B28 znamená Lys a aminokyselina v poloze B29 znamená Pro.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž aminokyselina v poloze B30 znamená Thr nebo ϵ -acylovaný Lys.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž Xaa v poloze 30 v sekv. id. č. 2 znamená dipeptid Thr-Lys.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž Xaa v poloze 30 v sekv. id. č. 2 znamená dipeptid Gly-Lys.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž Xaa v poloze 30 v sekv. id. č. 2 znamená tripeptid Glu-Ser-Lys.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž Xaa v poloze 30 v sekv. id. č. 2 znamená tripeptid Thr-Gly-Lys.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž Xaa v poloze 30 v sekv. id. č. 2 znamená tetrapeptid Thr-Gly-Gly-Lys.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž Xaa v poloze 30 v sekv. id. č. 2 znamená tetrapeptid Thr-Glu-Gly-Lys.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž Xaa v poloze 30 v sekv. id. č. 2 znamená tetrapeptid Gly-Asp-Thr-Lys.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž C-koncová aminokyselina B-řetězce znamená ϵ -acylovaný Lys a aminokyselina vedle C-koncové aminokyseliny znamená Gly.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž původní inzulín znamená des(B30)-inzulín.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž původní inzulín znamená des(B30)-lidský inzulín.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž původní inzulín znamená des(B28-B30)-inzulín.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž původní inzulín znamená des(B27-B30)-inzulín.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž původní inzulín znamená des(B26-B30)-inzulín.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž aminokyselina v poloze B28 znamená Pro a aminokyselina v poloze B29 znamená Thr.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž je shora uvedená skupina W připojena na N-koncovou α -aminoskupinu B-řetězce, při čemž W znamená skupinu obecného vzorce $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$, kde n znamená číslo od 9 do 15.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž je shora uvedená skupina W připojena na N-koncovou α -aminoskupinu B-řetězce, při čemž W znamená skupinu obecného vzorce $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_r\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$, kde r znamená číslo od 9 do 15.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž je shora uvedená skupina W připojena na N-koncovou α -aminoskupinu B-řetězce, při čemž W znamená skupinu obecného vzorce $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_s\text{CO}-\text{NHCH}((\text{CH}_2)_2\text{COOH})\text{CO}-$, kde s znamená číslo od 9 do 15.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž je shora uvedená skupina Z připojena na C-kon-

covou aminokyselinu B-řetězce, při čemž Z znamená skupinu obecného vzorce $-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_m\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, kde m znamená číslo od 8 do 18, tj. Z znamená N'-acylovaný lysinový zbytek.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž je shora uvedená skupina Z připojena na C-koncovou aminokyselinu B-řetězce, při čemž Z znamená skupinu obecného vzorce $-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_p\text{NH}-\text{COCH}((\text{CH}_2)_q\text{COOH})\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_r\text{CH}_3$, kde p znamená číslo od 10 do 16.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, v němž je shora uvedená skupina Z připojena na C-koncovou aminokyselinu B-řetězce, při čemž Z znamená skupinu obecného vzorce $-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_q\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_s\text{CH}_3$, kde q znamená číslo od 10 do 16.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, který má shora uvedenou skupinu Z, která obsahuje částečně nebo úplně hydrogenovaný cyklopentanfenantrenový skelet.

V jiném výhodném provedení se vynález týká inzulínového derivátu, který má shora uvedenou skupinu Z, která znamená acylovanou aminokyselinu, zvláště acylovaný lysin.

V jiném výhodném provedení se vynález týká Thr^{B29} lidského inzulínu, který má shora uvedenou skupinu Z připojenu na C-koncovou aminokyselinu B-řetězce.

V jiném výhodném provedení se vynález týká des(B28-B30) lidského inzulínu, který má shora uvedenou skupinu Z připojenu na C-koncovou aminokyselinu B-řetězce.

V jiném výhodném provedení se vynález týká des(B27-B30) lidského inzulínu, který má shora uvedenou skupinu Z připojenu na C-koncovou aminokyselinu B-řetězce.

V jiném výhodném provedení se vynález týká des(B26-B30)

lidského inzulinu, který má shora uvedenou skupinu Z připojenu na C-koncovou aminokyselinu B-řetězce.

V jiném výhodném provedení se vynález týká použití inzulinového derivátu podle vynálezu pro výrobu léčivého přípravku pro léčení diabetes.

V jiném výhodném provedení se vynález týká farmaceutického přípravku pro léčení diabetes pacientů, kteří toto léčení potřebují, při čemž tento přípravek obsahuje terapeuticky účinné množství inzulinového derivátu podle vynálezu společně s farmaceuticky přijatelným nosičem.

V jiném výhodném provedení se vynález týká farmaceutického přípravku pro léčení diabetes u pacientů, kteří toto léčení potřebují, při čemž tento přípravek obsahuje terapeuticky účinné množství inzulinového derivátu podle vynálezu ve směsi s inzulinem nebo analogem inzulinu, který má rychlý nástup působení, společně s farmaceuticky přijatelným nosičem.

V jiném výhodném provedení se vynález týká farmaceutického přípravku, který obsahuje inzulinový derivát podle vynálezu, který je rozpustný při fyziologických hodnotách pH.

V jiném výhodném provedení se vynález týká farmaceutického přípravku, který obsahuje inzulinový derivát podle vynálezu, který je rozpustný při pH v rozmezí od 6,5 do 8,5.

V jiném výhodném provedení se vynález týká protražovaného farmaceutického přípravku obsahujícího inzulinový derivát podle vynálezu.

V jiném výhodném provedení se vynález týká farmaceutického přípravku, kterým je roztok obsahující od 120 nmolů/ml do 1200 nmolů/ml, s výhodou 600 nmolů/ml inzulinového derivátu podle vynálezu.

V jiném výhodném provedení se vynález týká způsobu léčení diabetes u pacienta, který toto léčení potřebuje, vyznačující se tím, že se pacientovi podává terapeuticky účinné množství inzulinového derivátu podle tohoto vynálezu společně s farmaceuticky přijatelným nosičem.

V jiném výhodném provedení se vynález týká způsobu léčení diabetes u pacienta, který toto léčení potřebuje, vyznačující se tím, že se pacientovi podává terapeuticky účinné množství inzulinového derivátu podle tohoto vynálezu ve směsi s inzulinem nebo analogem inzulinu, který má rychlý nástup působení, společně s farmakologicky přijatelným nosičem.

Příklady výhodných inzulinových derivátů podle předloženého vynálezu jsou následující;

(N^{B30}-tetradekanoyl)Thr^{B29},Lys^{B30}-lidský inzulin,
 (N^{B28}-tetradekanoyl)Lys^{B28}des(B29,B30)-lidský inzulin,
 (N^{B27}-tetradekanoyl)Lys^{B27}des(B28-B30)-lidský inzulin,
 (N^{B26}-tetradekanoyl)Lys^{B26}des(B27-B30)-lidský inzulin,
 (N^{B32}-tetradekanoyl)Glu^{B30},Ser^{B31},Lys^{B32}-lidský inzulin a
 (N^{B29}-acetyl,N^{B32}-tetradekanoyl)Glu^{B30},Ser^{B31},Lys^{B32}-lidský inzulin.

Předložený vynález je dále ilustrován odkazem na připojené obrázky, kde:

obrázek 1 ukazuje konstrukci plasmidů pKV153, pKV159, pJB173, pJB174 a pJB175 a

obrázek 2a, který pokračuje jako obrázek 2b, ukazuje sekvenci pMT742, poloha 907 až 1500, a oligonukleotidy č. 94, č. 593, č. 2371 a č. 3075 použité pro pCR1A, pCR1B a pCR1C z příkladu 1. Sekvence o 138 aminokyselinách odpovídající MF alfa prepro-leaderu (aminokyseliny č. 1 až 85) a inzulinový prekurzor, který má aminokyselinovou sekvenci B(1-29)AlaAlaLys.A(1-21), kde A(1-21) znamená A řetězec lidského inzulinu a B(1-29) znamená B-řetězec lidského inzulinu, v němž chybí Thr(B30), je uvedena pod kódující sekvencí (aminokyseliny č. 86 až 138).

V další části spisu bude vynález popsán podrobněji.

Třípísmenkové kódy a jednopísmenkové kódy pro zbytky aminokyselin, jak jsou zde používány, jsou uvedeny v J. Biol. Chem. 243, 3558 (1968).

V DNA sekvencích A znamená adenin, C znamená cytosin, G znamená guanin a T znamená thymin.

Ve spisu jsou používány následující zkratky:

DMSO pro dimethylsulfoxid,

DMF pro dimethylformamid,

Boc pro terc.butoxykarbonyl,

NMP pro 1-methyl-2-pyrrolidon,

TFA pro trifluoroctovou kyselinu,

X-OSu pro N-hydroxysukcinimidový ester,

X pro acylovou skupinu a

RP-HPLC pro vysokoučinnou kapalinovou chromatografii na obrácených fázích.

Příklady provedení vynálezu

Inzulínové deriváty podle předloženého vynálezu se mohou připravovat mimo jiné následujícími způsoby.

1. Inzulínové deriváty, vyznačující se tím, že mají v poloze B30 aminokyselinový zbytek, který může být kódován genetickým kódem, např. threonin (lidský inzulín) nebo alanin (vepřový inzulín)

- 1.1 Inzulíny modifikované připojením lipofilní skupiny W na N-koncovou aminovou skupinu, vycházející z lidského inzulínu

Lidský inzulín se nechá zreagovat s Boc-reakčním činidlem (např. di-terc.butyldikarbonátem). Vytvoří se (A1,B29)-diBoc-lidský inzulín, tj. lidský inzulín, v němž N-konec A-řetězce

a ϵ -aminoskupina Lys^{B29} jsou chráněny Boc-skupinou. Po případném vyčištění, např. HPLC, se do α -aminové skupiny Phe^{B1} zavede acylová skupina tak, že se produkt nechá zreagovat s N-hydroxysukcinimidovým esterem obecného vzorce W-OSu, v němž W znamená acylovou skupinu jak shora uvedeno, která má být zavedena na N-koncovou α -aminovou skupinu B-řetězce. V konečném stupni se pro odstranění Boc-skupin použije TFA. Isoluje se produkt - N^{acB1}-W lidský inzulin.

