

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

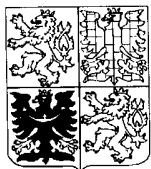
2000 - 401

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/62

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03.02.2000**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.09.2001**
(Věstník č. 9/2001)

(71) Přihlašovatel:

ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A BIOCHEMIE AV
ČR, Praha, CZ;

(72) Původce:

Klasová Lenka Mgr., Chomutov, CZ;
Ježek Jan RNDr. CSc., Praha, CZ;
Barthová Jana Doc. RNDr. CSc., Roztoky u Prahy, CZ;
Velek Jiří Ing. CSc., Praha, CZ;
Velková Vlasta RNDr., Praha, CZ;
Kašička Václav RNDr. CSc., Praha, CZ;
Ubík Karel Ing. CSc., Praha, CZ;
Škarda Josef MVDr. Dr.Sc., Praha, CZ;
Wollmer Axel Prof. Dr., Aachen, DE;
Brandenburg Dietrich Prof. Dr., Reichelsheim, DE;
Zorád Štefan Ing. CSc., Bratislava, SK;
Huml Karel RNDr. DrSc., Praha, CZ;
Barth Tomislav RNDr. DrSc., Roztoky u Prahy, CZ;

(74) Zástupce:

Patentové a licenční služby KAV ČR, tř. Politických
vězňů 7, Praha, 11121;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Zkrácené deriváty lidského insulinu

(57) Anotace:

Zkrácené deriváty lidského insulinu obecného vzorce I X - Gl - Y, kde X=desoktapeptidinsulin, Y=Phe-Phe-PheNH₂ (látko I) nebo Phe-Phe-N(CH₃)PheNH₂ (látko II) nebo Phe-N(CH₃)-Phe-PheNH₂ (látko III). Způsob výroby těchto derivátů, kde se desoktapeptid insulinu kondenzuje s tetrapeptidy vzorce gly-Phe-Phe-Phe-NH₂ nebo Gly-Phe-Phe-N(CH₃)PheNH₂ nebo Gly-Phe-N(CH₃)-Phe-PheNH₂ v přítomnosti tosylfenylalaminchlorketon trypsinu v 50 až 65 %ním dimethylformanidu při teplotě 4 až 25 °C po dobu 3 až 24 h., načež se vzniklé produkty izolují, zejména vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi.

Zkrácené deriváty lidského inzulinu

Oblast techniky

Vynález se týká nových semisyntheticky připravených zkrácených derivátů lidského inzulinu.

Dosavadní stav techniky

Krácení karboxyterminální sekvence B-řetězce lidského inzulinu je možné, ale má ve vztahu k biologickému účinku své limity. Kritická délka B řetězce inzulinu je 25 aminokyselin a to ještě za předpokladu, že koncový karboxyl fenylalaninu 25 je amidován

22 23 24 25 26 27 28 29 30
 -----Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr

Jiné řešení je zachování sekvence B²²- B²⁶. U analogů lidského inzulinu připravených semisyntheticky z desopeptid inzulinu a tetrapeptidů je viditelnější dopad následných záměn provedených v dané oblasti molekuly lépe než je tomu u desopeptid analogů lidského inzulinu (CZ Užitný vzor 6381). V CZ užitném vzoru č. 6381 byla pozornost soustředěna na destetrapeptid insuliny, v jejichž karboxyterminální části B-řetězce B²³-B²⁶ byla modifikována peptidová vazba, tj. byl substituován vodík - NH - skupiny methylovou skupinou. Cílem bylo zajistit vyšší metabolickou stabilitu proti endopeptidasovému štěpení. Zavedením N-methylované aminokyseliny (N(CH₃)fenylalaninu) do jednotlivých posic bezpochybně zvýší odolnost vazeb vůči chymotrypsinu, ale odrazí se v prostorovém uspořádání té části řetězce, která je považována za rozhodující pro interakci insulinového analogu s receptorem. Zavedením N-methylované aminokyseliny ztrácí peptidová vazba schopnost tvořit vodíkový můstek. Se změnou konformace peptidové vazby je spojena změna lokální flexibility peptidového řetězce a vzroste hydrofobicita peptidu.

