



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **316944**

(13) **B1**

(51) Int Cl⁷

C 07 K 14/62

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19961070	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	1994.09.16 PCT/DK94/00347
(22)	Inng.dag	1996.03.15	(85)	Videreføringsdag	1996.03.15
(24)	Løpedag	1994.09.16	(30)	Prioritet	1993.09.17, DK, 1044/93 1994.02.02, US, 190829
(41)	Alm.tilgj	1996.05.15			
(45)	Meddelt:	2004.07.05			
(71)	Søker	Novo Nordisk A/S , Postboks 3000, 2880 BAGSVÆRD, DK			
(72)	Oppfinner	Ib Jonassen, , Valby, DK Jan Markussen, , Herlev, DK John Broberg Halstrøm, , Hundested, DK Svend Havelund, , Bagsværd, DK Asser Sloth Andersen, , Frederiksberg, DK			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS , Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Humaninsulinderivater og farmasøytiske preparater for behandling av diabetes			
(56)	Anførte publikasjoner	JP A1 254699			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse vedrører forlengede humaninsulinderivater hvor A21- og B3-aminosyrerestene uavhengig av hverandre er hvilken som helst aminosyrerest som kan kodes for av den genetiske kode, bortsett fra Lys, Arg og Cys; Phe^{B1} kan være delert; B30-aminosyreresten er a) en ikke-kodbar, lipofil aminosyre med 10-24 karbonatomer, i hvilket tilfelle en acylgruppe i en karboksylsyre med opptil 5 karbonatomer er bundet til C-aminogruppen i Lys^{B29}; eller b) B30-aminosyreresten er delert eller er hvilken som helst aminosyrerest som kan kodes for av den genetiske kode, bortsett fra Lys, Arg og Cys, hvor i begge tilfeller C-aminogruppen i Lys^{B29} har en lipofil substituent; og hvilke som helst Zn²⁺komplekser derav, med det forbehold at når B30 er Thr eller Ala og A21 og B3 begge er Asn, og Phe^{B1} er til stede, da er insulinderivatet alltid til stede som et Zn²⁺-kompleks.

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse vedrører nye humaninsulin-
5 derivater som er oppløselige og har en langvarig virknings-
profil, og farmasøytiske preparater som inneholder dem.

Oppfinnelsens bakgrunn

10

Mange diabetespasienter behandles med flere daglige
insulininjeksjoner ved en behandlingsplan som omfatter én
eller to daglige injeksjoner av et insulin med langvarig virk-
ning, for å dekke grunnbehovet, supplert med bolusinjeksjoner
15 av et hurtigvirkende insulin for å dekke behovet relatert til
måltider.

Insulinpreparater med langvarig virkning er velkjente
innen teknikken. Én hovedtype av insulinpreparater med lang-
varig virkning omfatter således injiserbare, vandige suspen-
sjoner av insulinkrystaller eller amorft insulin. I disse pre-
20 paratene er insulinforbindelsene som benyttes, vanligvis
protamininsulin, sinkinsulin eller protaminsinkinsulin.

Visse ulemper er forbundet med bruken insulinsuspen-
sjoner. For å sikre en nøyaktig dosering må insulinpartiklene
25 således oppslemmes homogent ved forsiktig risting før et bes-
temt volum av suspensjonen tas ut fra en ampulle eller drives
ut av en patron. For lagringen av insulinsuspensjoner må dess-
uten temperaturen holdes innenfor snevrere grenser enn for
insulinoppløsninger, for å unngå klumpdannelse eller koagula-
30 sjon.

Mens det tidligere ble antatt at protaminer var ikke-
immunogene, har det nå vist seg at protaminer kan være immuno-
gene hos mennesker og at deres anvendelse for medisinske for-
mål kan føre til dannelse av antistoffer (Samuel et al.,
35 Studies on the immunogenicity of protamines in humans and ex-
perimental animals by means of a micro-complement fixation
test, Clin. Exp. Immunol. 33, s. 252-260 (1978)).

Det er også funnet bevismateriale for at protamin-

insulinkomplekset i seg selv er immunogent (Kurtz et al., Circulating IgG antibody to protamine in patients treated with protamine-insulins. Diabetologica 25, s. 322-324 (1983)). Hos noen pasienter må derfor bruken av insulinpreparater med lang-

5 varig virkning som inneholder protaminer, unngås.

En annen type av insulinpreparater med langvarig virkning er oppløsninger med en pH-verdi under fysiologisk pH, hvorfra insulinet vil utfelles på grunn av økningen i pH-ver-

10 dingene er at partikkelstørrelsesfordelingen i utfellingen som dannes i vevet etter injeksjon, og således tidsfastsettelsen for medisineringen, avhenger av blodstrømmen i injeksjons-

stedet og andre parametere på en noe uforutsigbar måte. En ytterligere ulempe er at de faste partiklene av insulinet kan

15 virke som lokalt irritasjonsmiddel som forårsaker betennelse i vevet på injeksjonsstedet.

I WO 91/12817 (Novo Nordisk A/S) beskrives oppløselige insulinpreparater med langvarig virkning som omfatter insulinkomplekser av kobolt(III). Den langvarige virkning av

20 disse kompleksene er bare forbigående, og den biologiske tilgjengelighet er redusert.

Humaninsulin har tre primære aminogrupper: den N-terminale gruppe i A-kjeden og B-kjeden, og ϵ -aminogruppen i Lys^{B29}. Flere insulinderivater som er substituert i én eller

25 flere av disse gruppene, er kjent fra teknikkens stand. Således vedrører US patentskrift nr. 3 528 960 (Eli Lilly) N-karboksyaroylinsuliner hvor 1, 2 eller 3 primære aminogrupper i insulinmolekylet har en karboksyaroylgruppe. Det er ikke beskrevet noen spesifikt N ^{ϵ B29}-substituerte insuliner.

30 Ifølge GB patentskrift nr. 1 492 997 (Nat. Res. Dev. Corp.) er det også funnet at insulin med en karbamylsubstitusjon i N ^{ϵ B29} har en forbedret hypoglykemisk effektprofil.

Den japanske offentliggjorte patentsøknad nr. 1-254699 (Kodama Co., Ltd.) beskriver insulin hvor en fettsyre

35 er bundet til aminogruppen i Phe^{B1} eller til ϵ -aminogruppen i Lys^{B29}, eller til begge disse. Det angitte formål for derivatiseringen er å oppnå et farmakologisk akseptabelt, stabilt insulinpreparat.

Insuliner som har en aminosyre med minst 5 karbon atomer i B30-stillingen, som ikke nødvendigvis kan kodes for av en triplett av nukleotider, er beskrevet i japansk offentliggjorte patentsøknad nr. 57-067548 (Shionogi). Insulinanalogene kreves å være anvendbare ved behandlingen av diabetes mellitus, særlig hos pasienter som er insulinresistente på grunn av dannelsen av bovin- eller svineinsulinantistoffer.

Med "insulinderivat" slik det her er brukt, er det ment en forbindelse med en molekylstruktur som er lik molekylstrukturen til humaninsulin, inkludert disulfidbroene mellom Cys^{A7} og Cys^{B7}, og mellom Cys^{A20} og Cys^{B19}, og en intern disulfidbro mellom Cys^{A6} og Cys^{A11}, og som har insulinaktivitet.

Det er imidlertid fortsatt et behov for injiserbare insulinpreparater med langvarig virkning som er oppløsninger og som inneholder insuliner som forblir i oppløsning etter injeksjon og har minimale inflammatoriske og immunogene egenskaper.

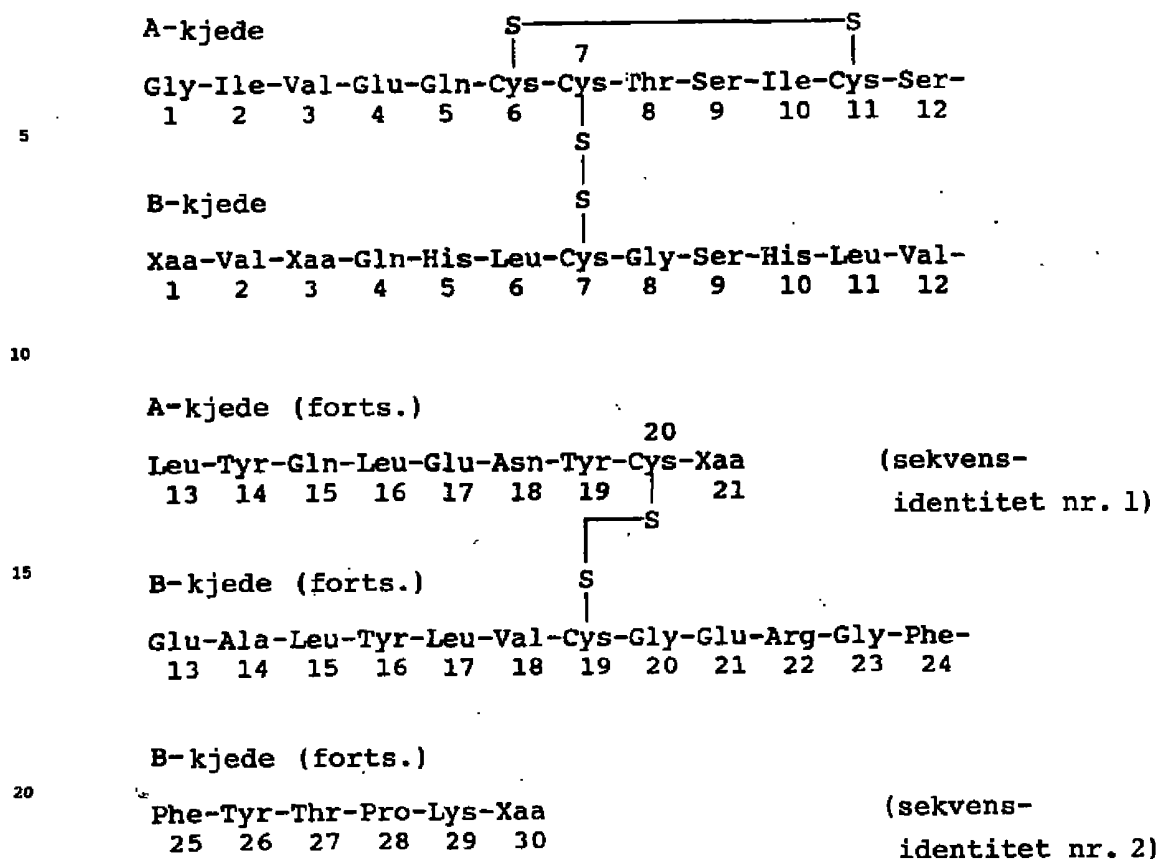
Ett formål med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe humaninsulinderivater med en langvarig virkningsprofil, som er oppløselige ved fysiologiske pH-verdier.