2. Inzulínové deriváty bez aminokyselinového zbytku v poloze B30, tj. des(B30) inzulin

2.1 Výchozím materiálem je lidský nebo vepřový inzulin

Reakcí s karboxypeptidasou A v amoniakovém pufru jak lidský tak vepřový inzulin poskytly des(B30)-inzulin. Po případném vyčištění se des(B30)-inzulin nechá zreagovat s Boc-reakčním činidlem (např. di-terc.butyl-dikarbonátem). Vznikne (A1,B29)-diBoc-des(B30)-inzulin. Po případném vyčištění, např. HPLC, se do α -aminové skupiny aminokyseliny v poloze B1 zavede acylová skupina tak, že se produkt nechá zreagovat s N-hydroxysukcinimidovým esterem obecného vzorce W-OSu, v němž W znamená acylovou skupinu, která má být zavedena. V konečném stupni se pro odstranění Boc-skupin použije TFA. Isoluje se produkt - (N^{acB1}-W)des(B30)-inzulin.

2.2. Výchozím materiálem je prekursor lidského inzulinu s jedním řetězcem

Jako výchozí materiál se může použít prekursor lidského inzulinu s jedním řetězcem, který je rozšířen v poloze B1 přidáním Ext, které je napojeno B1 argininovým zbytkem a který má můstek od C-koncového lysinu v poloze B26, B27, B28 nebo B30 na A1. Tímto můstkem je s výhodou peptid obecného vzorce Y_n-Arg, v němž Y znamená kodovatelnou aminokyselinu kromě cysteinu, lysinu a argininu, a n znamená číslo nula nebo číslo mezi 1 a 35. Jestliže n>1, Y mohou znamenat různé aminokyseliny.

Výhodnými příklady můstku od Lys v poloze B26, B27, B28 nebo B30 na A1 jsou: AlaAlaArg, SerArg, SerAspAspAlaArg a Arg (evropský patent č. 163 529). Reakce tohoto prekursoru obecného vzorce Ext-Arg-B(1-Q)-Y_n-Arg-A(1-21), v němž Q znamená 26, 27, 28 nebo 30, s lysylendopeptidasou, např. *Achromobacter lyticus* proteasou, poskytuje Ext-Arg-B(1-Q) Y_n-Arg-A(1-21)-inzulín. Acylace tohoto meziprojektu N-hydroxysukcinimidovým esterem obecného vzorce X-OSu, v němž X znamená acylovou skupinu, zavádí acylovou skupinu X do ε-aminové skupiny Lys^{BO} a do N-koncové aminoskupiny A-řetězce a B-řetězce za vzniku (N^{BO}-X) X-Ext-Arg-B(1-Q) X-Y_n-Arg-A(1-21)-inzulínu. Tento meziprojekt reakcí s trypsinem ve směsi vody a vhodného organického rozpouštědla, např. DMF, DMSO nebo nižšího alkoholu, poskytuje žádaný derivát, Z-lidský inzulin, v němž Z znamená Lys^{BO}-X.

V další části popisu jsou popsány farmaceutické přípravky.

Farmaceutické přípravky obsahující derivát lidského inzulinu podle předloženého vynálezu se mohou pacientům, kteří to potřebují, podávat parenterálně. Parenterální podávání se může provádět subkutánní, intramuskulární nebo intravenózní injekcí injekční stříkačkou, popřípadě injekčním perem. Parenterální podávání se může provádět také infuzní pumpou. Další volbou je prostředek, kterým může být prášek nebo kapalina pro podávání derivátu lidského inzulinu jako nazální sprej.

Farmaceutické prostředky obsahující sloučeninu podle předloženého vynálezu se mohou připravovat konvenčními způsoby, např. jak je popsáno v Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985.

Injektovatelné lidské inzulinové prostředky podle vynálezu se mohou připravovat konvenčními způsoby farmaceutického průmyslu, které zahrnují rozpouštění a smíchání složek tak, aby se získal žádaný produkt.

Podle jednoho postupu se lidský inzulinový derivát rozpou-

tí v takovém množství vody, které je poněkud menší než konečný objem prostředku, který se připravuje. Podle potřeby se přidá isotonické činidlo, ochranné činidlo a pufr a pH roztoku se upraví, jestliže je to nutné, kyselinou, např. kyselinou chlorovodíkovou, nebo bází, např. vodným hydroxidem sodným, podle potřeby. A nakones se objem roztoku upraví vodou tak, aby se získala žádaná koncentrace složek.

Příklady isotonických činidel jsou chlorid sodný, manitol a glycerol.

Příklady ochranných činidel jsou fenol, m-kresol, methylester p-hydroxybenzoové kyseliny a benzylalkohol.

Příklady vhodných pufrů jsou octan sodný a fosforečnan sodný.

Výhodnými farmaceutickými prostředky příslušných inzulinů podle předloženého vynálezu jsou roztoky hexamerních komplexů. Hexamerní komplexy jsou typicky stabilizovány dvěma nebo více ionty zinku a třemi nebo více molekulami fenolické sloučeniny, jako je fenol nebo m-kresol nebo jejich směsi na hexamer.

Ve zvláštním provedení se získává prostředek, který obsahuje dva různé inzulíny, jeden s protrahovaným profilem působení a jeden s rychlým nástupem působení, ve formě rozpustných hexamerních komplexů. Hexamerní komplexy jsou typicky stabilizovány dvěma nebo více ionty zinku a třemi nebo více molekulami fenolické sloučeniny, jako je fenol nebo meta-kresol nebo jejich směsi, na hexamer. Tyto komplexy jsou směsí hexamerů příslušných inzulinů a směsných hexamerů, v nichž je poměr mezi dvěma různými inzulíny od 1:5 do 5:1.

Prostředek pro nazální podávání inzulinového derivátu podle předloženého vynálezu se může připravovat například tak, jak je to popsáno v evropském patentu č. 272 097 (Novo Nordisk A/S).

Inzulínové prostředky podle tohoto vynálezu se mohou používat pro léčení diabetes. Optimální dávka pro pacienta bude záviset na různých faktorech, mezi něž patří účinnost specifického používaného lidského inzulínového derivátu, věk, tělesná hmotnost, fyzická aktivita, dieta pacienta, na možné kombinaci s jinými léčivými látkami a na intenzitě diabetes. Doporučuje se, aby denní dávka lidského inzulínového derivátu podle tohoto vynálezu byla stanovena pro každého jednotlivého pacienta odborníkem z oblasti techniky podobným způsobem jako je to u známých inzulínových prostředků.

Jestliže je to vhodné, deriváty lidského inzulínu podle tohoto vynálezu se mohou používat ve směsi s jinými typy inzulínů, například lidským inzulínem, vepřovým inzulínem nebo analogy inzulínu s rychlejším nástupem působení. Příklady těchto analogů inzulínu jsou popsány např. v evropských patentových přihláškách č. 214 826 (Novo Nordisk A/S), 375 437 (Novo Nordisk A/S) a 383 472 (Eli Lilly & Co.).

Předložený vynález je dále ilustrován následujícími příklady, které však nejsou zkonstruovány jako omezení rozsahu ochrany. Vlastnosti popsané v předcházejícím popisu a v následujících příkladech mohou, jak odděleně tak v jakékoliv kombinaci, být materiálem pro uskutečnění vynálezu v jeho různých formách.

Plasmidy a DNA materiál

Všechny expresní plasmidy jsou typu cPOT. Takové plasmidu jsou popsány v evropské patentové přihlášce č. 171 142 a vyznačují se tím, že obsahují *Schizosaccharomyces pombe* triosofosfátisomerasový gen (POT) pro selekci a stabilizaci plasmidu. Plasmid obsahující POT-gen je dostupný z uloženého *E. coli* kmeny (ATCC 39 685). Plasmidy dále obsahují *S. cerevisiae* triosofosfátisomerasový promotor a terminátor (P_{TPI} a T_{TPI}). Jsou identické s pMT742 [Egel-Mitani M. a spol.: *Gene* **73**, 113 až 120 (1988).] (viz obr. 1) až na oblast definovanou EcoRI-XbaI res-

trikčními místy zahrnujícími oblast kodující MF alfa prepro-leader/produkt. EcoRI/XbaI fragment plasmidu pMT742 samotný koduje MF alfa prepro-leader sekvenci *Saccharomyces cerevisiae* následovanou inzulinovým prekursorem MI3, který má můstek Ala-Ala-Lys spojující B29 a A1 (tj. B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21)) (viz obr. 2).

Syntetické DNA fragmenty byly syntetizovány na automatickém syntetizátoru DNA (Applied Biosystems model 380A) pomocí fosforamiditové chemie a komerčně dostupných reakčních činidel [Beaucage S.L. a Caruthers M.H.: *Tetrahedron Letters* **22**, 1859 až 1869 (1981).].

Všechny další způsoby a materiály používají obvyklý stav znalostí z oblasti techniky [viz např. Sambrook J., Fritsch E. F. a Maniatis T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.).].

Analytické způsoby

Molekulární hmotnosti vyrobených inzulinových prekursorů byly získány hmotnostní spektroskopií (MS), buď hmotnostní spektrometrií s desorpcí plasmou (PDMS) použitím přístroje Bio-Ion 20 (Bio-Ion Nordic AB, Uppsala, Švédsko) nebo hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrospřejem (ESMS) použitím přístroje API III Biomolecular Mass Analyzer (Perkin Elmer Sciex Instruments, Thornhill, Kanada).

Lipofilnost inzulinových derivátů vzhledem k lidskému inzulinu, k'_{rel} , byla měřena na HPLC koloně LiChrosorb^(R) RP 18 (5 μ m, 250 x 4 mm) isokratickou elucí při 40 °C použitím směsi A: 0,1M pufr fosforečnanu sodného, pH 7,3, obsahující 10 % (hmotn.) acetonitrilu a B: 50 % (hmotn.) acetonitrilu ve vodě. Eluce byla sledována absorpcí eluátu při 214 nm. Mrtvý čas t_0 byl zjištěn injektováním 0,1mM dusičnanu sodného. Retenční doba lidského inzulinu t_{human} byla upravena měněním poměru roztoků A a B tak, aby činila alespoň 2 t_0 . Hodnota k'_{rel} je definována

jako poměr $(t_{\text{derivátu}} - t_0) / (t_{\text{human}} - t_0)$.

Jako míra protrahování (zpomalené uvolňování) sloučeniny podle vynálezu byla studována rychlost mizení u prasat a byla stanovena hodnota $T_{50\%}$. $T_{50\%}$ je doba, za kterou vymizí 50 % hmotn. A14 Tyr(^{125}I)-značeného analogu z místa injekce, měřeno vnějším γ -počítačem (Ribet U. a spol.: "The Pig as a Model for Subcutaneous Absorption in Man", V.M.Serrano-Rios a P.J.Lefebvre (red.): Diabetes 1985; Proceedings of the 12th Congress of the International Diabetes Federation", Madrid, Španělsko, 1985 (Excerpta Medica, Amsterdam, 891 až 896 (1986).).)

