

C-peptid inzulin és inzulinanalógok jobb előállítására

K I V O N A T

A találmány tárgyát képezi humán inzulin vagy inzulinanalóg alábbi, I általános képletű előanyaga,

Fus-B(1-30)-RDVP-Y_n-A(1-21), ahol Fus adott esetben van jelen és jelentése egy tetszés szerinti szekvencia fúziós része, B(1-30) jelentése humán inzulin B-lánca, Y jelentése a C-terminálison bázisos aminosavval végződő aminosavlánc, n 2 és 50 között változhat, és az Y-aminosavlánc hosszát jelenti, és A(1-21) jelentése humán inzulin A-lánca, és az A- és/vagy a B-láncok aminosavak kicserélésével, deléciójával és/vagy addíciójával módosíthatók. A találmány tárgyát képezi továbbá az előanyagot kódoló DNS, a DNS-t tartalmazó vektor, az előanyag és a DNS előállítására szolgáló eljárás, valamint az előanyag és a DNS alkalmazása. A találmány tárgyát képezi továbbá humán inzulin vagy inzulinanalóg előállítására szolgáló eljárás.

A találmány humán inzulin vagy inzulinanalóg előállítására alkalmazható.

jelenlét alá írt
záró

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

C-peptid inzulin és inzulinanalógok jobb előállítására

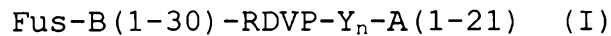
A találmány tárgyát képezi a proinzulin előanyaga, illetve C-peptidjének egy szintetikus származéka, az előanyagot kódoló DNS, azt vektor, előállításukra szolgáló eljárás, alkalmazásaik.

A származékot tartalmazó proinzulinnak többféle szempontból jobbak a tulajdonságai, mint a majomból származó proinzulinnak, elsősorban az inzulinszármazék géntechnológiai előállítása során a végső hozam kedvezőbb.

A diabéteszes megbetegedések száma világszerte folyamatosan emelkedik. Ezzel arányosan nő az igény inzulinra vagy inzulinszármazékokra. Megoldandó feladat a jelenlegi eljárásoknak a hatóanyag hozamára történő optimalizálása. Az EP-B1 0 489 780 számú európai közzétételi iratban inzulin vagy származékai előállítására szolgáló eljárásról adnak kitanítást. Az ebben ismertetett vektorok humán inzulin előállítására szolgálnak a pINT90d-plazmiddal vagy kiindulási plazmidként az EP-A 0 821 006 számú európai közzétételi iratban ismertetett pINT302d-plazmid készítéséhez, amely egy His(B31)His(B32)Gly(A21)-inzulinszármazék előállítására

szolgál, vagy az EP-A 0 885 961 számú európai közzétételi iratban ismertetett pINT329d-vektor készítéséhez, amely a Lys(B3)Glu(B29)-inzulinszármazék előállítására szolgál.

Felismertük, hogy különösen előnyös proinzulinszármazék az I általános képletű vegyület,



ahol

Fus jelentése adott esetben egy tetszés szerinti szekvencia fúziós része,

B(1-30) jelentése humán inzulin B-lánca,

Y jelentése a C-terminálison bázisos aminosavval végződő aminosavlánc,

n 2 és 50 között változhat, és az Y-aminosavlánc hosszát jelenti, és

A(1-21) jelentése humán inzulin A-lánca,

és az A- és/vagy a B-láncok aminosavak kicserélésével, deléciójával és/vagy addíciójával módosíthatók. Meglepő módon az inzulin A- illetve B-láncának összeállítása után azoknak azonos és egymástól eltérő, előnyös tulajdonságai figyelhetők meg.

Ha a humán B-láncot a humán A-lánccal az előnyös C-peptiddel kötjük össze, olyan proinzulin keletkezik, amelynek expressziós hozama a vad típusú proinzulinéhoz hasonló, és amelynek inzulinná történő enzimes feldolgozása azonban könnyebben irányítható, oly módon, hogy melléktermékként nem keletkezik argininnel meghosszabbodott B-lánc, amelyet a gyógyszerre történő előállításakor el kell választani, amely során hozamvesztés lép fel.