Et annet formål ved foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe et farmasøytisk preparat som omfatter humaninsulinderivatene ifølge oppfinnelsen:

Oppsummering av oppfinnelsen

Overraskende har det vist seg at visse humaninsulinderivater hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en lipofil substituent, har en langvarig virkningsprofil og er oppløselig ved fysiologiske pH-verdier.

I sitt bredeste aspekt vedrører følgelig foreliggende oppfinnelse et humaninsulinderivat med den følgende sekvens:



hvor

25 Xaa i stillingene A21 og B3 uavhengig av hverandre er
 hvilken som helst aminosyrerest som kan kodes for av
 den genetiske kode, bortsett fra Lys, Arg og Cys,
 Xaa i stilling B1 er Phe eller er utelatt,
 Xaa i stilling B30 er (a) en ikke-kodbar, lipofil
 30 aminosyre med 10-24 karbonatomer, hvor en acylgruppe
 i en karboksylsyre med opptil 5 karbonatomer er bun-
 det til ϵ -aminogruppen i Lys^{B29}, (b) hvilken som helst
 aminosyrerest som kan kodes for av den genetiske
 kode, bortsett fra Lys, Arg og Cys, idet ϵ -aminogrup-
 35 pen i Lys^{B29} har en lipofil substituent, eller (c)
 utelatt, idet ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en lipofil
 substituent, og
 hvilke som helst Zn²⁺-komplekser derav, forutsatt at
 når Xaa i stilling B30 er Thr eller Ala, Xaa i stil-

lingene A21 og B3 begge er Asn, og Xaa i stilling B1 er Phe, er insulinderivatet et Zn^{2+} -kompleks.

Ved én foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnel-
 5 sen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyreresten er delert
 eller er hvilken som helst aminosyrerest som kan kodes for av
 den genetiske kode, bortsett fra Lys, Arg og Cys, A21- og B3-
 aminosyrerestene er uavhengig av hverandre hvilke som helst
 aminosyrerester som kan kodes for av den genetiske kode, bort-
 10 sett fra Lys, Arg og Cys, Phe^{B1} kan være delert, ϵ -aminogruppen
 i Lys^{B29} har en lipofil substituent som omfatter minst 6 kar-
 bonatomer, og 2-4 Zn^{2+} -ioner kan være bundet til hver insulin-
 heksamer, med det forbehold at når B30 er Thr eller Ala, og
 A21 og B3 begge er Asn, og Phe^{B1} ikke er delert, er 2-4 Zn^{2+} -
 15 ioner bundet til hver heksamer i insulinderivatet.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
 finnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyreresten er
 delert eller er hvilken som helst aminosyrerest som kan kodes
 for av den genetiske kode, bortsett fra Lys, Arg og Cys, A21-
 20 og B3-aminosyrerestene er uavhengig av hverandre hvilke som
 helst aminosyrerester som kan kodes for av den genetiske kode,
 bortsett fra Lys, Arg og Cys, med det forbehold at dersom B30-
 aminosyreresten er Ala eller Thr, er minst én av restene A21
 og B3 forskjellige fra Asn, Phe^{B1} kan være delert, og ϵ -amino-
 25 gruppen i Lys^{B29} har en lipofil substituent som omfatter minst
 6 karbonatomer.

Ved en annen, foretrukket utførelsesform vedrører
 oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyreresten
 er delert eller er hvilken som helst aminosyrerest som kan
 30 kodes for av den genetiske kode, bortsett fra Lys, Arg og Cys,
 A21- og B3-aminosyrerestene er uavhengig av hverandre hvilke
 som helst aminosyrerester som kan kodes for av den genetiske
 kode, bortsett fra Lys, Arg og Cys, Phe^{B1} kan være delert, ϵ -
 aminogruppen i Lys^{B29} har en lipofil substituent som omfatter
 35 minst 6 karbonatomer, og 2-4 Zn^{2+} -ioner er bundet til hver in-
 sulinheksamer.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
 finnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyreresten er
 delert.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyreresten er Asp.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyreresten er Glu.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyreresten er Thr.

10 Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyreresten er en lipofil aminosyre med minst 10 karbonatomer.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyren er en 15 lipofil α -aminosyre med 10-24 karbonatomer.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyren er en rettkjedet, mettet, alifatisk α -aminosyre med 10-24 karbonatomer.

20 Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyren er D- eller L-N^e-dodekanoyllysin.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyren er α - 25 aminodekansyre.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyren er α -aminoundekansyre.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyren er α - 30 aminododekansyre.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyren er α -aminotridekansyre.

35 Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyren er α -aminotetradekansyre.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyren er α -

aminopentadekansyre.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
s finnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyren er α -
aminoheksadekansyre.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
finnelsen et humaninsulinderivat hvor B30-aminosyren er en α -
aminosyre.

10 Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
finnelsen et humaninsulinderivat hvor A21-aminosyreresten er
Ala.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
finnelsen et humaninsulinderivat hvor A21-aminosyreresten er
15 Gln.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
finnelsen et humaninsulinderivat hvor A21-aminosyreresten er
Gly.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
20 finnelsen et humaninsulinderivat hvor A21-aminosyreresten er
Ser.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
finnelsen et humaninsulinderivat hvor B3-aminosyreresten er
Asp.

25 Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
finnelsen et humaninsulinderivat hvor B3-aminosyreresten er
Gln.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
finnelsen et humaninsulinderivat hvor B3-aminosyreresten er
30 Thr.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
finnelsen et humaninsulinderivat hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29}
har en lipofil substituent som er en acylgruppe som tilsvarer
en karboksylsyre med minst 6 karbonatomer.

35 Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
finnelsen et humaninsulinderivat hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29}

har en lipofil substituent som er en acylgruppe, forgrenet eller uforgrenet, som tilsvarer en karboksylsyre med en kjede av karbonatomer som er 8-24 atomer lang.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en lipofil substituent som er en acylgruppe som tilsvarer en fettsyre med minst 6 karbonatomer.

10 Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en lipofil substituent som er en acylgruppe som tilsvarer en rettkjedet, mettet karboksylsyre med 6-24 karbonatomer.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
15 finnelsen et humaninsulinderivat hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en lipofil substituent som er en acylgruppe som tilsvarer en lineær, mettet karboksylsyre med 8-12 karbonatomer.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
20 finnelsen et humaninsulinderivat hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en lipofil substituent som er en acylgruppe som tilsvarer en lineær, mettet karboksylsyre med 10-16 karbonatomer.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
finnelsen et humaninsulinderivat hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en lipofil substituent som er en oligooksyetylengruppe som
25 omfatter opptil 10, fortrinnsvis opptil 5, oksyetylenenheter.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
finnelsen et humaninsulinderivat hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en lipofil substituent som er en oligooksypropylengruppe som omfatter opptil 10, fortrinnsvis opptil 5, oksypropylenen-
30 heter.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor hver insulinheksamer binder 2 Zn²⁺-ioner.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører opp-
35 finnelsen et humaninsulinderivat hvor hver insulinheksamer binder 3 Zn²⁺-ioner.

Ved en annen foretrukket utførelsesform vedrører oppfinnelsen et humaninsulinderivat hvor hver insulinheksamer
5 binder 4 Zn^{2+} -ioner.

Ved et annet aspekt vedrører oppfinnelsen et farmasøytisk preparat for behandling av diabetes hos en pasient som trenger slik behandling, omfattende en terapeutisk
10 effektiv mengde av et humaninsulinderivat ifølge oppfinnelsen sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

Ved et annet aspekt vedrører oppfinnelsen et farmasøytisk preparat for behandling av diabetes hos en pasient som
15 trenger slik behandling, omfattende en terapeutisk effektiv mengde av et humaninsulinderivat ifølge oppfinnelsen i blanding med et insulin eller en insulinanalog som har en hurtig virkningsstart, sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

20

Anvendelsen av humaninsulinderivatene skjer ved en fremgangsmåte for behandling av diabetes hos en pasient som trenger en slik behandling, som omfatter administrering til pasienten av en terapeutisk effektiv mengde av et insulin-
25 derivat ifølge denne oppfinnelsen sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

Anvendelsen av humaninsulinderivatene skjer også ved en fremgangsmåte for behandling av diabetes hos en pasient som
30 trenger en slik behandling, som omfatter administrering til pasienten av en terapeutisk effektiv mengde av et insulin-derivat ifølge denne oppfinnelsen i blanding med et insulin eller en insulinanalog som har en hurtig virkningsstart, sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

35

Eksempler på foretrukne humaninsulinderivater ifølge

foreliggende oppfinnelse hvor ingen Zn^{2+} -ioner er bundet, er de følgende:

- N^{B29} -tridekanoyl-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -tetradekanoyl-des(B30)-humaninsulin,
- 5 N^{B29} -dekanoyl-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -dodekanoyl-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -tridekanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -tetradekanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -dekanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-humaninsulin,
- 10 N^{B29} -dodekanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -tridekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -tetradekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -dekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -dodekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- 15 N^{B29} -tridekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -tetradekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -dekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -dodekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -tridekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- 20 N^{B29} -tetradekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -dekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -dodekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -tridekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -tetradekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- 25 N^{B29} -dekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -dodekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin,
- N^{B29} -tridekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin,
- N^{B29} -tetradekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin,
- N^{B29} -dekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin,
- 30 N^{B29} -dodekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin,
- N^{B29} -tridekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin,
- N^{B29} -tetradekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin,
- N^{B29} -dekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin,
- N^{B29} -dodekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin,
- 35 N^{B29} -tridekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin,
- N^{B29} -tetradekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin,
- N^{B29} -dekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin,
- N^{B29} -dodekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin,
- N^{B29} -tridekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin,

- N^{B29} -tetradekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin,
 N^{B29} -dekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin,
 N^{B29} -dodekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin,
 N^{B29} -tridekanoyl-Gln^{B3}-humaninsulin,
5 N^{B29} -tetradekanoyl-Gln^{B3}-humaninsulin,
 N^{B29} -dekanoyl-Gln^{B3}-humaninsulin,
 N^{B29} -dodekanoyl-Gln^{B3}-humaninsulin,
 N^{B29} -tridekanoyl-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -tetradekanoyl-Glu^{B30}-humaninsulin,
10 N^{B29} -dekanoyl-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -dodekanoyl-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -tridekanoyl-Gly^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -tetradekanoyl-Gly^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -dekanoyl-Gly^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin,
15 N^{B29} -dodekanoyl-Gly^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -tridekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -tetradekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -dekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -dodekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin,
20 N^{B29} -tridekanoyl-Ala^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -tetradekanoyl-Ala^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -dekanoyl-Ala^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -dodekanoyl-Ala^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -tridekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin,
25 N^{B29} -tetradekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -dekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -dodekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -tridekanoyl-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin,
 N^{B29} -tetradekanoyl-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin,
30 N^{B29} -dekanoyl-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin og
 N^{B29} -dodekanoyl-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin.

Eksempler på foretrukne humaninsulinderivater ifølge foreliggende oppfinnelse hvor to Zn^{2+} -ioner er bundet pr. insulinhexamer, er de følgende:

- 35 (N^{B29} -tridekanoyl-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn^{2+} ,
(N^{B29} -tetradekanoyl-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn^{2+} ,
(N^{B29} -dekanoyl-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn^{2+} ,
(N^{B29} -dodekanoyl-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn^{2+} ,
(N^{B29} -tridekanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn^{2+} ,

- (N^{εB29}-tetradekanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dekanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dodekanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tridekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
5 (N^{εB29}-tetradekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dodekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tridekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tetradekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
10 (N^{εB29}-dekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dodekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tridekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tetradekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
15 (N^{εB29}-dodekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tridekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tetradekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dodekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
20 (N^{εB29}-tridekanoyl-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tetradekanoyl-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dekanoyl-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dodekanoyl-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tridekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
25 (N^{εB29}-tetradekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dodekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tridekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tetradekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
30 (N^{εB29}-dekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dodekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tridekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tetradekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
35 (N^{εB29}-dodekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tridekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-tetradekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,
(N^{εB29}-dodekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 2 Zn²⁺,

- $(N^{B29}\text{-tridekanoyl-Gln}^{B3}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tetradekanoyl-Gln}^{B3}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dekanoyl-Gln}^{B3}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dodekanoyl-Gln}^{B3}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
5 $(N^{B29}\text{-tridekanoyl-Gln}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tetradekanoyl-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dekanoyl-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dodekanoyl-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tridekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
10 $(N^{B29}\text{-tetradekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dodekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tridekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tetradekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
15 $(N^{B29}\text{-dekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dodekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tridekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tetradekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
20 $(N^{B29}\text{-dodekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tridekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tetradekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dodekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
25 $(N^{B29}\text{-tridekanoyl-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tetradekanoyl-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dekanoyl-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} og
 $(N^{B29}\text{-dodekanoyl-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6$, 2 Zn^{2+} .

Eksempler på foretrukne humaninsulinderivater ifølge
30 foreliggende oppfinnelse hvor tre Zn^{2+} -ioner er bundet pr. insulinhexamer, er de følgende:

- $(N^{B29}\text{-tridekanoyl-des(B30)-humaninsulin})_6$, 3 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tetradekanoyl-des(B30)-humaninsulin})_6$, 3 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dekanoyl-des(B30)-humaninsulin})_6$, 3 Zn^{2+} ,
35 $(N^{B29}\text{-dodekanoyl-des(B30)-humaninsulin})_6$, 3 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tridekanoyl-Gly}^{A21}\text{-des(B30)-humaninsulin})_6$, 3 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-tetradekanoyl-Gly}^{A21}\text{-des(B30)-humaninsulin})_6$, 3 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dekanoyl-Gly}^{A21}\text{-des(B30)-humaninsulin})_6$, 3 Zn^{2+} ,
 $(N^{B29}\text{-dodekanoyl-Gly}^{A21}\text{-des(B30)-humaninsulin})_6$, 3 Zn^{2+} ,

- (N^{EB29}-tridekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tetradekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dodekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
5 (N^{EB29}-tridekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tetradekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dodekanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tridekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
10 (N^{EB29}-tetradekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dodekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tridekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tetradekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
15 (N^{EB29}-dekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dodekanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tridekanoyl-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tetradekanoyl-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dekanoyl-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
20 (N^{EB29}-dodekanoyl-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tridekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tetradekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dodekanoyl-Gly^{A21}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
25 (N^{EB29}-tridekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tetradekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dodekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tridekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
30 (N^{EB29}-tetradekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dodekanoyl-Ala^{A21}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tridekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tetradekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
35 (N^{EB29}-dekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dodekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tridekanoyl-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-tetradekanoyl-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,
(N^{EB29}-dekanoyl-Gln^{B3}-humaninsulin)₆, 3 Zn²⁺,

- $(N^{E829}\text{-dodekanoyl-Gln}^{B3}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tridekanoyl-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tetradekanoyl-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dekanoyl-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
5 $(N^{E829}\text{-dodekanoyl-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tridekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tetradekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dodekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
10 $(N^{E829}\text{-tridekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tetradekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dodekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tridekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
15 $(N^{E829}\text{-tetradekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dodekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tridekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tetradekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
20 $(N^{E829}\text{-dekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dodekanoyl-Ala}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tridekanoyl-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tetradekanoyl-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dekanoyl-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+} \text{ og}$
25 $(N^{E829}\text{-dodekanoyl-Gln}^{B3}\text{-Glu}^{B30}\text{-humaninsulin})_6, 3 \text{ Zn}^{2+}.$

Eksempler på foretrukne humaninsulinderivater ifølge foreliggende oppfinnelse hvor fire Zn^{2+} -ioner er bundet pr. insulinheksamer, er de følgende:

- $(N^{E829}\text{-tridekanoyl-des(B30)-humaninsulin})_6, 4 \text{ Zn}^{2+},$
30 $(N^{E829}\text{-tetradekanoyl-des(B30)-humaninsulin})_6, 4 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dekanoyl-des(B30)-humaninsulin})_6, 4 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dodekanoyl-des(B30)-humaninsulin})_6, 4 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tridekanoyl-Gly}^{A21}\text{-des(B30)-humaninsulin})_6, 4 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tetradekanoyl-Gly}^{A21}\text{-des(B30)-humaninsulin})_6, 4 \text{ Zn}^{2+},$
35 $(N^{E829}\text{-dekanoyl-Gly}^{A21}\text{-des(B30)-humaninsulin})_6, 4 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dodekanoyl-Gly}^{A21}\text{-des(B30)-humaninsulin})_6, 4 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tridekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-des(B30)-humaninsulin})_6, 4 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-tetradekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-des(B30)-humaninsulin})_6, 4 \text{ Zn}^{2+},$
 $(N^{E829}\text{-dekanoyl-Gly}^{A21}\text{-Gln}^{B3}\text{-des(B30)-humaninsulin})_6, 4 \text{ Zn}^{2+},$

- 35

- (N^{εB29}-dekanoyl-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-dodekanoyl-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-tridekanoyl-Gly^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-tetradekanoyl-Gly^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 5 (N^{εB29}-dekanoyl-Gly^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-dodekanoyl-Gly^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-tridekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-tetradekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-dekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 10 (N^{εB29}-dodekanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-tridekanoyl-Ala^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-tetradekanoyl-Ala^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-dekanoyl-Ala^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-dodekanoyl-Ala^{A21}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 15 (N^{εB29}-tridekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-tetradekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-dekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-dodekanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-tridekanoyl-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 20 (N^{εB29}-tetradekanoyl-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺,
 (N^{εB29}-dekanoyl-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺ og
 (N^{εB29}-dodekanoyl-Gln^{B3}-Glu^{B30}-humaninsulin)₆, 4 Zn²⁺.

Kort beskrivelse av tegningene

- 25 Foreliggende oppfinnelse er ytterligere illustrert
 under henvisning til de ledsagende tegninger hvor
 figur 1 viser konstruksjonen av plasmidet pEA5.3.2,
 figur 2 viser konstruksjonen av plasmidet pEA108, og
 figur 3 viser konstruksjonen av plasmidet pEA113.

30

Nærmere beskrivelse av oppfinnelsen

Terminologi

- Trebokstavskodene og enbokstavskodene for aminosyre-
 35 restene som her er brukt, er de som er angitt i J. Biol. Chem.
 243, 2. 3558 (1968).

I DNA-sekvensene er A adenin, C er cytosin, G er
 guanin og T er tymin.

De følgende akronymer er brukt:

DMSO for dimetylsulfoksid, DMF for dimetylformamid, Boc for tert.-butoksykarbonyl, RP-HPLC for reversfasevæskekromatografi med høy yteevne, X-OSu er en N-hydroksysuccinimid-
 5 ester, X er en acylgruppe, og TFA står for trifluoreddiksyre.