Příklad 1

Syntéza Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-29)-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinového prekursoru z kvasinkového kmene yKV153 použitím *S.cerevisiae* MF alfa prepro-leaderu

Byly syntetizovány následující oligonukleotidy:

č. 593 5'-CCAAGTACAAAGCTTCAACCAAGTGGGAACCGCACAAAGTGTGGTTAA
CGAATCTTGTAGCCTTTGGTTCAGCTTCAGCTTCAGCTTCTTCTCTTTAT
CCAAAGAAACACC-3'

č. 94 5'-TAAATCTATAACTACAAAAACACATA-3'

č. 3075 5'-TTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGTGAAAGAGGTTTCTTCTAC
ACTCCTAAGTCTGACGATGCTAGAGGTATTG-3' a

č. 2371 5'-TTAATCTTAGTTTCTAGAGCCTGCGGG-3'.

Byly provedeny následující dvě polymerasové řetězové reakce (PCR) pomocí sestavy Gene Amp PCR reagent kit (Perkin Elmer, 761 Main Ave, Walk, Kt. USA) podle pokynů výrobce (viz obr. 2).

PCR1A:

0,2 μ l pMT742 plasmidového templátu
4,0 μ l oligonukleotidu č. 593 (100 pmolů)
4,0 μ l oligonukleotidu č. 94 (100 pmolů)
10,0 μ l 10x PCR pufru
10,0 μ l 2,5Mm dNTP
0,5 μ l Taq polymerasového enzymu
71,3 μ l vody

PCR1B:

0,2 μ l pMT742 plasmidového templátu
4,0 μ l oligonukleotidu č. 3075 (100 pmolů)
4,0 μ l oligonukleotidu č. 2371 (100 pmolů)
10,0 μ l 10x PCR pufru
10,0 μ l 2,5Mm dNTP
0,5 μ l Taq polymerasového enzymu
71,3 μ l vody

V obou případech byly provedeny dva cykly při 94 °C 1 min., 45 °C 1 min. a 72 °C 1 min. a následně 11 cyklů: 94 °C 1 min., 55 °C 1 min. a 72 °C 1 min.

20 μ l každé PCR směsi se nanese na 2% (hmotn.) agarosový gel a podrobí se elektroforéze standardními způsoby [Sambrook a spol.: "Molecular Cloning", Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.]. Výsledné DNA fragmenty (452 párů nukleotidů od PCR1A a 170 párů nukleotidů od PCR1B) byly vyříznuty z agarosového gelu a byly izolovány sestavou Gene Clean (Bio101 Inc., PO Box 2284, La Jolla, Ka. USA) podle pokynů výrobce. Vyčištěné DNA fragmenty byly rozpuštěny ve 100 μ l vody.

Byla provedena následující PCR:

PCR1C:

1,0 μ l DNA fragmentu z PCR1A
1,0 μ l DNA fragmentu z PCR1B
10,0 μ l 10x PCR pufru

10,0 μ l 2,5Mm dNTP

0,5 μ l Tag polymerasového enzymu

69,5 μ l vody

Byly provedeny dva cykly při 94 °C 1 min., 45 °C 1 min.
a 72 °C 1 min.

Potom byly přidány 4 μ l oligonukleotidu č. 94 (100 pmolů
a 4,0 μ l oligonukleotidu č. 2371 (100 pmolů). To bylo provedeno
15 cyklů při 94 °C 1 min., 55 °C 1 min. a 72 °C 1 min.

PCR směs se nanese na 1% (hmotn.) agarosový gel. Výsledné
fragменты o 594 párech nukleotidů (pn.) se vyčistí sestavou
Gene Clean Kit jak shora popsáno. Vyčištěný PCR DNA fragment
se rozpustí ve 20 μ l vody a pufru restričních endonukleas a
rozštěpí se restričními endonukleasami EcoRI a XbaI (New En-
gland Biolabs, Inc., Ma., USA). Výsledný EcoRI/XbaI restriční
fragment o 550 pn. se nechá běžet na agarosovém gelu. Isoluje
se vyčištěním sestavou Gene Clean.

Dvěma oddělenými štěpeními restričními endonukleasami se
plasmid pMT742 rozštěpí i) restričními endonukleasami ApaI a
XbaI a ii) restričními endonukleasami ApaI a EcoRI. Z těchto
štěpení se izoluje ApaI/XbaI restriční fragment o 8600 pn a
ApaI/EcoRI restriční fragment o 2100 pn

Tyto tři fragmenty (tj. EcoRI/XbaI restriční fragment o
550 pn z PCR1C, ApaI/XbaI restriční fragment o 8600 pn a ApaI/
EcoRI restriční fragment o 2100 pn z pMT742) se spolu ligují
pomocí T4 DNA ligasy za standardních podmínek [Sambrook a
spol.: "Molecular Cloning", Cold Spring Harbour Laboratory
Press, 1989.] (viz obr. 1). Ligační směs se transformuje do
příslušných E. coli buněk (Ap^r). Následuje selekce na ampicili-
novou resistenci. Z výsledných E. coli kolonií se standardními
DNA minipreparačními způsoby (Sambrook a spol.: "Molecular Clo-
ning", Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.) izolují
plasmidy, které se zkontrolují příslušnými restričními endo-

nukleasami (tj. EcoRI, ApaI a XbaI). DNA sekvenační analýzou (sestavou Sequenase od U.S. Biochemical Corp. podle pokynů výrobce) bylo ukázáno, že vybraný plasmid označený pKV153 obsahuje správnou sekvenci kodující MF alfa prepro-leader/Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-29)-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinový prekursor.

Plasmid pKV153 byl transformován do *S. cerevisiae* kmene MT663 a vybrán pro růst na glukose, jak je popsáno v evropské patentové přihlášce publikované pod č. 214 826.

Výsledný kvasinkový kmen byl označen yKV153. HPLC a hmotnostní spektrometrií bylo ověřeno, že v kultivačním mediu produkuje Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-29)-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinový prekursor.

Příklad 2

Syntéza Lys^{B30}(N^ε-tetradekanoyl)Thr^{B29}-lidského inzulinu

2a. Syntéza Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Ala-Glu-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-28)-Thr-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinového prekursoru z kvasinkového kmene yKV153 s použitím *S. cerevisiae* MF alfa prepro-leaderu

Byly syntetizovány následující oligonukleotidy:

č. 3881 5'-TTGGTTGAAGCTTTGTAAGTTGGTTTGCAGTGAAAGAGGTTTCTTCTAC
ACTCCTACCAAGTCTGACGATGCTAGAGGTATTGTTCG-3' a

č. 2371 5'-TTAATCTTAGTTTCTAGAGCCTGCGGG-3'.

Byla provedena následující polymerasová řetězová reakce (PCR) pomocí sestavy Gene Amp PCR Reagent Kit jak shora popsáno.

PCR2:

0,2 μ l pKV153 plasmidového templátu (z příkladu 1)
4,0 μ l oligonukleotidu č. 3881 (100 pmolů)
4,0 μ l oligonukleotidu č. 2371 (100 pmolů)
10,0 μ l 10x PCR pufru
10,0 μ l 2,5mM dNTP
0,5 μ l Tag polymerasového enzymu
71,3 μ l vody

Byly provedeny dva cykly při 94 °C 1 min., 45 °C 1 min. a 72 °C 1 min. a následně 11 cyklů: 94 °C 1 min., 55 °C 1 min. a 72 °C 1 min.

PCR směs se nanese na 2% (hmotn.) agarosový gel a výsledný fragment o 174 pn se vyčistí sestavou Gene Clean Kit jak shora popsáno. Vyčištěný PCR DNA fragment se rozpustí ve 20 μ l vody a pufru restričních endonukleas a rozštěpí se restričními endonukleasami HindIII a XbaI. Výsledný HindIII/XbaI restriční fragment o 153 pn se oddělí na agarosovém gelu. Isoluje a vyčistí se sestavou Gene Clean Kit.

Dvěma oddělenými štěpeními restriční endonukleasou se plasmid pMT742 rozštěpí restričními endonukleasami ApaI a XbaI, zatímco pKV153 (z příkladu 1) se rozštěpí restričními endonukleasami ApaI a EcoRI. Z těchto štěpení se z pMT742 izoluje ApaI/XbaI restriční fragment o 8600 pn a z pKV153 ApaI/EcoRI restriční fragment o 2100 pn

Tyto tři fragmenty (tj. EcoRI/XbaI restriční fragment o 550 pn z PCR2, ApaI/XbaI restriční fragment o 8600 pn z pMT742 a ApaI/EcoRI restriční fragment o 2100 pn z pKV153) se spolu ligují pomocí T4 DNA ligasy jak shora popsáno (viz obrázek 1). Ligační směs se transformuje do příslušných E. coli buněk (Ap^r). Následuje selekce na ampicilinovou resistenci. Z výsledných E. coli kolonií se izolují plasmidy, které se zkontrolují příslušnými restričními endonukleasami (tj. HindIII, ApaI a XbaI) jak shora popsáno.

DNA sekvenační analýzou bylo ukázáno, že vybraný plasmid označený pKV159 obsahuje správnou sekvenci kodující MF alfa prepro-leader/Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Glu-Ala-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-28)-Thr-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinový prekursor.

pKV159 byl transformován do *S. cerevisiae* kmene MT663 a vybrán pro růst na glukose jak shora popsáno.

Výsledný kvasinkový kmen byl označen yKV159. HPLC a hmotnostní spektrometrií bylo ověřeno, že v kultivačním mediu produkuje Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-28)-Thr-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinový prekursor.

2b. Isolace Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-28)-Thr-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinového prekursoru

Kmen yKV159 byl fermentován 72 h. Bylo získáno 5 litrů živné půdy. Buňky kvasinek byly odstraněny odstředováním, hodnota pH byla kyselinou sírovou upravena na 3,0 a inzulinový prekursor byl zahuštěn na koloně Pharmacia Strealine^(R) 50 naplněné 300 ml ionexu Streamline^(R) SP. Po promytí 25mM citrátovým pufrem, pH 3,6, byl prekursor eluován 0,5M amoniakem. Byly sbírány frakce od 300 do 600 ml. pH bylo upraveno na 2,5 a prekursor byl vyčištěn RP-HPLC na 15 μ kulovitým C18 oxidu křemičitém o velikosti porů 1000 nm, 0,2M Na₂SO₄, pufrem 0,04M H₃PO₄ a gradientem od 23 do 33 % hmotn. acetonitrilu. Prekursor se eloval 27 až 28% (hmotn.) acetonitrilem. Spojená část obsahující střední hlavní maximum prekursoru byla odsolena gelovou filtrací na Sephadexu^(R) G-50 F v 0,5M kyselině octové. Prekursor byl izolován lyofilizací. Výtěžek: 486 mg.