Ha a C-terminálison két hisztidinnel meghosszabbított B-láncot az A21-helyzetben glicint tartalmazó humán inzulin A-láncával a találmány szerinti C-peptiddel kötjük össze, akkor körülbelül 20%-kal magasabb expressziós hozamot tapasztalunk a pINT90d-plazmiddal elérhető hozammal összehasonlítva, és csaknem ötször magasabb hozamot, mint amely a pINT302d-plazmiddal nyerhető. Ezen kívül az enzimes feldolgozás ugyanúgy könnyebben irányítható, mint ezt az előzőekben ismertettük.

Ha egy Lys(B3)Glu(B29)-módosított B-láncot humán inzulin A-láncával a módosított C-peptiden keresztül kötünk össze, akkor a proinzulin-származék jobb feltekeredési tulajdonságait figyelhetjük meg a pINT329d által kódolt proinzulinnal összehasonlítva. A nyers, fúziós fehérje hozama jobb, és ugyanolyan szintet ér el, mint amely pINT90d-nél figyelhető meg. Ezen kívül az enzimes feldolgozás is egyszerűbb.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint az új C-peptid aminosavszekvenciája a következő:

CGCGATGTTTCCTCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGGCGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTG
R D V P Q V E L G G G P G A G S L Q P L -

GCGCTGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGC (1. azonosítószámú szekvencia)

A L E G S L Q K R (2. azonosítószámú szekvencia)

Bemutatjuk a fent megadott C-peptidet kódoló, sok, lehetséges DNS-szekvencia egyikét is.

A találmány tárgyát képezi humán inzulin vagy inzulinanalóg I általános képletű előanyaga,

$\text{Fus-B(1-30)-RDVP-Y}_n\text{-A(1-21)}$ (I)

ahol

Fus jelentése adott esetben egy tetszés szerinti szekvencia fúziós része,

B(1-30) jelentése humán inzulin B-lánca,

Y jelentése a C-terminálison bázisos aminosavval végződő aminosavlánc,

n 2 és 50 között változhat, és az Y-aminosavlánc hosszát jelenti, és

A(1-21) jelentése humán inzulin A-lánca,

és az A- és/vagy a B-láncok aminosavak kicserélésével, deléciójával és/vagy addíciójával módosíthatók, és ahol Y_n előnyösen humán vagy majom eredetű inzulin C-peptidjének 5-35 aminosavát jelenti, előnyösebben, ahol Y_n humán inzulin 11-35 aminosavát jelenti.

A találmány egy további tárgyát képezik az előzőekben ismerttetett előanyagok, ahol a humán inzulin B-láncában Lys(B3)Glu(B29) módosítások találhatóak, vagy ahol a humán inzulin B- és A-lánca His(B31)His(B32)Gly(A21) módosításokat tartalmaz.

A találmány tárgyát képezi továbbá az előzőekben ismerttetett előanyagot kódoló DNS.

A találmány tárgyát képezi továbbá az előzőekben ismertetett előanyagot kódoló DNS-t tartalmazó vektor, amely előnyösen *E. coli*-ban történő expresszióra alkalmas expressziós vektor.

A találmány egy további tárgyát képezi az előzőekben ismertetett vektort tartalmazó *E. coli* sejt.

A találmány tárgyát képezi továbbá az előzőekben ismertetett előanyag előállítására szolgáló eljárás, amely során

a) az előzőekben ismertetett DNS-t az előzőekben ismertetett vektorba viszünk,

b) az (a) lépés szerinti vektort *E. coli* sejtbe juttatjuk,

c) az (a) lépés szerinti vektort tartalmazó, (b) lépés szerinti *E. coli* sejtet expresszióra alkalmazzuk, és

d) az előanyagot a tápközegből izoláljuk.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás az előzőekben ismertetett DNS előállítására, amely során

a) humán vagy majom eredetű inzulin cDNS-éből kiindulva PCR vagy más, molekuláris biológiai technológiák segítségével előállítjuk ezt a DNS-t, és

b) izoláljuk.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás humán inzulin vagy inzulinanalóg előállítására, amely során

a) az előzőekben ismertetett előanyagot az előzőekben ismertetett eljárás segítségével előállítjuk,

b) az (a) lépés szerinti előanyag feltekeredését megfelelő körülmények között oly módon érjük el, hogy a di-

szulfidhidak a humán inzulinhoz hasonló módon ki tudjanak épülni, és az RDVP-Y_n-részt és adott esetben a Fus-sal jelelt fúziós részt enzimesen eltávolítjuk, és

c) a humán inzulint vagy inzulinanalógot tisztítjuk.