Fremstilling av lipofile insulinderivater

Humaninsulinderivatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles blant annet som beskrevet i det følgende:

10

1. Insulinderivater som i B30-stilling har en aminosyrerest som kan kodes for av den genetiske kode, f.eks. treonin (humaninsulin) eller alanin (porcint insulin)

15 1.1 Ved å starte fra humaninsulin

Humaninsulin behandles med et Boc-reagens (f.eks. di-tert.-butyldikarbonat), hvorved det dannes (A1,B1)-diBoc-humaninsulin, dvs. humaninsulin hvor den N-terminale ende i begge kjedene er beskyttet ved hjelp av en Boc-gruppe. Etter
 20 en eventuell rensing, f.eks. ved hjelp av HPLC, innføres en acylgruppe i ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} ved å la produktet reagere med en N-hydroksysuccinimidester med formel X-OSu hvor X er acylgruppen som skal innføres. I sluttrinnet brukes TFA til å fjerne Boc-gruppene, og produktet, N^{B29}-X-humaninsulin, isol-
 25 eres.

1.2 Ved å starte fra en enkeltkjedeinsulinforløper

En enkeltkjedeinsulinforløper forlenget i B1-stilling med en forlengelse (Ext) som er knyttet til B1 via en argininrest, og hvor broen fra B30 til A1 er en argininrest, dvs. en forbindelse med den generelle formel Ext-Arg-B(1-30)-Arg-A(1-21), kan brukes som utgangsmateriale. Acylering av dette utgangsmaterialet med en N-hydroksysuccinimidester med den generelle formel X-OSu hvor X er en acylgruppe, innfører acyl-
 30 gruppen X i ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} og i den N-terminale aminosyrerest i forløperen. Etter behandling av denne acylerte forløper med formel (N^{B29}-X),X-Ext-Arg-B(1-30)-Arg-A(1-21) med trypsin i en blanding av vann og et egnet, vannblandbart, organisk oppløsningsmiddel, f.eks. DMF, DMSO eller en lavere

alkohol, fås et mellomprodukt med formel $(N^{B29}-X), Arg^{B31}-insulin$. Behandling av dette mellomproduktet med karboksypeptidase B gir det ønskede produkt, $(N^{B29}-X)-insulin$.

5 2. Insulinderivater uten noen aminosyrerest i B30-stilling, dvs. des(B30)-insuliner

2.1 Ved å starte fra humaninsulin eller porcininsulin.

Etter behandling med karboksypeptidase A i ammonium-
 10 buffer gir både humaninsulin og porcininsulin des(B30)-insulin. Etter en eventuell rensing behandles des(B30)-insulinet med et Boc-reagens (f.eks. di-tert.-butyldikarbonat), hvorved det dannes (A1,B1)-diBoc-des(B30)-insulin, det vil si des(B30)-insulin hvor den N-terminale ende av begge kjedene er
 15 beskyttet ved hjelp av en Boc-gruppe. Etter en eventuell rensing, f.eks. ved hjelp av HPLC, innføres en acylgruppe i ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} ved å la produktet reagere med en N-hydroksysuccinimidester med formel X-OSu, hvor X er acylgruppen som skal innføres. I sluttrinnet brukes TFA til å fjerne
 20 Boc-gruppene, og produktet, $(N^{B29}-X)-des(B30)-insulin$, isoleres.

2.2 Ved å starte fra en enkeltkjedehumaninsulinforløper

En enkeltkjedehumaninsulinforløper som er forlenget i
 25 B1-stilling med en forlengelse (Ext) som er knyttet til B1 via en argininrest, og som har en bro fra B30 til A1, kan være et anvendbart utgangsmateriale. Broen er fortrinnsvis et peptid med formel Y_n-Arg hvor Y er en kodbar aminosyre, bortsett fra lysin og arginin, og n er null eller et helt tall mellom 1 og
 30 35. Når $n > 1$, kan Y-ene betegne forskjellige aminosyrer. Foretrukne eksempler fra broen fra B30 til A1 er: AlaAlaArg, SerArg, SerAspAspAlaArg og Arg (europeisk patent nr. 163529). Behandling av en slik forløper med den generelle formel Ext-Arg-B(1-30)- Y_n -Arg-A(1-21) med en lysylendopeptidase, f.eks.
 35 *Achromobacter lyticus*-protease, gir Ext-Arg-B(1-29)-Thr- Y_n -Arg-A(1-21)-des(B30)-insulin. Acylering av dette mellomproduktet med en N-hydroksysuccinimidester med den generelle formel X-OSu hvor X er en acylgruppe, innfører acylgruppen X i ϵ -amino-

gruppen i Lys^{B29}, og i den N-terminale aminogruppe i A-kjeden og B-kjeden, hvorved man får (N^{B29}-X)-X-Ext-Arg-B(1-29)-X-Thr-Y_n-Arg-A(1-21)-des(B30)-insulin. Dette mellomproduktet gir etter behandling med trypsin i blanding av vann og et egnet, organisk oppløsningsmiddel, f.eks. DMF, DMSO eller en lavere alkohol, det ønskede derivat (N^{B29}-X)-des(B30)-humaninsulin.

Data vedrørende N^{B29}-modifiserte insuliner

Visse forsøksdata vedrørende N^{B29}-modifiserte insuliner er gjengitt i tabell 1.

Lipofilisiteten til et insulinderivat i forhold til humaninsulin, k'_{rel} , ble målt på en "LiChrosorb RP18" (5 µm, 250 x 4 mm) HPLC-kolonne ved isokratisk eluering ved 40 °C under anvendelse av blandinger av A), 0,1 M natriumfosfat-buffer, pH 7,3, inneholdende 10% acetonitril, og B) 50% acetonitril i vann som elueringsmidler. Elueringen ble overvåket ved å følge UV-absorpsjonen i eluatet ved 214 nm. Nulltid, t_0 , ble funnet ved å injisere 0,1 mM natriumnitrat. Retensjonstid for humaninsulin, t_{human} , ble regulert til minst 2 t_0 for å variere forholdet mellom A- og B-oppløsningene. $k'_{rel} = (t_{derivat} - t_0) / (t_{human} - t_0)$.

Graden av forlengelse av den blodglukosesenkende effekt ble undersøkt hos kaniner. Hvert insulinderivat ble testet ved subkutan injeksjon av 12 nmol derav i hver av seks kaniner i enkeltdag-retardasjonstesten. Blodprøvetaking for glukoseanalyse ble utført før injeksjon og 1, 2, 4 og 6 timer etter injeksjon. Glukoseverdiene som ble funnet, er uttrykt som prosent av opprinnelige verdier. Protraksjonsindeksen som ble beregnet ut fra blodglukoseverdiene, er den veide protraksjonsindeks (forlengelse), se s. 211 i Markussen et al., Protein Engineering, 1 (1987), 205-213. Formelen er blitt veid for å gi en verdi på 100 med bovint "ultralente" insulin og en verdi på 0 med "Actrapid"-insulin (Novo Nordisk A/S, 2880 Bagsværd, Danmark).

Insulinderivatene angitt i tabell 1, ble administrert i oppløsninger inneholdende 3 Zn²⁺ pr. insulinheksamer, bortsett fra de som er spesifikt angitt å være Zn-frie.

For de svært langvarige analogene er kaninmodellen

ikke adekvat ettersom reduksjonen i blodglukose fra start er for liten til å beregne protraksjonsindeksen. Slike analogers forlengelse er bedre karakterisert ved forsvinningshastigheten hos griser. $T_{50\%}$ er den tid da 50% av A14-Tyr(^{125}I)-analogen har forsvunnet fra injeksjonsstedet, målt med en ekstern γ -teller (Ribet, U. et al., The Pig as a Model for Subcutaneous Absorption in Man. I: M. serrano-Rios og P.J. Lefebvre (red.): Diabetes 1985; Proceedings of the 12th Congress of the International Diabetes Federation, Madrid, Spania, 1985 (Excerpta Medica, Amsterdam, (1986), 891-96).

I tabell 2 er $T_{50\%}$ -verdiene for en serie av svært forlengede insulinanaloger angitt. Analogene ble administrert i oppløsninger som inneholder 3 Zn^{2+} pr. insulinheksamer.

15

20

25

30

35

Tabell 1

Insulinderivat *)	Relativ lipofilitet	Blodglukose, % av start				Protrak-sjonsindeks
		1 h	2 h	4 h	6 h	
N ^{B29} -benzoylinsulin	1,14					
N ^{B29} -fenylacetylinsulin (Zn-fritt)	1,28	55,4	58,9	88,8	90,1	10
N ^{B29} -sykloheksylacetylinsulin	1,90	53,1	49,6	66,9	81,1	28
N ^{B29} -sykloheksylpropionylinsulin	3,29	55,5	47,6	61,5	73,0	39
N ^{B29} -sykloheksylvaleroylinsulin	9,87	65,0	58,3	65,7	71,0	49
N ^{B29} -oktanoylinsulin	3,97	57,1	54,8	69,0	78,9	33
N ^{B29} -dekanoyl-des(B30)-insulin	11,0	74,3	65,0	60,9	64,1	65
N ^{B29} -dekanoylinsulin	12,3	73,3	59,4	64,9	68,0	60
N ^{B29} -undekanoyl-des(B30)-insulin	19,7	88,1	80,0	72,1	72,1	80
N ^{B29} -lauroyl-des(B30)-insulin	37,0	91,4	90,0	84,2	83,9	78