2c. Syntéza Ala-Thr-Arg-B(1-28)-Thr-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinu

486 mg jednovláknového prekursoru, získaného jak shora popsáno, se rozpustí ve 30 ml 0,05M glutamátového pufru při pH 9,0. Přidají se 3 ml imobilizovaného A. lyticus proteasového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 45). Po mírném míchání po dobu 5 h při 30 °C se gel odstraní filtrací. Rozšířený inzulin o dvou řetězcích se překrystaluje přidáním 10 ml ethanolu, 845 mg dihydrátu citrátu sodného a 78 mg chloridu zinečnatého. Po úpravě pH na 6,1 a skladování přes noc při 4°C se krystaly isolují odstředováním, promyjí se dvakrát isopropanolem a vysuší se ve vakuu. Výtěžek 450 mg.

2d. Syntéza N^{6A-5}, N^{6B-3}, N^{6B30}-tris(tetradekanolyl)-Ala-Thr-Arg-B(1-28)-Thr-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinu

450 mg rozšířeného inzulinu o dvou řetězcích, získaného jak shora uvedeno, se rozpustí ve směsi 3,15 ml DMSO a 0,69 ml 2M diisopropylethylaminu v NMP. Tento roztok se ochladí na 15 °C a přidá se 0,69 ml 0,3M N-hydroxysukcinimidového esteru tetradekanové kyseliny v DMSO/NMP (1:1, obj. díly). Po 2 h při 15 °C se reakce zastaví přidáním 112 ml 0,01M glycinového pufru v ethanolu/vodě (60:40, obj.) a pH se upraví na 10,0. Nebyl izolován triacylovaný meziprodukt.

2e. Syntéza Lys^{B30}(N⁶-tetradekanoyl)-Thr^{B29} lidského inzulinu

K roztoku z předcházejícího stupně se přidá 5 ml imobilizovaného trypsinového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 46). Po mírném míchání při 15 °C po dobu 16 h se gel odstraní odfiltrováním, pH se upraví na 9,0 a roztok se nanese na kolonu (2,5 x 25 cm) s náplní QAE-Sephadex^(R) A-25. Isokratická eluce byla prováděna rychlostí 17,3 ml/h 0,12M NH₄Cl pufrem ve směsi ethanol/voda (60:40, obj.) upraveném amoniakem na pH 9,0. Titulní sloučenina vycházela z kolony po eluování 650 ml. Byl spojen podíl od 650 do 754 ml. Nakonec byl pufr změněn na 0,01M NH₄HCO₃.

gelovu filtrací na náplni Sephadex^(R) G-50 Fine. Produkt byl izolován v suchém stavu lyofilizací. Výtěžek: 91 mg.

Molekulová hmotnost titulní sloučeniny zjištěná MS: 6020 $\pm$ 6, vypočteno: 6018. Molekulová hmotnost B-řetězce zjištěná MS: 3642 $\pm$ 5, vypočteno: 3640. Molekulová hmotnost C-koncového fragmentu B-řetězce rozštěpeného V8 proteasou zjištěná MS: 1326 $\pm$ 2, vypočteno: 1326. Relativní lipofilnost k'_{rel} 113. Poločas vymizení $T_{50\%}$ po subkutánní injekci vepřům: 20,3 $\pm$ 5,2 h (n=6).

Příklad 3

Syntéza Lys^{B28} (N⁶-tetradekanoyl)-des(B29-B30)-lidského inzulinu

3a. Syntéza Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinového prekursoru z kvasinkového kmene yJB173 použitím *S. cerevisiae* MF alfa prepro-leaderu

Byly syntetizovány následující oligonukleotidy:

č. 627 5'-CACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTGCGGTGAAAGAGGTTTCTTC
TACACTAAGTCTGACGATGCTAG-3' a

č. 2371 5'-TTAATCTTAGTTTCTAGAGCCTGCGGG-3'.

DNA kodující Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) byla zkonstruována stejným způsobem jako je popsáno v příkladu 2 s náhradou oligonukleotidu č. 3881 oligonukleotidem č. 627.

Výsledný plasmid byl označen pJB173 a kvasinkový kmen exprimující Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) byl označen yJB173.

3b. Isolace Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinového prekursoru

Kmen yJB173 byl fermentován 72 h. Bylo získáno 4,8 l živné pudy. Buňky kvasinek byly odstraněny odstředováním a hodnota pH byla kyselinou sírovou upravena na 3,0. Vodivost byla 7,8 mS/cm. Inzulínový prekursor byl zahuštěn na koloně Pharmacia Strealine^(R) 50 naplněné 300 ml ionexu Streamline^(R) SP. Po promytí 25mM citrátovým pufrém, pH 3,6, byl prekursor eluován 0,5M amoniakem. Byly sbírány frakce od 300 do 600 ml. Volný amoniak byl ve vakuu odpařen za teploty místnosti. Hodnota pH výsledných 280 ml byla upravena kyselinou chlorovodíkovou na 9,0.

3c. Syntéza Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Lys, Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinu

280 ml roztoku 118 mg jednovláknového prekursoru, získaného jak shora popsáno, se přidají 3 ml imobilizovaného A. lyticus proteasového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 45). Po mírném míchání po dobu 24 h při 30 °C se gel odstraní filtrací. pH bylo upraveno na 3,5. Roztok byl zfiltrován 0,45μ filtrem Millipore^(R). Rozšířený inzulin se dvěma řetězci byl vyčištěn ve dvou podílech RP-HPLC na 15μ kuličkovitém C18 oxidu křemíciťem o velikosti porů 1000 nm (kolona 2 x 20 cm), 0,2M Na₂SO₄, 0,04M H₃PO₄, pH 3,5, jako pufr a gradientem od 23 do 33 % hmotn. acetonitrilu rychlostí 4 ml/min a teplotě kolony 40 °C. Rozšířený inzulin s dvojitým řetězcem se eluoval při 30 až 31 % (hmotn.) acetonitrilu. Acetonitril byl ze spojených podílů (70 ml) odstraněn odpařením ve vakuu. Soli byly odstraněny gelovou filtrací na koloně (5 x 47 cm) Sephadexu G-50 F v 0,5M kyselině octové. Rozšířený inzulin s dvojitým řetězcem byl izolován lyofilizací. Výtěžek: 110 mg.

3d. Syntéza $N^{\alpha A-5}, N^{\alpha B-3}, N^{\alpha B28}$ -tris(tetradekanoyl)-Ala-Thr-Arg-
-B(1-27)-Lys, Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulínu

110 mg rozšířeného inzulínu o dvou řetězcích, který se získá jak shora popsáno, se rozpustí ve směsi 0,84 ml DMSO a 0,275 ml 2M diisopropylethylaminu v NMP. Tento roztok se ochladí na 15 °C a přidá se 0,185 ml 0,3M N-hydroxysukcinimidového esteru tetradekanové kyseliny v DMSO/NMP (1:1, obj. díly). Po 2 h při 15 °C se reakce zastaví přidáním 32,5 ml 0,01M glycinového pufru v ethanolu/vodě (60:40, obj.) a pH se upraví na 10,0. Nebyl izolován triacylovaný meziprodukt.

3e. Syntéza $L^{B28}(N^{\alpha}$ -tetradekanoyl)-des(B29-B30) lidského inzulínu

K výslednému roztoku z předcházejícího stupně se přidá 1,5 ml imobilizovaného trypsinového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 46). Po mírném míchání při 15 °C po dobu 18 h se gel odstraní odfiltrováním, pH se upraví na 9,0 a roztok se nanese na kolonu (1,5 x 21 cm) s náplní QAE-Sephadex^(®) A-25. Isokratická eluce byla prováděna rychlostí 10 ml/h 0,12M NH_4Cl pufrem ve směsi ethanol/voda (60:40, obj.) upravené amoniakem na pH 9,0. Titulní sloučenina vycházela z kolony po eluování 250 až 390 ml s maximem u 330 ml. Nakonec byl pufr změněn na 0,01M NH_4HCO_3 , gelovou filtrací na náplni Sephadex^(®) G-50-Fine. Produkt byl izolován v suchém stavu lyofilizací. Výtěžek: 47 mg.

Molekulová hmotnost titulní sloučeniny nalezená MS: 5820 $\pm$ 2, vypočteno: 5819. Molekulová hmotnost B-řetězce nalezená MS: 3444 $\pm$ 4, vypočteno: 3442. Molekulová hmotnost C-koncového fragmentu B-řetězce rozštěpeného V8 proteasou nalezená MS: 1128 $\pm$ 2, vypočteno: 1128. Relativní lipofilnost $k'_{rel} = 121$. Poločas vymizení $T_{50\%}$ po subkutánní injekci u vepřů: 19,6 $\pm$ 3,6 h (n = 4).

Příklad 4

Syntéza Lys^{B27}(N^c-tetradekanoyl)-des(B28-B30) lidského inzulinu

4a. Syntéza Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-26)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinového prekursoru z kvasinkového kmene yJB174 s použitím *S. cerevisiae* MF alfa prepro-leaderu

Byly syntetizovány následující oligonukleotidy:

č. 628 5'-CACTTGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCAGTAAAGAGGTTTCTTC
TACAAGTCTGACGATGCTAG-3' a

č. 2371 5'-TTAATCTTAGTTTCTAGAGCCTGCGGG-3'.

DNA kodující Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-26)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) byla zkonstruována stejným způsobem jako je popsáno v příkladu 2 až na to, že se oligonukleotid č. 3881 nahradí oligonukleotidem č. 628.

Výsledný plasmid byl označen pJB174 a kvasinkový kmen exprimující Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-26)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) byl označen yJB174.