A találmány tárgyát képezi továbbá az előzőekben ismertetett előanyag alkalmazása inzulin vagy inzulinanalóg előállítására, előnyösen az inzulin vagy inzulinanalóg előállítása az előzőekben ismertetett eljárás szerint történik.

A találmány tárgyát képezi továbbá az előzőekben ismertetett DNS alkalmazása az előzőekben ismertetett előanyag előállítására.

A találmány tárgyát képezi továbbá az előzőekben ismertetett vektor alkalmazása az előzőekben ismertetett előanyag előállítására.

A találmány tárgyát képezi továbbá az előzőekben ismertetett *E. coli* sejt alkalmazása az előzőekben ismertetett előanyag előállítására.

A találmányt az alábbi példákkal szemléltetjük, anélkül, hogy korlátoznák a találmány oltalmi körét.

1. példa

Proinzulin-származékok expressziója

Az expressziót az EP-B1 0 489 780 számú európai közétételi iratban leírtak szerint végezzük. Nagy térfogatban történő fermentáció esetén módosítások hajthatók végre. Az expressziós arányok összehasonlításánál azonban mindig ugyanazokat a körülményeket tartottuk be.

Nagyobb léptékű munkáknál a következő, általános fermentációs receptet alkalmaztuk, amelyet példaképpen 7,5 literes térfogatra ismertetünk:

Fermentációs térfogat: 7,5 l

Sterilizációs körülmények: 121°C, 20 perc, pH 3,5, sterilizálás után ammóniával pH 7,0-re állítjuk.

Fermentációs hőmérséklet: 37°C

pH-szabályozás: pH 7,0, 25%-os ammóniaoldattal beállítva

Kevertetési fordulatszám: 1500 RPM

Levegőztetés: 15 Nl/min (2 vvm)

Időtartam: kb. 24 óra

Rátáplálás: 65%-os glükózt adagolunk 200 mmol l⁻¹ h⁻¹ OTR-értéktől állandó, 12 gl⁻¹ h⁻¹ arányban.

Előtenyészet: inokulumampullával rázatott tenyészetet oltunk és 3-4 órán keresztül 37°C-on, 250 RPM kevertetéssel inkubáljuk OD A₅₄₀ ~ 1 értékig.

Oltás: A fermentort körülbelül 40 ml előtenyészettel oltjuk.

Indukció: A₅₄₀ ≥ 40 értéknél 40 mg/l (300 mg/fermentor) indol-propionsavat oldunk körülbelül 10 ml vizes nátrium-karbonát oldatban (0,17 g nátrium-karbonáttal).

Nl = normál liter, vvm = térfogat/térfogat/perc és
OTR = oxigén átadási sebesség

Fermentációs tápközegek:

<u>Recept száma GAI 100/95-000:</u>	<u>Tömeg g/l</u>
glükóz-1-hidrát, D(+) min.80%	44
citromsav-1-hidrát	3,48
ammónium-szulfát, min. 95%	6,0
foszforsav, orto, 85%	2,99
dikálium-hidrogénfoszfát	1,18
nátrium-szulfát	3,0
magnézium-szulfát-7-hidrát, min 98%	2,0
vas(III)-szulfát x H ₂ O	0,5
nyomelemoldat: RL 1/85-000	1,0 ml
tiamin-HCl	0,005
Desmophen 3600	0,5

Nyomelemoldat

<u>RL 1/85-000</u>	<u>Tömeg g/l</u>
réz(II)-szulfát-5-hidrát	1,6
kálium-jodid	4,0
ammónium-molibdát-4-hidrát	8,0
mangán(II)-szulfát-1-hidrát	12,3
cink-szulfát-7-hidrát	16
bórsav	20