Postupem peptidové syntesy na pevné fázi byly připraveny tři analogy sekvence B²³-B²⁶, které byly pomocí enzymově katalysované semisyntesy připojeny na karboxyl argininu B²². Produkty byly izolovány a charakterisovány.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou zkrácené deriváty lidského insulinu obecného vzorce I



kde X=desoktapeptidinsulin,
Y=Phe-Phe-PheNH₂ (látko I) nebo
Phe-Phe-N(CH₃)PheNH₂ (látko II) nebo
Phe-N(CH₃)-Phe-PheNH₂ (látko III)

Tetrapeptidy, které se připraví syntesou na pevné fázi se kondensují s desoktapeptid insulinem v přítomnosti tosylfenylalaninchlorketonu trypsinu v 50-65% DMF při teplotě 4-25⁰C po dobu 3-24 hodin. Vzniklé produkty se izolují, zejména vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi.

Příklady provedení

Vysvětlení zkratk

Boc	-	t-Butoxycarbonyl,
DIEA	-	Diisopropylethylamin,
DCM	-	Dichlormetan,
HOBt ester	-	Hydroxybenztriazolový ester,
DCC	-	Dicyklohexylkarbodiimid,
DMF	-	Dimethylformamid,
DMAP	-	Dimethylaminopyridin,
TFA	-	Kyselina trifluoroctová,
RP-HPLC	-	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi,
TPCK	-	Tosylfenylalaninchlorketon

Příklad 1

Tetrapeptidy byly syntetizovány na pevné fázi dle Merrifielda. K syntese byla použita 4-methylbenzhydrolaminová (MBHA) pryskyřice (substituce 0,57 mmol/g). Jako semipermanentní N-koncové chránění byla použita t-butyloxykarbonylová skupina (Boc). Synthesa byla prováděna v 0,3 mmol měřítku. Byl použit následující protokol syntesy. Pryskyřice byla neutralisována opakovaným promytím 10% DIPEA v DCM (2x5 min), potom byla promyta DCM (3x1 min). Poté byl do reaktoru s pryskyřicí přidán trojnásobný molární přebytek HOBt esteru chráněné aminokyseliny. Reakce probíhala 1 hodinu. (Ester byl připraven z Boc-aminokyseliny a HOBt působením DCC ve směsi DCM-DMF (9:1), reakční doba byla 30 minut při 0°C. Od vzniklého esteru byla odfiltrována vysrážená dicklohexylmočovina, tato promyta DCM a filtrát zahuštěn za laboratorní teploty a poté přidán DMF do výsledné koncentrace přibližně 0,1 M. Výjimkou byly kondensace Boc-N(CH₃)Phe, kdy kondensace byla prováděna buď činidlem ByBrop/DMAP nebo HBTU/DIEA. Průběh reakce byl sledován kvalitním Kaiserovým testem, pouze však při kondensaci nemetylovaných aminokyselin. Pokud byl test negativní, následoval další reakční krok. V případě pozitivního nálezu byla kondensační reakce opakována. Po ukončení výstavby peptidového řetězce byla odštěpena N-koncová Boc skupina působením 50% TFA v DCM, reakce probíhala 25 min. Poté se pryskyřice promyla DCM, 4 x 1 min, objem DCM byl vždy 50 ml. Pryskyřice byla vysušena do konstantní váhy. Odštěpení peptidů z nosiče spolu s odštěpením chránících skupin v postranních řetězcích bylo provedeno kapalným fluorovodíkem ve směsi s anisolem (9:1) při 0°C. Fluorovodík byl vyfoukán dusíkem při 0°C a anisol extrahován vychlazeným diethyletherem (4 x 50 ml). Uvolněné peptidy byly extrahovány 20% kyselinou octovou (5 x 50 ml), pryskyřice odfiltrována a roztok peptidu lyofilisován. Čistota peptidu byla kontrolována stanovením aminokyselinového složení, RP-HPLC a hmotovou spektrometrií.

Příklad 2

Příprava [Gly²³-Phe²⁴-Phe²⁵-Phe²⁶-NH₂] destetrapeptid B27-B30 insulínu. Pro přípravu tohoto kráceného analogu byl použit následující protokol. 23mg tetrapeptidu bylo smícháno s 195 μ l DMF a 55 μ l 0,05M a CaCl₂. Bylo přidáno 22 mg desoktapeptid insulínu (DOI) a reakční směs jemně protřepána. 3 mg TPCK-trypsinu byly rozpuštěny v 50 μ l 0,05 M CaCl₂ a přidány do reakční směsi. pH reakční směsi bylo upraveno N-methylmorpholinem na hodnotu 7.0. Reakce probíhala za míchání po dobu 3 až 24 hodin, konverse byla monitorována. Reakce byla zastavena přidáním 1 ml acetonu. Sraženina byla odstředěna a supernatant oddělen, sraženina byla opětovně promyta 1 ml acetonu. Sediment byl rozpuštěn v 1,2 ml 10% kyseliny octové a výsledný roztok byl jímán a lyofilizován. Výsledný produkt byl charakterizován RP-HPLC, hmotovou spektrometrií a kapilární elektroforesou.