4b. Isolace Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-26)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinového prekursoru

Kmen yJB174 byl fermentován 72 h. Bylo získáno 3,5 litru živné půdy. Buňky kvasinek byly odstraněny odstředováním, hodnota pH byla kyselinou sírovou upravena na 3,0 a roztok byl zředěn vodou na 8 litrů, aby se snížila koncentrace soli. Výsledná vodivost byla 7,9 mS/cm. Inzulinový prekursor byl zahuštěn na koloně Pharmacia Strealine^(R) 50 naplněné 300 ml ionexu Streamline^(R) SP. Po promytí 25mM citrátovým pufrem, pH 3,6, byl prekursor eluován 0,5M amoniakem. Byly sbírány frakce od 300

do 600 ml. Volný amoniak byl ve vakuu odpařen za teploty místnosti. Hodnota pH výsledných 280 ml byla upravena kyselinou chlorovodíkovou na 9,0.

4c. Syntéza Ala-Thr-Arg-B(1-26)-Lys, Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinu

K roztoku 280 ml jednovláknového prekursoru, získaného jak shora popsáno, se přidají 3 ml imobilizovaného *A. lyticus* proteasového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 45). Po mírném míchání po dobu 13 h při 30 °C se gel odstraní filtrací. pH bylo upraveno na 2,5. Roztok byl zfiltrován 0,45 μ filtrem Millipore^(R). Rozšířený inzulin s dvěma řetězci byl vyčištěn ve čtyřech podílech RP-HPLC na 15 μ kulovitém C18 oxidu křemičitém o velikosti porů 1000 nm (kolona 2 x 20 cm), 0,2M Na₂SO₄, 0,04M H₃PO₄ pufr, pH 2,5, a gradientem od 24 do 33 % hmotn. acetonitrilu. Rozšířený inzulin s dvojitým řetězcem se eluoval při 30 až 31 % (hmotn.) acetonitrilu. Acetonitril byl ze spojených podílů odstraněn odpařením ve vakuu. Soli byly odstraněny gelovou filtrací na Sephadexu G-50 F v 0,5M kyselině octové (kolona 5 x 47 cm). Rozšířený inzulin s dvojitým řetězcem byl izolován lyofilizací. Výtěžek: 69 mg.

4d. Syntéza N^{αA-5}, N^{αB-3}, N^{αB27}-tris(tetradekanolyl)-Ala-Thr-Arg-B(1-26)-Lys, Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinu

62 mg rozšířeného inzulinu o dvou řetězcích získaného jak popsáno pod 4e, se rozpustí ve směsi 0,44 ml DMSO a 0,15 ml 2M diisopropylethylaminu v NMP. Tento roztok se ochladí na 15 °C a přidá se 0,096 ml 0,3M N-hydroxysukcinimidového esteru tetradekanové kyseliny v DMSO/NMP (1:1, obj. díly). Po 2 h při 15 °C se reakce zastaví přidáním 17 ml 0,01M glycinového pufru v ethanolu/vodě (60:40, obj.) a pH se upraví na 10,0. Nebyl izolován triacylovaný meziprodukt.

4e. Syntéza L^{B27}(N⁶-tetradekanoyl)-des(B28-B30) lidského inzulínu

K roztoku z předcházejícího stupně se přidá 1 ml imobilizovaného trypsinového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 46). Po mírném míchání při 15 °C po dobu 26 h se gel odstraní odfiltrováním, pH se upraví na 9,0 a roztok se nanese na kolonu (1,5 x 25,5 cm) s náplní QAE-Sephadex^(R) A-25. Isokratická eluce byla prováděna rychlostí 17,3 ml/h 0,12M NH₄Cl pufrem ve směsi ethanol/voda (60:40, obj.) upravené amoniakem na pH 9,0. Titulní sloučenina vycházela z kolony po eluování 360 ml. Byl shromažďován podíl 272 až 455 ml. Nakonec byl pufr změněn na 0,01M NH₄HCO₃ gelovu filtrací na náplni Sephadex^(R) G-50 Fine. Produkt byl izolován v suchém stavu lyofilizací. Výtěžek: 38 mg.

Molekulová hmotnost titulní sloučeniny nalezená MS: 5720 ± 6, vypočteno: 5718. Molekulová hmotnost B-řetězce nalezená MS: 3342 ± 4, vypočteno: 3340. Molekulová hmotnost C-koncového fragmentu B-řetězce rozštěpeného V8 protesou nalezená MS: 1027 ± 2, vypočteno: 1027. Relativní lipofilnost $k'_{rel} = 151$. Poločas vymizení $T_{50\%}$ po subkutánní injekci u vepřů: 15,2 ± 2,2 h (n = 5).

Příklad 5

Syntéza Lys^{B26}(N⁶-tetradekanoyl)-des(B27-B30) lidského inzulínu

5a. Syntéza Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-25)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulínového prekursoru z kvasinkového kmene yJB175 s použitím *S. cerevisiae* MF alfa prepro-leaderu

Byly syntetizovány následující oligonukleotidy:

Č. 629 5'-CACTTG GTTGAAGCTTTG TACTTGGTTTGCGGTGAAAGAGGTTTCTTC
AAAGTCTGACGATGCTAG-3' a

Č. 2371 5'-TTAATCTTAGTTTCTAGAGCCTGCGGG-3'.

DNA kodující Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-25)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) byla zkonstruována stejným způsobem jako je popsáno v příkladu 2 až na to, že se oligonukleotid č. 3881 nahradí oligonukleotidem č. 629.

Výsledný plasmid byl označen pJB175 a kvasinkový kmen exprimující Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-25)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) byl označen yJB175.

5b. Isolace Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-25)-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulínového prekursoru

Kmen yJB175 byl fermentován 72 h. Bylo získáno 3,7 litru živné půdy. Buňky kvasinek byly odstraněny odstředováním, hodnota pH byla kyselinou sírovou upravena na 3,0 a roztok byl zředěn vodou na 8,5 litru, aby se snížila koncentrace soli. Výsledná vodivost byla 7,7 mS/cm. Inzulínový prekursor byl zahuštěn na koloně Pharmacia Strealine^(R) 50 naplněné 300 ml ionexu Streamline^(R) SP. Po promytí 25mM citrátovým pufrem, pH 3,6, byl prekursor eluován 0,5M amoniakem. Byly sbírány frakce od 300 do 600 ml. Volný amoniak byl ve vakuu odpařen za teploty místnosti. Hodnota pH výsledných 270 ml byla upravena kyselinou chlorovodíkovou na 9,0.

5c. Syntéza Ala-Thr-Arg-B(1-25)-Lys, Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulínu

K roztoku 270 ml jednovláknového prekursoru získaného jak shora popsáno se přidají 3 ml imobilizovaného A. lyticus proteasového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 45). Po mírném míchání po dobu 23 h při 30 °C se gel odstraní filtrací. pH bylo upraveno na 2,5. Roztok byl zfiltrován 0,45μ filtrem Millipore^(R). Rozšířený inzulín s dvěma řetězci byl vyčištěn ve čtyřech podílech RP-HPLC na 15μ kulovitém C18 oxidu křemičitém o velikosti porů 1000 nm (kolona 2 x 20 cm), 0,2M Na₂SO₄, 0,04M H₃PO₄ puf, 0,04M H₃PO₄ puf,

pH 3,5, a gradientem od 24 do 33 % hmotn. acetonitrilu. Rozšířený inzulin s dvojitým řetězcem se eluoval při 29 až 31 % (hmotn.) acetonitrilu. Acetonitril byl ze spojených podílů odstraněn odpařením ve vakuu. Soli byly odstraněny gelovou filtrací na Sephadex^(R) G-50 F v 0,5M kyselině octové (kolona 5 x 47 cm). Rozšířený inzulin s dvojitým řetězcem byl izolován lyofilizací. Výtěžek: 81 mg.

5d. Syntéza N^{A1-5}, N^{B3}, N^{B26}-tris(tetradekanolyl)-Ala-Thr-Arg-B(1-25)-Lys, Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinu

80 mg rozšířeného inzulinu o dvou řetězcích se rozpustí ve směsi 0,56 ml DMSO a 0,19 ml 2M diisopropylethylaminu v NMP. Tento roztok se ochladí na 15 °C a přidá se 0,124 ml 0,3M N-hydroxysukcinimidového esteru tetradekanové kyseliny v DMSO/NMP (1:1, obj. díly). Po 2 h při 15 °C se reakce zastaví přidáním 21,8 ml 0,01M glycinového pufru v ethanolu/vodě (60:40, obj.) a pH se upraví na 10,0. Nebyl izolován triacylovaný meziprodukt.

5e. Syntéza L^{B26}(N^A-tetradekanoyl)-des(B27-B30) lidského inzulinu

K roztoku z předcházejícího stupně se přidá 1 ml imobilizovaného trypsinového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 46). Po mírném míchání při 15 °C po dobu 23 h se gel odstraní odfiltrováním, pH se upraví na 9,0 a roztok se nanese na kolonu (1,5 x 25,5 cm) s náplní QAE-Sephadex^(R) A-25. Isokratická eluce byla prováděna rychlostí 19,3 ml/h 0,12M NH₄Cl pufrem ve směsi ethanol/voda (60:40, obj.) upravené amoniakem na pH 9,0. Titulní sloučenina vycházela z kolony po eluování 320 ml. Byla shromažďována frakce od 320 do 535 ml. Nakonec byl pufr změněn na 0,01M NH₄HCO₃ gelovou filtrací na náplni Sephadex^(R) G-50 Fine. Produkt byl izolován v suchém stavu lyofilizací. Výtěžek: 25 mg.

Molekulová hmotnost titulní sloučeniny nalezená MS: 5555

± 6 , vypočteno: 5555. Molekulová hmotnost B-řetězce nalezená MS: 3179 ± 4 , vypočteno: 3178. Molekulová hmotnost C-koncového fragmentu B-řetězce rozštěpeného V8 protesou nalezená MS: 864 ± 1 , vypočteno: 863,5. Relativní lipofilnost $k'_{rel} = 151$. Poločas vymizení $T_{50\%}$ po subkutánní injekci u vepřů: $14,4 \pm 1,5$ h ($n = 5$).

Příklad 6

Syntéza (N-(1-karboxytridecyl)-2-aminosukcinyl)-Phe^{ab1}-des(B30) lidského inzulinu

A1,B29-diBoc-des(B30) lidský inzulin (200 mg, 0,033 mmolu) byl rozpuštěn v DMF (15 ml). K tomuto roztoku byl přidán triethylamin (20 μ l). Přidá se N-hydroxysukcinimidový ester N-(1-karbomethoxytridecyl)-2-amidojantarové kyseliny (16 mg, 0,033 mmolu). Po 4 h za teploty místnosti se reakční směs odpaří ve vakuu dosucha. Boc skupiny se odstraní 30 minutovou reakcí s trifluoroctovou kyselinou (5 ml) za teploty místnosti. Trifluoroctová kyselina se odstraní odpařením ve vakuu. Odparek se rozpustí při 0 °C v 0,1N NaOH (20 ml). Zmýdelnění methylesteru se provede během 1 h při 0 °C. Hodnota pH reakční směsi se přidáním kyseliny octové a ethanolu (5 ml) upraví na 5,0. Vytvoří se sraženina, která se odstřeďuje.