Tápközeg a rázatott lombikban

	<u>Tömeg g/l</u>
élesztőkivonat	8,0
glükóz	1,0
nátrium-klorid	3,5
kálium-dihidrogénfoszfát	1,32
dikálium-hidrogénfoszfát	3,68

2. példaInzulin előállítás

Az inzulin előállítása ismert eljárások szerint történik, mint például amelyeket az EP-B1 0 489 780 vagy az EP-A 0 885 961 számú európai közzétételi iratokban ismertetnek vagy tárgyalnak. A fúziós fehérje feltekeredése és feldolgozása („processzáció”) előnyösen az EP-B1 0 668 282 számú európai közzétételi iratban ismertetett eljárás (ld. 2. példa) szerint történik. Az EP 0 288 809 számú európai közzétételi irat szerinti feltekeredés után az üledék a további feldolgozás előtt kiszűrhető.

3. példaA származékolt C-láncú, humán proinzulin B-RDVP C₁₁-³⁵-A vegyületet kódoló pINT358d-plazmid készítése

A plazmid előállításához az EP-B1 0 489 780 számú európai közzétételi iratban ismertetett Tir- és Insul-láncindítókat alkalmaztuk. Ezenkívül két új láncindító-szekvenciát is szintetizáltunk.

A PINT358fIII-láncindító szekvenciája a következő:

5'-CCC AAG ACC CGC **GAT GTT CCT** CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT -3' (3. a.sz.)

B28 B29 B30 Arg Asp Val Pro C11 C12 C12 C14 C15 C16 C17 C18 (4. a.sz.)

A PINT358revII-láncindító szekvenciája a következő:

5'-CAGCTCCACCTGAGGAACATCGCGGTCTTGGGTGTGTAG-3' (5. a.sz.)

Mintaként a pINT90d-plazmid DNS-ével és a Tir/PINT358revII- és Insu11/PINT358fIII-láncindítópárokkal az EP-B1 0 489 780 számú európai közzétételi iratnak megfelelően PCR-reakciót végzünk. Mindkét reakció termékeinek egy kis részét egyesítjük, és a Tir/Insu11-láncindítópárral egy harmadik PCR-t végezzük. Ennek a reakciónak a termékét SalI/NcoI-enzimekkel emésztjük, és ennek a restrikciós emésztésnek a termékét tisztítás után az EP-B1 0 489 780 számú európai közzétételi iratban ismertetett pINT91d-plazmid NcoI/SalI-gyel felnyitott vektor-DNS-ébe építjük. Az így készített plazmidot pINT358d-nek neveztük. A szerkezetét DNS-szekvenciavizsgálattal igazoljuk. Kompetens *E. coli* sejteket transzformálunk a plazmid-DNS-sel. A proinzulin baktériumban történő expressziója az 1. példában ismertetettek szerint történik. A 2. példa szerinti feltételek után következik a proinzulin enzimes átalakítása inzulinná, majd további tisztítás az EP-B1 0 347 781 számú európai közzétételi irat szerint. A pINT90d-ből levezetett eljárással összehasonlítva az ioncserélő kromatográfiás lépésben egy szélső frakció is nyerhető, mivel ez nem szennyezett Arg(B31)-inzulinnal.

4. példa

A pINT362d-plazmid elkészítése Lys(B3)Glu(B29)-RDVP-C₁₁₋₃₅-proinzulin előállításához

A plazmid elkészítéséhez a pINT329d- és pINT358d-plazmidok DNS-ét használjuk mintaként, és a Tir- és az Insu11-láncindítókat alkalmazzuk. Ezenkívül két új láncin-

dítót, a Salforward- és a 329rev-láncindítókat is megszin-
tetizáltuk.

A Salforward-láncindító szekvenciája a következő:

5'-TACACACCCGAGACCC**CGCGATGTTCTCAGG**-3' (6. azonosítószámú
szekvencia)

A vastagon szedett szekvenciarészletek azt a szekven-
ciát jelzik, amely a pINT358d-plazmiddal hibridizál, míg a
többi rész a pINT329d-plazmid B-láncot kódoló részletének
szekvenciájával homológ.