Příklad 3

Příprava [Gly²³-Phe²⁴-Phe²⁵-N(CH₃)Phe²⁶-NH₂]destetrapeptid B27-B30 insulínu. 10 mg peptidu bylo rozpuštěno v 98 μ l DMF a přidáno 27 μ l 0,05M CaCl₂. Poté bylo přidáno 9,1 mg DOI, šetrně zamícháno a přidáno 1,5 mg TPCK trypsinu rozpuštěného v 25 μ l 0,05 M CaCl₂. Poté bylo postupováno postupem uvedeným v příkladu 2. Reakční doba byla nejméně 3 hodiny, teplota byla mezi 5-25⁰C.

Příklad 4

Příprava [Gly²³-Phe²⁴-N(CH₃)Phe²⁵-Phe²⁶-NH₂]destetrapeptid B27-B30 insulín. 11mg příslušného tetrapeptidu bylo rozpuštěno ve 110 μ l DMF a přidáno 30 μ l 0,05 M CaCl₂. Poté bylo postupováno dle příkladu 2. Reakční doba byla nejméně 3 hodiny při teplotě 5-25⁰C.

Příklad 5

Kapilární zonová elektroforesa (CZE). Analýza čistoty připravených peptidů byla prováděna metodou CZE se zdrojem vysokého napětí 0 - 15 kV. Separačním prostorem byla křemenná kapilára s vnějším polyimidovým povlakem o vnitřním průměru 0,056 mm, vnějším průměrem 0,200 mm, celkové délce 315 mm a efektivní délce (od startu k detektoru) 200 mm. Peptidy byly analysovány v 0,5M kyseliny octové, nebo v roztoku o složení 0,04 M Tris a 0,04 M Tricinu pH 8,1. Vzorek byl nanášen manuálně a měření bylo prováděno při laboratorní teplotě. Separace probíhala v režimu konstatního napětí 10,0 kV a proud dosahoval hodnot 9,5-10,8 μ A. Detekce byla prováděna spektrofotometricky při 206 nm.

Příklad 6

Hmotová spektra jednotlivých peptidů. Měření bylo prováděno metodou FAB, která spočívá v ionisaci testovaných vzorků pomocí urychlených atomů xenonu. Vzorek byl umístěn na glycerinovou matrici. Snímání spekter bylo prováděno vícekanálovou analýsou při nízké rozlišovací schopnosti. Byl použit třísektorový hmotový spektrometr YAB-EQ s geometrií BEQQ vyrobený firmou VG Analytical Manchester. Iontový zdroj pracoval při urychlovacím napětí 8 kV.

Příklad 7

Aminokyselinové složení peptidů. Peptidy byly hydrolysovány v 6 M HCl při teplotě 110⁰C po dobu 20 hodin a jednotlivé aminokyseliny separovány na přístroji D-500 (Durrum corp.) Zastoupení prolinu a cystinu nebylo vyhodnocováno

Průmyslová využitelnost

Zkrácené deriváty lidského insulinu podle vynálezu lze využít pro základní biochemický a farmakologický výzkum a jako látky s hormonálním účinek.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Zkrácené deriváty lidského insulinu obecného vzorce I



kde X=desoktapeptidinsulin,

Y=Phe-Phe-PheNH₂ (látko I) nebo

Phe-Phe-N(CH₃)PheNH₂ (látko II) nebo

Phe-N(CH₃)-Phe-PheNH₂ (látko III)

2. Způsob výroby zkrácených derivátů lidského insulinu podle nároku 1 vyznačující se tím, že se desoktapeptid insulinu kondenzuje s tetrapeptidy vzorce Gly-Phe-Phe-Phe-NH₂ nebo Gly-Phe-Phe-N(CH₃)PheNH₂ nebo Gly-Phe-N(CH₃)-Phe-PheNH₂ v přítomnosti tosylfenylalaminchlorketon trypsinu v 50-65%ním dimethylformanidu při teplotě 4-25⁰C po dobu 3-24 h, načež se vzniklé produkty izolují, zejména vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na revezní fázi.