Titulní sloučenina se ze sraženiny vyčistí ionexovou chromatografií na koloně 2,5 x 27 cm s náplní QAE Sephadex^(R) A25.

Sraženina se rozpustí ve směsi ethanolu s vodou (60:40, obj.) (25 ml) upravením hodnoty pH na 9,8 (amoniakem) a roztok se nanese na kolonu. Eluce se provádí pufrem $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ při pH 9,0, lineárním gradientem od 0,12 do 0,18M NH_4Cl v ethanolu s vodou (60:40, obj.). Celkové množství eluentu bylo 1000 ml. UF absorbance eluátu byla sledována při 280 nm. Byly sbírány frakce po 10 ml. Titulní sloučenina byla eluována z kolony ve frakcích 62 až 72. Titulní sloučenina byla vysrážena zředěním spo-

jeného podílu 2 objemy vody a úpravou pH na 5,0. Po odstředování byla sraženina promyta vodou a po druhém odstředování byl produkt vysušen ve vakuu. Výtěžek: 10 mg.

Molekulová hmotnost nalezená PDMS: 6032, vypočteno: 6032. Relativní lipofilnost $k'_{rel} = 140$. Poločas vymizení $T_{50\%}$ po subkutánní injekci u vepřů: $8,65 \pm 1,65$ h ($n = 5$).

Příklad 7

Phe^{enl}-Tetradekanolyl-glutamyl-glycyl-des(B30) lidský inzulin

A1,B29-diBoc-des(B30) lidský inzulin (200 mg, 0,033 mmolu) se rozpustí v DMF (15 ml). Přidá se triethylamin (100 μ l). Přidá se N-hydroxysukcinimidový ester myristoyl-Glu(γ -OtBu)-Gly (95 mg, 0,17 mmolu) a po 4 h za teploty místnosti se reakční směs odpaří dosucha ve vakuu. Boc a tBu skupiny byly odstraněny 30minutovou reakcí za teploty místnosti s trifluoroctovou kyselinou (5 ml). Trifluoroctová kyselina byla odstraněna odpařením ve vakuu. Titulní sloučenina byla vyčištěna ze sraženiny RP-HPLC na koloně s C18 oxidem křemičitým, eluce lineárním gradientem od 16 do 64 % hmotn. acetonitrilu v 50mM Tris/fosforečnanovém pufru obsahujícím 75mM $(NH_4)SO_4$ při pH 7. Titulní sloučenina byla eluována z kolony 50 % (hmotn.) acetonitrilu. Acetonitril byl odpařen ve vakuu. Přidá se ethanol na 20 % (obj.). Úpravou hodnoty pH na 5,0 dojde k vysrážení produktu. Po odstředování se sraženina rozpustí v 10mM NH_4HCO_3 , odsolí se gelovou filtrací na nosiči Sephadex G-25 a lyofilizuje se. Výtěžek: 97 mg.

Molekulová hmotnost nalezená PDMS: 6105, vypočteno: 6104.

Příklad 8

Syntéza Gly^{B28}, Thr^{B29}, Lys^{B30} (N'-tetradekanoyl)-lidského inzulinu

8a. Syntéza Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Gly-Thr-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21)inzulinového prekursoru z kvasinkového kmene yKV195 s použitím *S. cerevisiae* MF alfa prepro-leaderu

Byly syntetizovány následující oligonukleotidy:

č. 4790 5'-TTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGTGAAAGAGGTTTCTTCTAC
ACTGGTACCAAGTCTGACGATGCTAGAGGTATTGTCG-3' a

č. 2371 5'-TTAATCTTAGTTTCTAGAGCCTGCGGG-3'.

DNA kodující Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Gly-Thr-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) byla zkonstruována stejným způsobem jako je popsáno v příkladu 2 až na to, že se oligonukleotid č. 3881 nahradí oligonukleotidem č. 4790.

Výsledný plasmid byl označen pKV195 a kvasinkový kmen exprimující Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Gly-Thr-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) byl označen yKV195.

8b. Isolace Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Gly-Thr-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21)inzulinového prekursoru

Kmen yKV195 byl fermentován 72 h. Bylo získáno 4,4 litru živné půdy. Buňky kvasinek byly odstraněny odstředováním, hodnota pH byla kyselinou sírovou upravena na 3,0 a roztok byl zředěn 3,6 litry vody, aby se snížila koncentrace solí na vodivost 7,7 mS/cm. Inzulínový prekursor byl zahuštěn na koloně Pharmacia Strealine^(R) 50 naplněné 300 ml ionexu Streamline^(R) SP. Po promytí 3 litry 25mM citrátového pufru, pH 3,6, byl pre-

kursor eluován 0,5M amoniakem. Byly sbírány frakce od 300 do 600 ml. Volný amoniak byl ve vakuu odpařen za teploty místnosti. Hodnota pH výsledných 280 ml byla upravena kyselinou chlořovodíkovou na 9,0.

8c. Syntéza Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Gly-Thr-Lys, Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinu

K roztoku 280 ml jednovláknového prekursoru (300 mg) se přidají 3 ml imobilizovaného A. lyticus proteasového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 45). Po mírném míchání po dobu 17 h při 30 °C se gel odstraní filtrací. pH bylo upraveno na 3,5. Roztok byl zfiltrován 0,45 μ filtrem Millipore^(R). Rozšířený inzulin s dvěma řetězci byl vyčištěn ve třech podílech RP-HPLC na 10 μ kulovitém C18 oxidu křemičitém o velikosti porů 1200 nm (kolona 2 x 20 cm), 0,2M Na₂SO₄, 0,04M H₃PO₄ pufr, pH 3,5, a gradientem od 23 do 33 % hmotn. acetonitrilu při rychlosti 4 ml/min a teplotě kolony 40 °C. Rozšířený inzulin s dvojitým řetězcem se eluoval při 30 až 31% (hmotn.) acetonitrilu. Acetonitril byl ze spojených podílů (70 ml) odstraněn odpařením ve vakuu. Soli byly odstraněny gelovou filtrací na Sephadexu^(R) G-50 F v 0,5M kyselině octové (kolona 5 x 47 cm). Rozšířený inzulin s dvojitým řetězcem byl izolován lyofilizací. Výtěžek: 176 mg.

8d. Syntéza N^{6A-5}, N^{6B-3}, N^{6B30}-tris(tetradekanolyl)-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Gly-Thr-Lys, Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinu

176 mg rozšířeného inzulinu o dvou řetězcích se rozpustí ve směsi 1,4 ml DMSO a 0,275 ml 2M diisopropylethylaminu v NMP. Tento roztok se ochladí na 15 °C a přidá se 0,963 ml 0,3M N-hydroxysukcinimidového esteru tetradekanové kyseliny v DMSO/NMP (1:1, obj. díly). Po 20 h při 15 °C se reakce zastaví přidáním 50 ml 0,01M glycinového pufru v ethanolu/vodě (60:40, obj.) a pH se upraví na 10,0. Nebyl izolován triacylovaný meziprodukt.

8e. Syntéza Gly^{B28}, Thr^{B29}, Lys^{B30} (N^ε-tetradekanoyl) lidského inzulinu

K roztoku z předcházejícího stupně se přidá 2,5 ml imobilizovaného trypsinového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 46). Po mírném míchání při 15 °C po dobu 5 h se gel odstraní odfiltrváním, pH se upraví na 9,0 a roztok se nanese na kolonu (1,5 x 25,5 cm) s náplní QAE-Sephadex^(R) A-25. Isokratická eluce byla prováděna rychlostí 9,3 ml/h 0,12M NH₄Cl pufrem ve směsi ethanol/voda (60:40, obj.) upravené amoniakem na pH 9,0. Titulní sloučenina vycházela z kolony při eluování 325 až 455 ml s maximem při 380 ml. Nakonec byl pufr změněn na 0,01M NH₄HCO₃ gelovou filtrací na náplni Sephadex^(R) G-50 Fine. Produkt byl izolován v suchém stavu lyofilizací. Výtěžek: 50 mg.

Molekulová hmotnost titulní sloučeniny nalezená MS: 5979 ± 6, vypočteno: 5977. Molekulová hmotnost B-řetězce nalezená MS: 3600 ± 4, vypočteno: 3600. Molekulová hmotnost C-koncového fragmentu B-řetězce rozštěpeného V8 proteasou nalezená MS: 1286 ± 2, vypočteno: 1286. Relativní lipofilnost $k'_{rel} = 103$. Poločas vymizení $T_{50\alpha}$ po subkutánní injekci u vepřů: 17 ± 2 h (n = 4).

Příklad 9

Syntéza Gly^{B28}, Lys^{B30} (N^ε-tetradekanoyl)-lidského inzulinu

9a. Syntéza Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Gly-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinového prekursoru z kvasinkového kmene yKV196 s použitím *S. cerevisiae* MF alfa prepro-leaderu

Byly syntetizovány následující oligonukleotidy:

č. 4791 5'-TTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGTGAAAGAGGTTTCTTCTAC
ACCGGTAAGTCTGACCATGCTAGAGGTATTGTCG-3' a

č. 2371 5'-TTAATCTTAGTTTCTAGAGCCTGCGGG-3'.

DNA kodující Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-

-Thr-Arg-B(1-27)-Gly-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) byla zkonstruována stejným způsobem jako je popsáno v příkladu 2 až na to, že se oligonukleotid č. 3881 nahradí oligonukleotidem č. 4791. Výsledný plasmid byl označen pKV196 a kvasinkový kmen exprimující Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Gly-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) byl označen yKV196.

9b. Isolace Glu-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pro-Lys-Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Gly-Lys-Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinového prekursoru

Kmen yKV196 byl fermentován 72 h. Bylo získáno 3,6 litru živné pudy. Buňky kvasinek byly odstraněny odstředováním, hodnota pH byla kyselinou sírovou upravena na 3,0 a roztok byl zředěn 3,4 litry vody, aby se snížila koncentrace solí na vodivost 7,7 mS/cm. Inzulínový prekursor byl zahuštěn na 300 ml postupem popsaným v příkladu 8b.