N ^e B ²⁹ -myristoylinsulin	113	98,5	92,0	83,9	84,5	97
N ^e B ²⁹ -choleoylinsulin	7,64	58,2	53,2	69,0	88,5	20
N ^e B ²⁹ -7-deoksychoyl- insulin (Zn-fritt)	24,4	76,5	65,2	77,4	87,4	35
N ^e B ²⁹ -litochoylinsu- lin (Zn-fritt)	51,6	98,3	92,3	100,5	93,4	115
N ^e B ²⁹ -4-benzoylfenyl- alanylinsulin	2,51	53,9	58,7	74,4	89,0	14
N ^e B ²⁹ -3,5-diiodtyrosyl- insulin	1,07	53,9	48,3	60,8	82,1	27
N ^e B ²⁹ -L-tyroksylinsulin	8,00					

Tabell 2

	Humaninsulin-derivat	Relativ hydrofobisitet	Subkutan bortfall hos griser
5	600 μ M, 3 Zn^{2+} /heksamer, fenol 0,3%, glyserol 1,6%, pH 7,5	k'_{rel}	$T_{50\%}$, timer
10	N^{B29} -dekanoyl-des(B30)-insulin	11,0	5,6
	N^{B29} -undekanoyl-des(B30)-insulin	19,7	6,9
15	N^{B29} -lauroyl-des(B30)-insulin	37	10,1
	N^{B29} -tridekanoyl-des(B30)-insulin	65	12,9
20	N^{B29} -myristoyl-des(B30)-insulin	113	13,8
	N^{B29} -palmitoyl-des(B30)-insulin	346	12,4
25	N^{B29} -succinimido-myristinsyre-insulin	10,5	13,6
	N^{B29} -myristoyl-insulin	113	11,9
30	Human-NPH		10

Oppløselighet

35 Oppløseligheten av alle de N^{B29} -modifiserte insuliner nevnt i tabell 1, som inneholder 3 Zn^{2+} -ioner pr. insulinheksamer, er mer enn 600 nmol/ml i et nøytralt (pH 7,5), vandig, farmasøytisk preparat som videre omfatter 0,3% fenol som preserveringsmiddel, og 1,6% glyserol for å oppnå isotonisi-

tet. 660 nmol/ml er den konsentrasjon av humaninsulin som finnes i preparatene med 100 IU/ml som vanligvis anvendes klinisk.

5 ϵ -B29-aminogruppen kan være en komponent i en amidbinding, en sulfonamidbinding, et karbamid, et tiokarbamid eller et karbamat. Den lipofile substituent som bæres av ϵ -B29-aminogruppen, kan også være en alkylgruppe.

Farmasøytiske preparater som inneholder et humaninsulinderivat ifølge foreliggende oppfinnelse, kan administreres parenteralt til pasienter som trenger slik behandling. Parenteral administrering kan utføres ved subkutan, intramuskulær eller intravenøs injeksjon ved hjelp av en sprøyte, eventuelt en pennlignende sprøyte. Alternativt kan parenteral administrering utføres ved hjelp av en infusjonspumpe. En ytterligere mulighet er et preparat som kan være et pulver eller en væske, for administrering av humaninsulinderivatet i form av en nesespray.

De injiserbare humaninsulinpreparater ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved å bruke de vanlige teknikkene i den farmasøytiske industri som omfatter oppløsning og blanding av bestanddelene etter behov, slik at man får det ønskede sluttprodukt.

Ifølge én fremgangsmåte oppløses således humaninsulinderivatet i en vannmengde som er noe mindre enn sluttvolumet til preparatet som skal fremstilles. Et isotont middel, et conserveringsmiddel og en buffer tilsettes etter behov, og pH-verdien i oppløsningen reguleres om nødvendig ved å bruke en syre, f.eks. saltsyre, eller en base, f.eks. vandig natriumhydroksid, etter behov. Til sist reguleres volumet av oppløsningen med vann, hvorved man får den ønskede konsentrasjoner av bestanddelene.

Eksempler på isotone midler er natriumklorid, mannitol og glyserol.

Eksempler på conserveringsmidler er fenol, m-kresol, metyl-p-hydroksybenzoat og benzylalkohol.

Eksempler på egnede buffere er natriumacetat og natriumfosfat.

Et preparat for neseadministrering av et insulinderivat ifølge foreliggende oppfinnelse kan f.eks. fremstilles som

beskrevet i europeisk patent nr. 272097 (Novo Nordisk A/S).

Insulinpreparatene ifølge denne oppfinnelsen kan anvendes ved behandling av diabetes. Det optimale dosenivå for en pasient vil avhenge av mange forskjellige faktorer, inkludert virkningsfullheten av det bestemte humaninsulinderivat som anvendes, alderen, kroppsvekten, den fysiske aktivitet og kosten til pasienten, av en mulig kombinasjon med andre legemidler og av alvorligheten av diabetestilfellet. Det er anbefalt at den daglige dosering av humaninsulinderivatet ifølge denne oppfinnelsen bestemmes for hver enkelt pasient av fagfolk innen teknikken, på en lignende måte som for kjente insulinpreparater.

Der det er hensiktsmessig, kan humaninsulinderivatene ifølge denne oppfinnelsen brukes i blanding med andre typer av insulin, f.eks. humaninsulin eller porcininsulin eller insulinanaloger med en hurtigere virkningsstart. Eksempler på slike insulinanaloger er beskrevet f.eks. i de europeiske patentsøknadene med publikasjonsnumrene EP 214826 (Novo Nordisk A/S), EP 375437 (Novo Nordisk A/S) og EP 383472 (Eli Lilly & Co.).

Foreliggende oppfinnelse er ytterligere illustrert ved hjelp av de følgende eksempler.

25

Eksempler

Plasmider og DNA-materiale

30

Alle ekspresjonsplasmider er av cPOT-typen. Slike plasmider er beskrevet i EP patentsøknad nr. 171 142 og er kjennetegnet ved å inneholde *Schizosaccharomyces pombe*-triosefosfatisomerasegenet (POT) for plasmidutvelgelses- og stabiliseringsformål. Et plasmid som inneholder POT-genet, er tilgjengelig fra en deponert *E. coli*-stamme (ATCC 39685). Plasmidene inneholder dessuten *S. cerevisiae*-triosefosfat-isomerasepromoter og -terminatoren (P_{TPI} og T_{TPI}). De er iden-

tiske med pMT742 (Egel-Mitani, M. et al., Gene, 73 (1988), 113-120) (se fig. 1), bortsett fra området definert ved hjelp av EcoRI-XbaI-restriksjonssetene som omfatter det kodende område for signal/leder/produkt.

⁵ Syntetiske DNA-fragmenter ble syntetisert på et automatisk DNA-synteseapparat (Applied Biosystems modell 380A) under anvendelse av fosforamidittkjemi og kommersielt tilgjengelige reagenser (Beaucage, S.L. og Caruthers, M.H., Tetrahedron Letters, 22 (1981), 1859-1869).

¹⁰ Alle andre anvendte metoder og materialer tilhører teknikkens stand (se f.eks. Sambrook, J., Fritsch, E.F. og Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).

¹⁵ Analytisk

Molekylvekter for de fremstilte insuliner ble erholdt ved hjelp av MS (massespektroskopi), enten ved PDMS (plasma-desorpsjonsmassespektrometri) under anvendelse av et "Bio-Ion 20"-instrument (Bio-Ion Nordic AB, Uppsala, Sverige), eller ²⁰ ved hjelp av ESMS (elektrospraymassespektrometri) under anvendelse av et API III Biomolecular masseanalyseapparat (Perkin-Elmer Sciex Instruments, Thornhill, Canada).

Eksempel 1

²⁵ Syntese av Ala^{A21}Asp^{B3}-humaninsulinforløper fra gjærstamme yEA002 under anvendelse av LaC212spx3-signalet/lederen

De følgende oligonukleotider ble syntetisert:

nr. 98	5'-TGGCTAAGAGATTCGTTGACCAACACTTGTGCGGTTCTCA	
³⁰	CTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGTGAA	
	AGAGGTTTCTTCTACACTCCAAAGTCTGACGACGCT-3'	(Asp ^{B3})
	(sekvensidentitet nr. 3)	
nr. 128	5'-CTGCGGGCTGCGTCTAAGCACAGTAGTTTTCCAATTGGTACAA	
	AGAACAGATAGAAGTACAACATTGTTCAACGATACCCTTAGCGTC	
³⁵	GTCAGACTTTGG-3'	(Ala ^{A21}) (sekvens-
	identitet nr. 4)	
nr. 126	5'-GTCGCCATGGCTAAGAGATTCGTTG-3'	(Asp ^{B3})
	(sekvensidentitet nr. 5)	

nr. 16 5'-CTGCTCTAGAGCCTGCGGGCTGCGTCT-3' (sekvens-identitet nr. 6)

Den følgende polymerasekjedereaksjon (PCR) ble utført under anvendelse av "Gene Amp"-PCR-reagenssettet (Perkin Elmer, 761 Main Avenue, CT 06859, USA) i henhold til produsentens instruksjoner. I alle tilfeller ble PCR-blandingen tildekket med 100 µl mineralolje (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

10

2,5 µl oligonukleotid nr. 98 (2,5 pmol)
 2,5 µl oligonukleotid nr. 128 (2,5 pmol)
 10 µl 10X PCR-buffer
 16 µl dNTP-blanding
 15 0,5 µl Taq-enzym
 58,5 µl vann

En syklus ble utført: 94 °C i 45 sekunder, 49 °C i 1 minutt, 72 °C i 2 minutter.

20

Deretter ble 5 µl oligonukleotider nr. 16 og nr. 126 tilsatt, og det ble utført 15 sykluser: 94 °C i 45 sekunder, 45 °C i 1 minutt, 72 °C i 1,5 minutt. PCR-blandingen ble fylt på en 2,5% agarosegel og underkastet elektroforese under anvendelse av standardteknikker (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1989). Det resulterende DNA-fragment ble kuttet ut av agarosegelen og isolert ved å bruke "Gene Clean"-settet (Bio 101 Inc., P.O. Box 2284, La Jolla, CA 92038, USA) i henhold til produsentens instruksjoner. Det rensede PCR-DNA-fragment ble oppløst i 10 µl vann og restriksjonsendonukleasebuffer, og kuttet med restriksjonsendonukleasene NcoI og XbaI i henhold til standardteknikker, kjørt på en 2,5% agarosegel og renset ved å bruke "Gene Clean"-settet som beskrevet.