A 329rev-láncindító szekvenciája a következő:

5'-CCTGAGGAACATC**CGGGTCTCGGGTGTGTAG**-3' (7. azonosítószámú
szekvencia)

A vastagon szedett részletek a B-lánc végét alkotó és
a pINT329d-plazmidban lévő arginin tripletjét leíró
antiszensz szállal homológ szakaszt jelölik. A többi szek-
vencia a pINT358d-plazmiddal hibridizál. Két hosszabbítást
végezünk PCR-rel. Ehhez a pINT329d-plazmid DNS-e szolgál
mintaként a Tir/329rev-láncindítópárokkal, és a pINT358d
DNS-e szolgál mintaként a Salforward/Insu11-láncindítópár
számára.

Mindkét reakció olyan fragmenseket eredményez, ame-
lyek a Salforward-láncindító szekvenciájával átfednek. Ily
módon a két fragmens egy harmadik PCR-lépéssel egyesíthető,
és Tir- és Insu11-láncindítókkal egyetlen, az inzulin-

analógot kódoló DNS-szekvenciává illeszthetők. Ezt a reakcióterméket *NcoI/SalI* restrikciós enzimekkel hasítjuk, majd végül a pINT91d-ből származó, *SalI/NcoI*-gyel felnyitott vektorfragmensbe építjük. *E. coli* K12 MM294 törzsének kompetens sejtjeit a megfelelő ligációskeverékkel transzformáljuk. A transzformánsokból plazmid-DNS-t izolálunk és jellemzünk. A megfelelő plazmid a pINT362d jelölést kapta.

Az expresszió után a fúziós fehérjére a pINT90d-hez hasonló nyers hozamot tapasztaltunk. A megfigyelt feltekeredési hozam a pINT329d-hez képest azonban körülbelül 40%-kal magasabb.

A pINT362d által kódolt fúziós fehérje szerkezete a következő:

MATTSTGNSAR FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPET RDVPQVELGGGPG

Fúziós rész B-lánc C-lánc

AGSLQPLALEGSLQKR GIVEQCCTSIQSLYQLENYCN (8. a.sz.)

C-lánc (folyt.) A-lánc

5. példa

A pINT349d-plazmid készítése His(B31)-His(B32)Gly(A21)-RDVP-C₁₁₋₃₅-proinzulin előállításához

Először is a pINT140d-plazmidot állítjuk elő, amelynek DNS-e a Gly(A21)-inzulin inzulinanalógot kódolja.

Ehhez a PCR-hez történő alkalmazáshoz láncindítóként két oligonukleotid szükséges.

A Tir-oligonukleotidot szensz, a 140drev-oligonukleotidot antiszensz láncindítóként alkalmazzuk.

140drev 5'-AAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTA-3' (9. a.sz.)

Stop Stop Gly Cys Tyr

A21 A21 A19

Mindkét láncindítót hagyományos PCR-ben alkalmazzuk pINT90d-plazmid DNS-ével. A reakcióterméket az EP-B1 0 489 780 számú európai közzétételi irat szerint *NcoI* és *SalI* restriktációs enzimekkel emésztjük, és végül a megfelelően felnyitott pINT69d-vektorba építjük. Így kapjuk a pINT140d-plazmidot, amelyet *E. coli* K12 MM294 törzsébe történő transzformáció után visszaizolálunk, és restriktációs és szekvenciavizsgálattal jellemzünk.

A pINT140d-plazmid DNS-éből kiindulva két PCR-reakciót végzünk. Az első reakcióhoz a Tir-láncindítót alkalmazzuk és fordított láncindítóként a következő szekvenciájú PINT349a-t:

Val Gln Pro Val Asp Arg His His Thr Lys Pro Thr Tyr (10. a.sz.)

5'-CACCTGAGGAACATCGCGGTGGTGGGTCTTGGGTGTGTAG-3' (11. a.sz.)

C12 C11* * * * B30 B29 B28 B27 B26

A csillaggal jelölt szekvenciák az újonnan bevitt aminosavak kodonjait mutatják.

A második PCR-reakciót az Insu11- és PINT349b-láncindítókkal hajtjuk végre.