9c. Syntéza Ala-Thr-Arg-B(1-27)-Gly-Lys, Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinu

K roztoku 300 ml jednovláknového prekursoru (390 mg) o pH 9,0 se přidá 5 ml imobilizovaného *A. lyticus* proteasového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 45). Po mírném míchání po dobu 40 h při 30 °C se gel odstraní filtrací. pH bylo upraveno na 3,5. Roztok byl zfiltrován 0,45 μ filtrem Millipore^(R). Rozšířený inzulin s dvěma řetězci byl vyčištěn ve třech podílech RP-HPLC na 10 μ kulovitým C18 oxidu křemičitém o velikosti porů 1200 nm (kolona 2 x 20 cm), 0,2M Na₂SO₄, 0,04M H₃PO₄ pufr, pH 3,5, a gradientem od 23 do 33 % hmotn. acetonitrilu při rychlosti 4 ml/min a teplotě kolony 40 °C. Rozšířený inzulin s dvojitým řetězcem se eluoval při 29 % (hmotn.) acetonitrilu. Acetonitril byl ze spojených podílů (60 ml) odstraněn odpařením ve vakuu. Soli byly odstraněny gelovou filtrací na Sephadexu^(R) G-25 v 0,5M kyselině octové (kolona 5 x 47 cm). Rozšířený inzulin s dvojitým řetězcem byl izolován lyofilizací. Výtěžek: 154 mg.

9d. Syntéza $N^{\alpha A-5}, N^{\alpha B-3}, N^{\alpha B30}$ -tris(tetradekanolyl)-Ala-Thr-Arg-
-B(1-27)-Gly-Lys, Ser-Asp-Asp-Ala-Arg-A(1-21) inzulinu

154 mg rozšířeného inzulinu o dvou řetězcích se rozpustí ve směsi 1,05 ml DMSO a 0,329 ml 2M diisopropylethylaminu v NMP. Tento roztok se ochladí na 15 °C a přidá se 0,22 ml 0,3M N-hydroxysukcinimidového esteru tetradekanové kyseliny v DMSO/NMP (1:1, obj. díly). Po 2 h při 15 °C se reakce zastaví přidáním 40 ml 0,01M glycinového pufru v ethanolu/vodě (60:40, obj.) a pH se upraví na 10,0. Nebyl izolován triacylovaný meziprodukt.

9e. Syntéza Gly^{B28}, Lys^{B29} (N'-tetradekanoyl) lidského inzulinu

K roztoku z předcházejícího stupně se přidá 1,5 ml imobilizovaného trypsinového gelu (viz PCT/DK94/00347, strana 46). Po mírném míchání při 15 °C po dobu 21 h se gel odstraní odfiltrováním, pH se upraví na 9,0 a produkt ve 43 ml roztoku se nanesne na kolonu (1,5 x 26,0 cm) s náplní QAE-Sephadex^(R) A-25. Isokratická eluce byla prováděna rychlostí 9,5 ml/h 0,12M NH₄Cl pufrem ve směsi ethanol/voda (60:40, obj.) upraveným amoniakem na pH 9,0. Titulní sloučenina vycházela z kolony při eluování 190 až 247 ml s maximem při 237 ml. Nakonec byl pufr změněn na 0,01M NH₄HCO₃ gelovu filtrací na náplni Sephadex^(R) G-50 Fine. Produkt byl izolován v suchém stavu lyofilizací. Výtěžek: 67 mg.

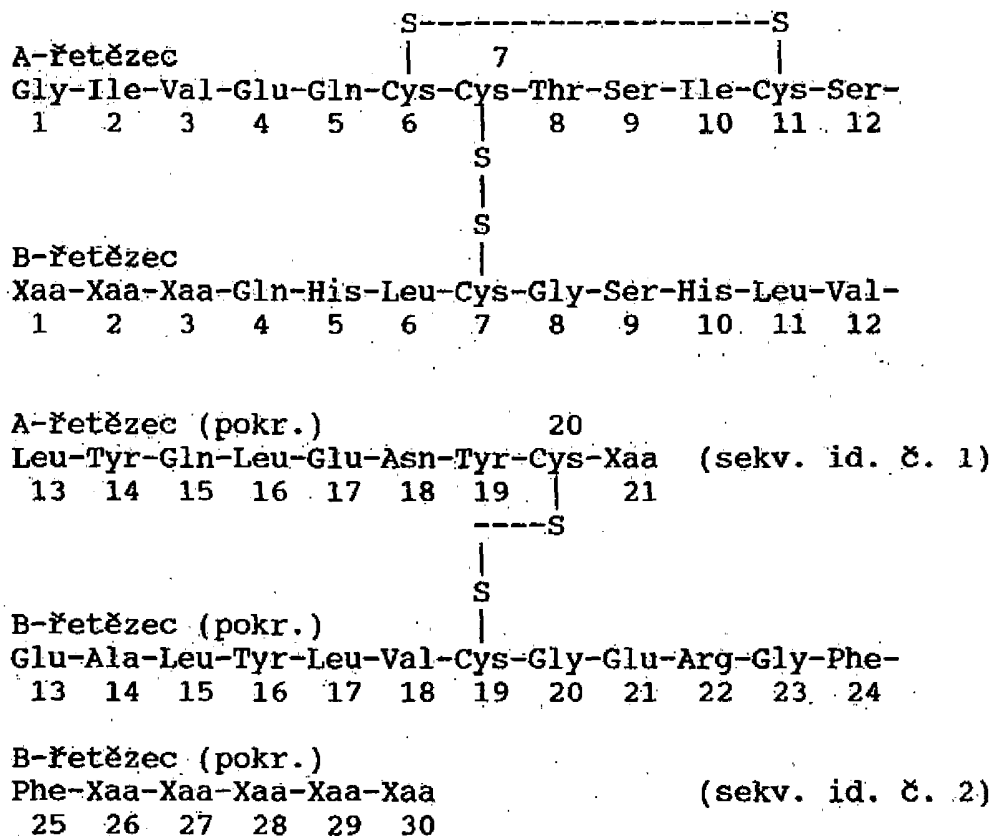
Molekulová hmotnost titulní sloučeniny nalezená MS: 5877 ± 2, vypočteno: 5876. Molekulová hmotnost B-řetězce nalezená MS: 3499 ± 3, vypočteno: 3499.

Molekulová hmotnost C-koncového fragmentu B-řetězce rozštěpeného V8 protesou nalezená MS: 1184 ± 2, vypočteno: 1185. Relativní lipofilnost $k'_{rel} = 118,5$. Poločas vymizení $T_{50\%}$ po subkutánní injekci u vepřů: 25 ± 9 h (n = 4).

27.10.97
46897

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Inzulínový derivát následující obecné sekvence



v níž

Xaa v poloze A21 znamená jakoukoliv kódovatelnou aminokyselinu kromě Lys, Arg a Cys,

Xaa v polohách B1, B2, B3, B26, B27, B28 a B29 znamenají nezávisle na sobě jakoukoliv kódovatelnou aminokyselinu vyjma Cys nebo jsou vynechány,

Xaa v poloze B30 znamená jakoukoliv kódovatelnou aminokyselinu vyjma Cys, dipeptid neobsahující Cys nebo Arg, tripeptid neobsahující Cys nebo Arg, tetrapeptid neobsahující Cys nebo Arg nebo je vynechána, a buď aminoskupina na N-konci aminokyseliny B-řetězce má lipofilní skupinu W na ni připojenou, při čemž tato skupina má 12 až 40 atomů uhlíku a popřípadě obsahuje skupinu, která může být negativně nabitá, nebo karboxyskupina na C-konci aminokyseliny B-řetězce má lipofilní skupinu Z na ni připo-

jenou, při čemž tato skupina má 12 až 40 atomů uhlíku a popřípadě obsahuje skupinu, která může být negativně nabitá, s tím, že jestliže jedna nebo více aminokyselin v poloze B1, B2 a B3 je deletováno, potom číslo N-koncové aminokyseliny se spočte odpočítáním od Cys^{B7}, který je vždy označen číslem 7, a že

a) jestliže B1-B2-B3 znamená Phe-Val-Asn, A21 znamená Asn a B26-B27-B28-B29-B30 znamená Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr nebo Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala, potom W nebo Z vždy obsahuje skupinu, která může být negativně nabitá,

b) jestliže B29 a B30 jsou deletovány a shora uvedená skupina Z je přítomna na C-konci aminokyseliny B-řetězce a ani B1, ani B2 ani B3 není deletována, potom B1-B2 neznámá Phe-Val nebo B26-B27-B28 neznámá Tyr-Thr-Pro nebo jak B1-B2 tak B26-B27-B28 znamenají jiné než uvedené sekvence, a

c) jestliže B29 a B30 jsou deletovány, shora uvedená skupina Z je přítomna na C-konci aminokyseliny B-řetězce a jedna z B1, B2 nebo B3 je deletována, potom N-koncová aminokyselina B-řetězce neznámá Val nebo sekvence B26-B27-B28 neznámá Tyr-Thr-Pro nebo jak N-koncová aminokyselina B-řetězce tak sekvence B26-B27-B28 neznámá Val, respektive Tyr-Thr-Pro.

2. Inzulínový derivát podle nároku 1, v němž lipofilní skupina W je připojena na aminovou skupinu N-koncové aminokyseliny B-řetězce.
3. Inzulínový derivát podle nároku 1, v němž lipofilní skupina Z je připojena na karboxylovou skupinu C-koncové aminokyseliny B-řetězce.
4. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 3, v němž Xaa v poloze A21 znamená aminokyselinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z Ala, Asn, Gln, Glu, Gly a Ser.

5. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, v němž Xaa v poloze B1 znamená Phe nebo je deletována.
6. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v němž Xaa v poloze B2 znamená Ala nebo Val.
7. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v němž Xaa v poloze B3 znamená aminokyselinu, která je vybrána ze skupiny sestávající z Asn, Gln, Glu a Thr.
8. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v němž Xaa v poloze B26 znamená Tyr.
9. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v němž Xaa v poloze B27 znamená Thr.
10. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v němž Xaa v poloze B28 znamená Pro.
11. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v němž Xaa v poloze B29 znamená Lys nebo Thr.
12. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v němž Xaa v poloze B30 znamená Thr nebo ϵ -acylovaný Lys.
13. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v němž Xaa v poloze B30 je deletována.
14. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v němž Xaa v poloze B28 znamená Lys a Xaa v poloze B29 znamená Pro.
15. Inzulínový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v němž Xaa v poloze B28 znamená Pro a Xaa v poloze B29 znamená Thr.
16. Inzulínový derivát podle nároku 2, v němž je shora uvedená

skupina W připojena na aminoskupinu N-koncové aminokyseliny amidovou vazbou.