30

Plasmidet pAK188 består av en DNA-sekvens med 412 bp sammensatt av et EcoRI/NcoI-fragment som koder det syntetiske gjær-signal/leder-gen LaC212spx3 (beskrevet i eksempel 3 i WO 89/02463) etterfulgt av et syntetisk NcoI/XbaI-fragment som koder for insulinforløperen MI5, som har en SerAspAspAlaLys-bro som knytter sammen B29- og Al-aminosyrerestene (se sek-

vensidentitetene nr. 14, 15 og 16), innføydd i EcoRI/XbaI-fragmentet i vektoren (fagmid) "pBluescript" IIsk(+/-) (Stratagene, USA). Plasmidet pAK188 er vist i figur 1.

Plasmidet pAK188 ble også kuttet med restriksjonsendonukleasene NcoI og XbaI, og vektorfragmentet på 3139 bp ble isolert. De to DNA-fragmentene ble ligert sammen under anvendelse av T4-DNA-ligase og standardbetingelser (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1989). Ligeringsblandingen ble omdannet til en kompetent *E. coli*-stamme (R-, M+), etterfulgt av utvelgelse med hensyn på ampicillinresistens. Plasmider ble isolert fra de resulterende *E. coli*-kolonier under anvendelse av standard DNA-miniprep-teknikk (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1989), sjekket med passende restriksjonsendonukleaser, dvs. EcoRI, XbaI, NcoI og HpaI. Det utvalgte plasmid ble påvist ved hjelp av DNA-sekvenseringsanalyser ("Sequenase", U.S. Biochemical Corp.) å inneholde den korrekte sekvens for Ala^{A21}, Asp^{B3}-humaninsulinforløperen og kalt pEA5.3.

Plasmidet pKFN1627 er en *E. coli* - *S. cerevisiae*-fergevektor, identisk med plasmid pKFN1003 beskrevet i EP patentskrift nr. 375718, bortsett fra en kort DNA-sekvens oppstrøms for det unike XbaI-sete. I pKFN1003 er denne sekvensen et 178 bp stort fragment som koder et syntetisk aprotiningen fusjonert i ramme til gjær-"mating factor alpha 1"-signalleder-sekvensen. I pKFN1627 koder den tilsvarende 184 bp store sekvens for insulinforløperen MI5 (Glu^{B1}, Glu^{B28}) (dvs. B(1-29, Glu^{B1}, Glu^{B28})-SerAspAspAlaLys-A(1-21) fusjonert i ramme til "mating factor alpha 1"-sekvensen (se sekvensidentitetene nr. 17, 18 og 19). Vektoren pKFN1627 er vist i figur 1.

pEA5.3 ble kuttet med restriksjonsendonukleasene EcoRI og XbaI, og det resulterende DNA-fragment med 412 bp ble isolert. Gjærekspresjonsvektoren pKFN1627 ble kuttet med restriksjonsendonukleasene NcoI og XbaI, og med NcoI og EcoRI, og DNA-fragmentet med 9273 bp ble isolert fra den første for-døyelse og DNA-fragmentet med 1644 bp ble isolert fra den andre. Det 412 bp store EcoRI/XbaI-fragment ble så ligert til de to øvrige fragmentene, dvs. det 9273 bp store NcoI/XbaI-

fragment og det 1644 bp store NcoI/EcoRI-fragment under anvendelse av standardteknikker.

Ligeringsblandingen ble transformert i *E. coli* som beskrevet ovenfor. Plasmid fra den resulterende *E. coli* ble
 5 isolert ved å bruke standardteknikker og sjekket med passende restriksjonsendonukleaser, dvs. EcoRI, XbaI, NcoI, HpaI. Det utvalgte plasmid ble vist ved hjelp av DNA-sekvensanalyse (under anvendelse av "Sequenase"-settet som beskrevet av produsenten, U.S. Biochemical) å inneholde den korrekte sekvens
 10 for Ala²¹Asp⁸³-humaninsulinforløper-DNA-en og å være innføyd etter den DNA som koder for LaC212spx3-signal/leder-DNA-en. Plasmidet ble kalt pEA5.3.2 og er vist i figur 1. DNA-sekvensen som koder for LaC212spx3-signal/leder/Ala²¹Asp⁸³-humaninsulinforløperkomplekset og aminosyresekvensen for dette, er
 15 sekvensidentitetene nr. 20, 21 og 22. Plasmidet pEA5.3.2 ble transformert i *S. cerevisiae* stamme MT663 som beskrevet i europeisk patentsøknad med publikasjonsnr. 214826, og den resulterende stamme ble kalt yEA002.

20 Eksempel 2

Syntese av Ala²¹Thr⁸³-humaninsulinforløper fra gjærstamme yEA005 under anvendelse av LaC212spx3-signalet/lederen

De følgende oligonukleotider ble syntetisert:

- 25 nr. 101 5'-TGGCTAAGAGATTCGTTACTCAACACTTGTGCGGTTCTCACTT
GGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGTGAAAGAGGTTTCTTCTACA
CTCCAAAGTCTGACGACGCT-3' (Thr⁸³) (sekvens-
identitet nr. 7)
- nr. 128 5'-CTGCGGGCTGCGTCTAAGCACAGTAGTTTTCCAATTGGTACAAA
30 GAACAGATAGAAGTACAACATTGTTCAACGATACCCTTAGCGTCG
TCAGACTTTGG-3' (Ala²¹) (sekvensidentitet nr. 4)
- nr. 15 5'-GTCGCCATGGCTAAGAGATTCGTTA-3' (Thr⁸³) (sekvensidentitet nr. 8)
- nr. 16 5'-CTGCTCTAGAGCCTGCGGGCTGCGTCT-3' (sekvensidentitet nr. 6)
35

Den DNA som koder for Ala²¹Thr⁸³-humaninsulinforløper, ble konstruert på samme måte som beskrevet for den DNA som

koder for Ala^{A21}Asp^{B3}-humaninsulinforløper i eksempel 1. DNA-sekvensen som koder for LaC212spx3-signal/leder/Ala^{A21}Thr^{B3}-humaninsulinforløperkomplekset og aminosyresekvensen for dette, er sekvensidentitetene nr. 23, 24 og 25. Plasmidet pEA8.1.1 ble vist å inneholde den ønskede sekvens, transformert i *S. cerevisiae* stamme MT663 som beskrevet i eksempel 1, og den resulterende stamme ble kalt yEA005.

Eksempel 3

10 Syntese av Gly^{A21}Asp^{B3}-humaninsulinforløper fra gjærstamme yEA007 under anvendelse av LaC212spx3-signalet/lederen

De følgende oligonukleotider ble syntetisert:

nr. 98 5'-TGGCTAAGAGATTCGTTGACCAACACTTGTGCGGTTCTCACTTG
15 GTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGTGAAAGAGGTTTCTTCT
ACACTCCAAAGTCTGACGACGCT-3' (Asp^{B3}) (sekvens-
identitet nr. 3)
nr. 127 5'-CTGCGGGCTGCGTCTAACCACAGTAGTTTTCCAATTGGTACAA
AGAACAGATAGAAGTACAACATTGTTCAACGATACCCT
20 TAGCGTCGTCAGACTTTGG-3' (Gly^{A21}) (sekvens-
identitet nr. 9)
nr. 126 5'-GTCGCCATGGCTAAGAGATTCGTTG-3' (Asp^{B3}) (sek-
vensidentitet nr. 5)
nr. 16 5'-CTGCTCTAGAGCCTGCGGGCTGCGTCT-3' (sekvens-
25 identitet nr. 6)

Den DNA som koder for Gly^{A21}Asp^{B3}-humaninsulinforløperen, ble konstruert på samme måte som beskrevet for den DNA som koder for Ala^{A21}Asp^{B3}-humaninsulinforløperen i eksempel 1. DNA-sekvensen som koder for LaC212spx3-signal/leder/-
30 Gly^{A21}Asp^{B3}-humaninsulinforløperkomplekset og aminosyresekvensen for dette, er sekvensidentitetene nr. 26, 27 og 28. Plasmidet pEA1.5.6 ble vist å inneholde den ønskede sekvens, transformert i *S. cerevisiae*-stamme MT663 som beskrevet i eksempel 1,
35 og den resulterende stamme ble kalt yEA007.

Eksempel 4

Syntese av Gly^{A21}Thr^{B3}-humaninsulinforløper fra gjærstamme yEA006 under anvendelse av LaC212spx3-signalet/lederen

De følgende oligonukleotider ble syntetisert:

5

nr. 101 5'-TGGCTAAGAGATTCGTTACTCAACACTTGTGCGGTCTCACTT
GGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGTGAAAGAGGTTTCTTCTACA
CTCCAAAGTCTGACGACGCT-3' (Thr^{B3}) (sekvens-
identitet nr. 7)

10 nr. 127 5'-CTGCGGGCTGCGTCTAACCACAGTAGTTTTCCAATTGGTACAA
AGAACAGATAGAAGTACAACATTGTTCAACGATACCCT
TAGCGTCGTCAGACTTTGG-3' (Gly^{A21}) (sekvens-
identitet nr. 9)

nr. 15 5'-GTCGCCATGGCTAAGAGATTCGTTA-3' (Thr^{B3}) (sek-
15 vensidentitet nr. 8)

nr. 16 5'-CTGCTCTAGAGCCTGCGGGCTGCGTCT-3' (sekvens-
identitet nr. 6)

Den DNA som koder for Gly^{A21}Thr^{B3}-humaninsulinforløper,
20 ble konstruert på samme måte som beskrevet for den DNA som
koder for Ala^{A21}Asp^{B3}-humaninsulinforløper i eksempel 1. DNA-
sekvensen som koder for LaC212spx3-signal/leder/Gly^{A21}Thr^{B3}-
humaninsulinforløperkomplekset og aminosyresekvensen derav, er
sekvensidentitetene nr. 29, 30 og 31. Plasmidet pEA4.4.11 ble
25 vist å inneholde den ønskede DNA-sekvens transformert i *S.*
cerevisiae-stamme MT663 som beskrevet i eksempel 1, og den
resulterende stamme ble kalt yEA006.