A PINT349b-láncindító szekvenciája a következő:

Pro Lys Thr His His Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu (12. a.sz.)

5'-ACCCAAGACCCACCCACCGCGATGTTCCCTCAGGTGGAGCTG-3' (13. a.sz.)

B28 B29 B30* * * * C11 C12 C13 C14

A DNS-szekvencia 34. helyzetétől az 1. helyzetéig a láncindító komplementer a PINT349a-val. A két PCR-reakció termékei egy harmadik PCR-reakcióban a Tir- és az Insu11-láncindítókkal a kívánt proinzulin-származékot kódoló DNS-fragmenssé állíthatók össze. Ennek a reakciónak a termékét az előzőekben ismerttetettek szerint NcoI- és SalI-enzimekkel emésztjük, és az ezekkel az enzimekkel felnyitott pINT91d-vektorfragmensbe építjük, és *E. coli* K12 törzsébe transzformáljuk. A transzformánsokból a plazmidok jellemzése után kapott, megfelelő plazmidkonstrukciókat pINT349d-nek jelöltük.

A fúziós fehérje vizsgálatával a fúziós fehérje hozamának nyilvánvaló emelkedését tapasztaljuk. A hozam meglepő módon körülbelül 20%-kal magasabb, mint amely pINT90d-plazmiddal elérhető, és körülbelül ötször magasabb, mint a pINT30d-plazmiddal kapható hozam. A feltekeredési arány a pINT90d által kódolt, majom eredetű proinzulinnál elérhető aránnyal összehasonlítható.

SZEKVENCIALISTA

(210) 1

(211) 87

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: C-peptid-
variánst kódoló DNS

(400) 1

cgcgatgttc ctcaggtgga gctgggcggg ggccttggcg caggcagcct gcagcccttg 60

gcgctggagg ggtccctgca gaagcgc 87

(210) 2

(211) 29

(212) PRT

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: C-Pep-inzulin
variáns

(400) 2

Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser

1 5 10 15

Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg

20 25

(210) 3
(211) 45
(212) DNS
(213) *mesterséges szekvencia*

(220)
(223) A mesterséges szekvencia leírása: PINT 358fIII
láncindító

(400) 3
cccaagaccc gcgatgttcc tcaggtggag ctgggcgggg gcct 45

(210) 4
(211) 4
(212) PRT
(213) *mesterséges szekvencia*

(220)
(223) A mesterséges szekvencia leírása: PINT 358fIII-
ből származó fehérjerész szekvenciája

(400) 4
Arg Asp Val Pro
1

(210) 5
(211) 40
(212) DNS
(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: PINT 358revII
láncindító

(400) 5

cagctccacc tgaggaacat cgcggtctt ggggtgtgtag 40

(210) 6

(211) 31

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: Sal „előre”
láncindító

(400) 6

tacacacccg agacccgcga tgttcctcag g

(210) 7

(211) 32

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: 329rev lánc-
indító

(400) 7

cctgaggaac atcgcggtc tcgggtgtgt ag 32

(210) 8
 (211) 91
 (212) PRT
 (213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: inzulin-
 prekurzor-variáns

(400) 8

Met	Ala	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala	Arg	Phe	Val	Lys	Gln	His
1				5					10					15	
Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Cys	Gly	Glu
				20					25					30	
Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Glu	Thr	Arg	Asp	Val	Pro	Gln	Val	Glu
				35					40					45	
Leu	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Leu	Glu
				50					55					60	
Gly	Ser	Leu	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile
				65					70					75	
Cys	Ser	Leu	Thr	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn					
				85					90						

(210) 9
 (211) 24
 (212) DNS
 (213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: 140drev láncindító

(400) 9

aaaggtcgac tattagccgc agta

24

(210) 10

(211) 13

(212) PRT

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: PINT 349a-ból származó fehérjerész szekvenciája

(400) 10

Val Gln Pro Val Asp Arg His His Thr Lys Pro Thr Tyr

1

5

10

(210) 11

(211) 40

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: 349a láncindító

(400) 11

cacctgagga acatcgcggt ggtgggtctt ggggtgtgtag

40

(210) 12

(211) 13

(212) PRT

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: PINT 349b-ből
származó fehérjerész szekvenciája