17. Inzulínový derivát podle nároku 16, v němž W znamená skupinu obecného vzorce $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, kde n znamená číslo od 9 do 15.
18. Inzulínový derivát podle nároku 3, v němž je skupina Z připojena na karboxylovou skupinu C-koncové aminokyseliny amidovou vazbou.
19. Inzulínový derivát podle nároku 18, v němž Z znamená skupinu obecného vzorce $-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_n\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$, kde m znamená číslo od 8 do 18.
20. Inzulínový derivát podle nároku 19, v němž původní inzulín, na který je napojen Z, znamená Thr^{B29}-lidský inzulín.
21. Inzulínový derivát podle nároku 19, v němž původní inzulín, na který je napojen Z, znamená des(B28-B30)-lidský inzulín.
22. Inzulínový derivát podle nároku 19, v němž původní inzulín, na který je napojen Z, znamená des(B27-B30)-lidský inzulín.
23. Inzulínový derivát podle nároku 19, v němž původní inzulín, na který je napojen Z, znamená des(B26-B30)-lidský inzulín.
24. Inzulínový derivát podle nároku 1, v němž C-koncová aminokyselina B-řetězce znamená ε-acylovaný Lys a aminokyselina vedle C-koncové aminokyseliny znamená Gly.
25. Farmaceutický prostředek pro léčení diabetes pacientů, kteří toto léčení potřebují, v y z n a č u j í c í s e t ě m, že obsahuje terapeuticky účinné množství

inzulínového derivátu podle nároku 1 společně s farmaceuticky přijatelným nosičem.

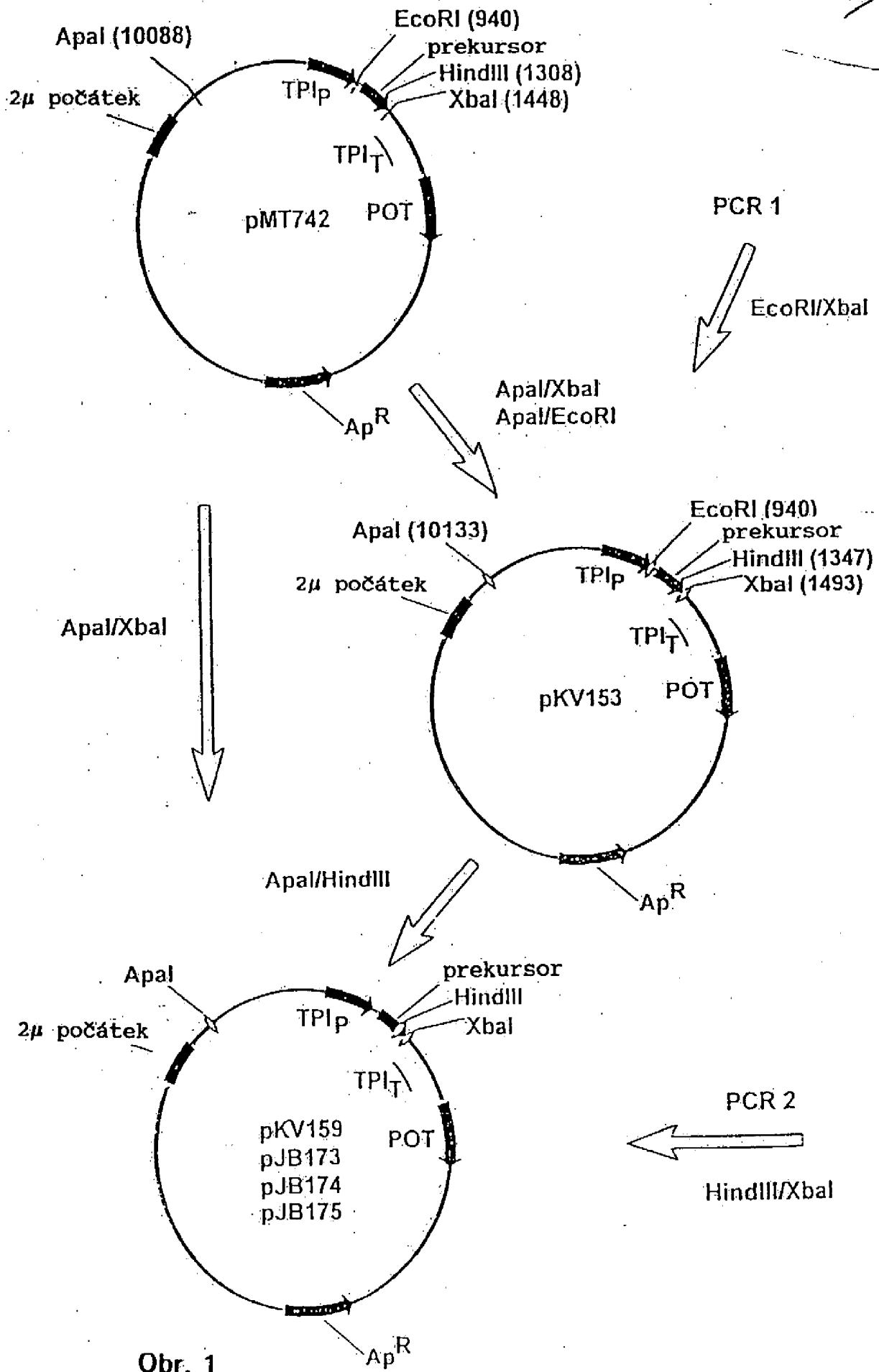
26. Farmaceutický prostředek pro léčení diabetes u pacientů, kteří toto léčení potřebují, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje terapeuticky účinné množství inzulínového derivátu podle nároku 1 ve směsi s inzulínem nebo analogem inzulínu, který má rychlý nástup působení, společně s farmaceuticky přijatelným nosičem.
27. Způsob léčení diabetes u pacienta, který toto léčení potřebuje, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pacientovi podává terapeuticky účinné množství inzulínového derivátu podle nároku 1 společně s farmaceuticky přijatelným nosičem.
28. Způsob léčení diabetes u pacienta, který toto léčení potřebuje, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pacientovi podává terapeuticky účinné množství inzulínového derivátu podle nároku 1 ve směsi s inzulínem nebo analogem inzulínu, který má rychlý nástup působení, společně s farmakologicky přijatelným nosičem.

Zastupuje:

27.10.97

1 / 3

46.09.1



Obr. 1

27.10.97

2/3

46591

#94 1

5'-TAAATCTATAACTACAAAAACACATA-3' EcoRI
 5'-CTTAAATCTATAACTACAAAAACACATACAGGAATTCCATTCAAGAATAGTTCAAACAA
 907 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 966
 3'-GAATTTAGATATTGATGTTTTTTGTGTATGTCCTTAAGGTAAGTTCTTATCAAGTTTGTT
 GAAGATTACAAACTATCAATTCATACACAATATAAACGATTAAAAGAATGAGATTTTCCT
 967 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1026
 CTTCTAATGTTTGATAGTTAAAGTATGTGTTATATTTGCTAATTTTCTTACTCTAAAGGA
 MetArgPhePro 4
 TCTATTTTTACTGCTGTTTTATTGCTGCTTCCTCCGCTTTAGCTGCTCCAGTCAACACT
 1027 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1086
 AGATAAAATGACGACAAAATAAGCGACGAAGGAGGCGAAATCGACGAGGTCAGTTGTGA
 SerIlePheThrAlaValLeuPheAlaAlaSerSerAlaLeuAlaAlaProValAsnThr 24
 ACCACTGAAGATGAAACGGCTCAAATTCAGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCTGATTTA
 1087 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1146
 TGGTGACTTCTACTTTGCCGAGTTTAAAGTGCAGTTTCGACAGTAGCCAATGAGACTAAAT
 ThrThrGluAspGluThrAlaGlnIleProAlaGluAlaValIleGlyTyrSerAspLeu 44
 GAAGGTGATTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACCTCCACCAATAACGGTTTATTG
 1147 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1206
 CTTCCACTAAAGCTACAACGACAAAACGGTAAAGGTTGAGGTGGTTATTGCCAATAAC
 GluGlyAspPheAspValAlaValLeuProPheSerAsnSerThrAsnAsnGlyLeuLeu 64
 TTTATCAATACTACTATTGCCTCCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGTGTTTCTTTGGATAAA
 1207 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1266
 AAATAGTTATGATGATAACGGAGGTAACGACGATTTCTTCTCCACAAAGAAACCTATTT
 PheIleAsnThrThrIleAlaSerIleAlaAlaLysGluGluGlyValSerLeuAspLys 84
 3'-CCACAAAGAAACCTATTT

HindIII

5'-TTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGC
 AGATTCGTTAACCAACACTTGTGCGGTTCCCATTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGC
 1267 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1326
 TCTAAGCAATTGGTTGTGAACACGCCAAGGGTGAACCAACTTCGAAACATGAACCAACG
 ArgPheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCys 104
 TCT GCAATTGGTTGTGAACACGCCAAGGGTGAACCAACTTCGAAACATGAACC-5'
 C A #593 1
 T ATGTAGCCTTTGGT
 T T TGACGATGCT
 CTTGACTTCGACTTCGAC C A
 #3075 1 T G
 GGTGAAAGAGGTTTCTTCTACACTCCTAAG AGGTATTG-3'
 GGTGAAAGAGGTTTCTTCTACACTCCTAAGGCTGCTAAGGGTATTGTGCGAACAATGCTGT
 1327 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1386
 CCACTTTCTCCAAAGAAGATGTGAGGATTCCGACGATTECCATAACAGCTTGTTACGACA
 GlyGluArgGlyPhePheTyrThrProLysAlaAlaLysGlyIleValGluGlnCysCys 124
 ACCTCCATCTGCTCCTTGTACCAATTGGAAAATACTGCAACTAGACGCAGCCCGCAGGC
 1387 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1446
 TGGAGGTAGACGAGGAACATGGTTAACCTTTTGATGACGTTGATCTGCGTCGGGCGTCCG
 ThrSerIleCysSerLeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsn*** 3'-GGGCGTCCG 138

Obr. 2a

27.10.97

~~46591~~

3/3

XbaI
1447 TCTAGAACTAAGATTAATATAATTATATAAAAAATATTATCTTCTTTTCTTTAT-3' 1500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGATCTTTGATTCTAATTATATTAATATATTTTTATAATAGAAGAAAAGAAATA-5'
AGATCTTTGATTCTAATT-5'
#2371

Obr. 2b