Eksempel 5

30 Syntese av Arg^{B-1}Arg^{B31}-enkeltkjedehumaninsulinforløper med en N-
terminal forlengelse (GluGluAlaGluAlaGluAlaArg) fra gjærstamme
yEA113 under anvendelse av alfafaktor-lederen

A)

De følgende oligonukleotider ble syntetisert:

35

nr. 220 5'-ACGTACGTTCTAGAGCCTGCGGGCTGC-3' (sekvensidenti-
tet nr. 10)

nr. 263 5'-CACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGTGAAAGAGGTTTC
TTCTACACTCCAAAGACTAGAGGTATCGTTGAA-3' (sekvens-
identitet nr. 11)

nr. 307 5'-GCTAACGTCGCCATGGCTAAGAGAGAAGAAGCTGAAGCTGAAGCT
5 AGATTCGTTAACCAACAC-3' (sekvensidentitet nr. 12)

Den følgende polymerasekjedereaksjon (PCR) ble utført under anvendelse av "Gene Amp"-PCR-reagenssettet (Perkin Elmer, 761 Main Avewalk, CT 06859, USA) i henhold til produsentens instruksjoner. I alle tilfeller ble PCR-blandingen til-
10 dekket med 100 µl mineralolje (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Plasmidet pAK220 (som er identisk med pAK188) består av en DNA-sekvens med 412 bp som koder for den syntetiske gjær-signal/leder Lac212spx3 (beskrevet i eksempel 3 i WO
15 89/02463), etterfulgt av insulinforløperen MI5 (se sekvensidentitetene nr. 14, 15 og 16) innføyd i vektoren (fagmid) "pBluescript" IIsk(+/-) (Stratagene, USA).

5 µl oligonukleotid nr. 220 (100 pmol)
20 5 µl oligonukleotid nr. 263 (100 pmol)
10 µl 10X PCR-buffer
16 µl dNTP-blanding
0,5 µl Taq-enzym
0,5 µl pAK220-plasmid (identisk med pAK188) som templat
25 (0,2 µg DNA)
63 µl vann

I alt 16 sykluser ble utført hvor hver syklus omfattet 1 minutt ved 95 °C, 1 minutt ved 40 °C og 2 minutter ved
30 72 °C. PCR-blandingen ble så fylt på en 2% agarosegel og underkastet elektroforese under anvendelse av standardteknikker. Det resulterende DNA-fragment ble kuttet ut fra agarosegelen og isolert under anvendelse av "Gene Clean"-settet (Bio
101 Inc., P.O. Box 2284, La Jolla, CA 92038, USA) i henhold
35 til produsentens instruksjoner. Det rensede PCR-DNA-fragment ble oppløst i 10 µl vann og restriksjonsendonukleasebuffer og kuttet med restriksjonsendonukleasene HindIII og XbaI i henhold til standardteknikker. HindIII/XbaI-DNA-fragmentet ble rensset under anvendelse av "Gene Clean"-settet som beskrevet.

Plasmidet pAK406 består av en DNA-sekvens med 520 bp omfattende et EcoRI/HindIII-fragment avledet fra pMT636 (beskrevet i WO 90/10075) som koder for gjær-alfafaktor-lederen, og en del av insulinforløperen ligert til HindIII/XbaI-fragmentet fra pAK188 som koder for resten av insulinforløperen MI5 (se sekvensidentitetene nr. 32, 33 og 34) innføyd i vektoren cPOT. Vektoren pAK406 er vist i figur 2.

Plasmidet pAK233 består av en DNA-sekvens med 412 bp som koder for den syntetiske gjær-signal/leder LaC212sp_{x3} (beskrevet i eksempel 3 i WO 89/02463), etterfulgt av genet for insulinforløperen B(1-29)-GluLysArg-A(1-21) (A21-Gly) (se sekvensidentitetene nr. 35, 36 og 37) innføyd i vektoren cPOT. Plasmidet pAK233 er vist i figur 2.

Plasmidet pAK233 ble kuttet med restriksjonsendonukleasene NcoI og XbaI, og vektorfragmentet på 9273 bp ble isolert. Plasmidet pAK406 ble kuttet med restriksjonsendonukleasene NcoI og HindIII, og vektorfragmentet på 2012 bp ble isolert. Disse to DNA-fragmentene ble ligert sammen med HindIII/XbaI-PCR-fragmentet under anvendelse av T4-DNA-ligase og standardbetingelser. Ligeringsblandingen ble så transformert inn i kompetent *E. coli*-stamme (R-, M+) etterfulgt av utvelgelse med hensyn på ampicillinresistens. Plasmider ble isolert fra de resulterende *E. coli*-kolonier under anvendelse av en standard DNA-miniprep.-teknikk og sjekket med passende restriksjonsendonukleaser, dvs. EcoRI, XbaI, NcoI og HindIII. Det utvalgte plasmid ble påvist ved hjelp av DNA-sekvenseringsanalyser å inneholde den korrekte sekvens for Arg⁸³¹-enkeltkjedehumansulinforløper-DNA-en, og å være innføyd etter den DNA som koder for *S. cerevisiae*-alfafaktor-DNA-en. Plasmidet ble kalt pEA108 og er vist i figur 2. DNA-sekvensen som koder for alfafaktor-leder/Arg⁸³¹-enkeltkjedehumansulinforløperkomplekset og aminosyresekvensen derav, er sekvensidentitetene nr. 38, 39 og 40. Plasmidet pEA108 ble transformert inn i *S. cerevisiae*-stamme MT663 som beskrevet i eksempel 1, og den resulterende stamme ble kalt yEA108.

B)

Den følgende polymerasekjedereaksjon (PCR) ble utført

under anvendelse av "Gene Amp"-PCR-reagenssettet (Perkin Elmer, 761 Main Ave, Walk, CT 06859, USA) i henhold til produsentens instruksjoner. I alle tilfeller ble PCR-blandingen tildekket med 100 µl mineralolje (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

5 µl oligonukleotid nr. 220 (100 pmol)

5 µl oligonukleotid nr. 307 (100 pmol)

10 µl 10X PCR-buffer

10 16 µl dNTP-blanding

0,5 µl Taq-enzym

0,2 µl pEA108-plasmid som templat (0,1 µg DNA)

63 µl vann

15 I alt 16 sykluser ble utført, hvor hver syklus omfattet 1 minutt ved 95 °C, 1 minutt ved 40 °C og 2 minutter ved 72 °C. PCR-blandingen ble så fylt på en 2% agarosegel og underkastet elektroforese under anvendelse av standardteknikker. Det resulterende DNA-fragment ble kuttet ut fra agarosegelen og isolert under anvendelse av "Gene Clean"-settet (Bio 20 101 Inc., P.O. Box 2284, La Jolla, CA 92038, USA) i henhold til produsentens instruksjoner. Det rensede PCR-DNA-fragment ble oppløst i 10 µl vann og restriksjonsendonukleasebuffer og kuttet med restriksjonsendonukleasene NcoI og XbaI i henhold 25 til standardteknikker. NcoI/XbaI-DNA-fragmentet ble rensset under anvendelse av "Gene Clean"-settet som beskrevet.

Plasmidet pAK401 består av en DNA-sekvens med 523 bp sammensatt av et EcoRI/NcoI-fragment avledet fra pMT636 (beskrevet i WO 90/10075) (konstruert ved innføring av et NcoI-sete i 3'-enden av alfalederen ved hjelp av seterettet mutagenese) som koder for alfafaktor-lederen, etterfulgt av et NcoI/XbaI-fragment fra pAK188 som koder for insulinforløperen MI5 (se sekvensidentitetene nr. 41, 42 og 43) innføydd i vektoren (fagmid) "pBluescript" IIsk(+/-) (Stratagene, USA).

35 Plasmidet pAK401 er vist i figur 3.

Plasmidet pAK401 ble kuttet med restriksjonsendonukleasene NcoI og XbaI, og vektorfragmentet med 3254 bp ble isolert og ligert sammen med NcoI/XbaI-PCR-fragmentet. Ligerings-

blandingen ble så transformert inn i en kompetent *E. coli*-stamme, og plasmider ble isolert fra de resulterende *E. coli*-koloniene under anvendelse av en standard DNA-miniprep.-teknikk og sjekket med passende restriksjonsendonukleaser, dvs. EcoRI, XbaI og NcoI. Det utvalgte plasmid kalt p113A (vist i figur 3), ble kuttet med EcoRI og XbaI, og fragmentet med 535 bp ble isolert.

Plasmidet pAK233 ble kuttet med restriksjonsendonukleasene NcoI og XbaI og med EcoRI/NcoI, og fragmentene med 9273 og 1644 bp ble isolert. Disse to DNA-fragmentene ble ligert sammen med EcoRI/XbaI-fragmentet fra p113A under anvendelse av T4-DNA-ligase og standardbetingelser. Ligeringsblandingen ble så transformert inn i en kompetent *E. coli*-stamme (R-, M+), etterfulgt av utvelgelse med hensyn på ampicillin-resistens. Plasmider ble isolert fra de resulterende *E. coli*-kolonier under anvendelse av en standard DNA-miniprep.-teknikk og sjekket med passende restriksjonsendonukleaser, dvs. EcoRI, XbaI, NcoI og HindIII. Det utvalgte plasmid ble påvist ved hjelp av DNA-sekvensanalyser å inneholde den korrekte sekvens for Arg^{B31}-enkeltkjedehumaninsulinforløper-DNA-en med den N-terminale forlengelse GluGluAlaGluAlaGluAlaArg, og å være innføydd etter den DNA som koder for *S. cerevisiae*-alfafaktor-DNA-en. Plasmidet ble kalt pEA113 og er vist i figur 3. DNA-sekvensen som koder for alfafaktor-leder/Arg^{B-1}Arg^{B31}-enkeltkjedehumaninsulinforløperen med en N-terminal forlengelse (GluGluAlaGluAlaGluAlaArg) og aminosyresekvensen derav, er sekvensidentitetene nr. 44, 45 og 46. Plasmidet pEA113 ble transformert inn i *S. cerevisiae*-stamme MT663 som beskrevet i eksempel 1, og den resulterende stamme ble kalt yEA113.