(400) 12

Pro Lys Thr His His Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu

1

5

10

(210) 13

(211) 40

(212) DNS

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: PINT 349b lánc-
indító

(400) 13

acccaagacc caccaccgcg atgttcctca ggtggagctg

40

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Humán inzulin vagy inzulinanalógok előanyaga, amely (I) általános képletű

$$\text{Fus-B(1-30)-RDVP-Y}_n\text{-A(1-21)} \quad (\text{I})$$

ahol a képletben

Fus adott esetben van jelen és jelentése egy tetszés szerinti szekvencia fúziós része,

B(1-30) jelentése humán inzulin B-lánca

Y jelentése a C-terminálison bázisos aminosavval végződő aminosavlánc,

n 2 és 50 között változhat, és az Y-aminosavlánc hosszát jelenti, és

A(1-21) jelentése humán inzulin A-lánca,

és az A- és/vagy a B-láncok aminosavak kicserélésével, deléciójával és/vagy addíciójával módosíthatók.

2. Az 1. igénypont szerinti előanyag, ahol a képletben Y_n humán vagy majom eredetű inzulin C-peptidjének 5-35 aminosavát jelenti.

3. Az 1. igénypont szerinti előanyag, ahol a képletben Y_n humán inzulin 11-35 aminosavát jelenti.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti előanyag, amelyben a humán inzulin B-lánca Lys(B3)Glu(B29) módosításokat tartalmaz.

5. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti előanyag, amelyben a humán inzulin B- és A-lánca His(B31)His(B32)Gly(A21) módosításokat tartalmaz.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti előanyagot kódoló DNS.

7. A 6. igénypont szerinti DNS-t tartalmazó vektor.

8. A 7. igénypont szerinti vektor, amely *E. coli*-ban történő expresszióra alkalmas expressziós vektor.

9. A 8. igénypont szerinti vektort tartalmazó *E. coli* sejt.

10. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti előanyag előállítására szolgáló eljárás, azzal jellemezve, hogy

a) a 6. igénypont szerinti DNS-t a 7. igénypont szerinti vektorba visszük be,

b) az (a) lépés szerinti vektort *E. coli* sejtbe juttatjuk,

c) az (a) lépés szerinti vektort tartalmazó, (b) lépés szerinti *E. coli* sejtet expresszióra alkalmazzuk, és

d) az előanyagot a tenyészet tápközegéből izoláljuk.

11. A 6. igénypont szerinti DNS előállítására szolgáló eljárás, azzal jellemezve, hogy

a) humán vagy majom eredetű inzulin cDNS-éből kiindulva PCR vagy más, molekuláris biológiai technológia segítségével létrehozuk a 6. igénypont szerinti DNS-t, és

b) izoláljuk.

12. Humán inzulin vagy inzulinanalóg előállítására szolgáló eljárás, azzal jellemezve, hogy

a) a 10. igénypont szerinti eljárással előállítunk egy előanyagot,

b) az (a) lépés szerinti előanyag feltekeredését alkalmas körülmények között úgy érjük el, hogy a diszulfidhidak a humán inzulinhoz hasonlóan ki tudnak alakulni, és az RDVP-Y_n-részt és adott esetben a Fus-sal jelölt fúziós részt enzimesen eltávolítjuk, és

c) a humán inzulint vagy inzulinanalógot tisztítjuk.

13. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti előanyag alkalmazása inzulin vagy inzulinanalóg előállítására.

14. A 13. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az inzulin vagy inzulinanalóg előállítása a 12. igénypont szerinti eljárással történik.

15. A 6. igénypont szerinti DNS alkalmazása az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti előanyag előállítására.

16. A 8. igénypont szerinti vektor alkalmazása az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti előanyag előállítására.

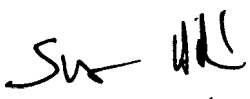
17. A 9. igénypont szerinti *E. coli* sejt alkalmazása az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti előanyag előállítására.

18. A 15., 16. vagy 17. igénypontok szerinti alkalmazás, ahol az előanyag előállítása a 10. igénypont szerinti eljárással történik.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.


Dr. Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivő

23 oldal