Eksempel 6

Syntese av Arg^{B-1}Arg^{B31}-enkeltkjedehumaninsulinforløper med en N-terminal forlengelse (GluGluAlaGluAlaGluAlaGluArg) fra gjærstamme yEA136 under anvendelse av alfafaktor-lederen

Det følgende oligonukleotid ble syntetisert:

nr. 389 5'-GCTAACGTCGCCATGGCTAAGAGAGAAGAAGCTGAAGCGAAG
CTGAAAGATTTCGTTAACCAACAC-3' (sekvensidentitet nr. 13)

Den følgende PCR ble utført under anvendelse av "Gene Amp"-PCR-reagenssettet:

- 5 µl oligonukleotid nr. 220 (100 pmol)
- 5 µl oligonukleotid nr. 389 (100 pmol)
- 10 µl 10X PCR-buffer
- 16 µl dNTP-blanding
- 0,5 µl Taq-enzym
- 2 µl pEA113-plasmid som templat (0,5 µg DNA)
- 63 µl vann

I alt 12 sykluser ble utført, idet hver syklus omfattet 1 minutt ved 95 °C, 1 minutt ved 37 °C og 2 minutter ved 72 °C.

- Den DNA som koder for alfafaktor-leder/Arg^{B-1}Arg^{B31}-enkeltkjedehumaninsulinforløperen med en N-terminal forlengelse (GluGluAlaGluAlaGluAlaGluArg), ble konstruert på samme måte som beskrevet for den DNA som koder for alfafaktor-leder/Arg^{B-1}Arg^{B31}-enkeltkjedehumaninsulinforløperen med en N-terminal forlengelse (GluGluAlaGluAlaGluAlaArg) i eksempel 5. Plasmidet ble kalt pEA136. Den DNA-sekvens som koder for alfafaktor-leder/Arg^{B-1}Arg^{B31}-enkeltkjedehumaninsulinforløperen med en N-terminal forlengelse (GluGluAlaGluAlaGluAlaGluArg) og aminosyresekvensen derav, er sekvensidentitetene nr. 47,48 og 49. Plasmidet pEA136 ble transformert inn i *S. cerevisiae*-stamme MT663 som beskrevet i eksempel 1, og den resulterende stamme ble kalt yEA136.

Eksempel 7

Syntese av (A1,B1)-diBoc-humaninsulin

- 5 g sinkfritt humaninsulin ble oppløst i 41,3 ml DMSO. Til oppløsningen ble det tilsatt 3,090 ml eddiksyre. Reaksjonen ble utført ved romtemperatur og startet opp ved tilsetning av 565 mg di-tert.-butylpyrokarbonat oppløst i 5,650 ml DMSO. Reaksjonen fikk forløpe i 5,5 time og ble så stanset ved tilsetning av 250 µl etanolamin. Produktet ble utfelt ved tilsetning av 1 500 ml aceton. Utfellingen ble isolert ved sentrifugering og tørket i vakuum. Det ble oppnådd et

utbytte på 6,85 g materiale.

(Al,B1)-diBoc-insulin ble rensset ved reversfase-HPLC på følgende måte: Råproduktet ble oppløst i 100 ml 25% etanol i vann, regulert til pH 3,0 med HCl og tilført en kolonne
 5 (5 cm i diameter, 30 cm høy) pakket med oktadecyldimetylsilyl-substituerte silikapartikler (gjennomsnittlig partikkelstørrelse 15 μm , porestørrelse 100 Å) og ekvilibrert med elueringsbuffer. Elueringen ble utført under anvendelse av blandinger av etanol og 1 mM vandig HCl, 0,3 M KCl ved en gjennom-
 10 strømningshastighet på 2 l/time. Insulinet ble eluert ved å øke etanolinnholdet fra 30% til 45%. Den korrekte fraksjon ble fortynnet til 20% etanol og utfelt ved pH 4,8. Det utfelte materiale ble isolert ved sentrifugering og tørket under vakuum. Derved ble det oppnådd 1,701 g (Al,B1)-diBoc-humanin-
 15 sulin ved en renhet på 94,5%.

Eksempel 8

Syntese av (N^{B29} -benzoylhumaninsulin) $_6 \cdot 3 \text{Zn}^{2+}$

400 mg (Al,B1)-diBoc-humaninsulin ble oppløst i 2 ml
 20 DMSO. Til oppløsningen ble det tilsatt 748 μl av en blanding av N-metylmorfolin og DMSO (volumforhold 1:9). Reaksjonen ble utført ved 15 °C og startet opp ved tilsetning av 14,6 mg benzosyre-N-hydroksysuccinimidester oppløst i 132 μl DMF. Reaksjonen ble stanset etter 2 timer ved tilsetning av 100 ml aceton.
 25 Det utfelte materiale ble isolert ved sentrifugering og tørket under vakuum. 343 mg materiale ble samlet opp.

Boc-beskyttelsesgruppene ble fjernet ved tilsetning av 4 ml TFA. Det oppløste materiale ble inkubert i 30 minutter og så utfelt ved tilsetning av 50 ml aceton. Utfellingen ble
 30 isolert ved sentrifugering og tørket under vakuum.

N^{B29} -benzoylhumaninsulin ble rensset ved hjelp av reversfase-HPLC som beskrevet i eksempel 7. Et utbytte på 230 mg ble oppnådd. RekrySTALLISERING fra 15% vandig etanol inneholdende 6 mM Zn^{2+} og 50 mM sitrat ved pH 5,5, ga krys-
 35 taller av tittelforbindelsen som ble isolert ved sentrifugering og tørket under vakuum. Utbyttet var 190 mg.

Molekylvekt, funnet ved hjelp av MS: 5911, teori: 5911.

Eksempel 9Syntese av (N^{B29}-litocholoyl-humaninsulin)₆ · 3 Zn²⁺

400 mg (A1,B1)-diBoc-humaninsulin ble oppløst i 2 ml DMSO. Til oppløsningen ble det tilsatt 748 µl av en blanding
 5 av N-metylmorfolin og DMSO (volumforhold 1:9). Reaksjonen ble utført ved 15 °C og startet opp ved tilsetning av 31,94 mg litocholinsyre-N-hydroksysuccinimidester oppløst i 300 µl DMF. Reaksjonen ble stanset etter 2 timer ved tilsetning av 100 ml aceton. Det utfelte materiale ble isolert ved sentrifugering
 10 og tørket under vakuum. 331 mg materiale ble oppnådd.

Boc-beskyttelsesgruppene ble fjernet ved tilsetning av 4 ml TFA. Det oppløste materiale ble inkubert i 30 minutter og så utfelt ved tilsetning av 50 ml aceton. Utfellingen ble isolert ved sentrifugering og tørket under vakuum. Utbyttet
 15 var 376 mg.

B29-litocholoylinsulin ble rensset ved hjelp av reversfase-HPLC som beskrevet i eksempel 7. Et sluttutbytte på 67 mg ble oppnådd ved en renhet på 94%. Rekrystallisering fra 15% vandig etanol inneholdende 6 mM Zn²⁺ og 50 mM sitrat ved pH
 20 5,5, ga krystaller av tittelforbindelsen som ble isolert ved sentrifugering og tørket under vakuum. Utbyttet var 49 mg.

Molekylvekt, funnet ved hjelp av MS: 6160, teori: 6166.

25 Eksempel 10Syntese av (N^{B29}-dekanoyl-humaninsulin)₆ · 3 Zn²⁺

400 mg (A1,B1)-diBoc-humaninsulin ble oppløst i 2 ml DMSO. Til oppløsningen ble det tilsatt 748 µl av en blanding av N-metylmorfolin og DMSO (volumforhold 1:9). Reaksjonen ble
 30 utført ved 15 °C og startet opp ved tilsetning av 18,0 mg dekansyre-N-hydroksysuccinimidester oppløst i 132 µl DMF. Reaksjonen ble stanset etter 60 minutter og produktet utfelt ved tilsetning av 100 ml aceton. Det utfelte materiale ble isolert ved sentrifugering og tørket under vakuum. 420 mg mel-
 35 lomprodukt ble samlet opp.

Boc-beskyttelsesgruppene ble fjernet ved tilsetning av 4 ml TFA. Det oppløste materiale ble inkubert i 30 minutter, og produktet ble så utfelt ved tilsetning av 50 ml aceton. Utfellingen ble isolert ved sentrifugering og tørket

under vakuum. Utbyttet av råprodukt var 420 mg.

Råproduktet ble rensed ved reversfase-HPLC som beskrevet i eksempel 7. Et sluttutbytte på 254 mg av tittelproduktet ble oppnådd. Renheten var 96,1%. Rekrystallisering fra
 5 15% vandig etanol inneholdende 6 mM Zn^{2+} og 50 mM sitrat ved pH 5,5, ga krystaller av tittelforbindelsen som ble isolert ved sentrifugering og tørket under vakuum. Utbyttet var 217 mg.

Molekylvekt, funnet ved hjelp av MS: 5962, teori: 5962.

10

Eksempel 11

Syntese av des(B30)-humaninsulin

Syntese av des(B30)-humaninsulin ble utført som beskrevet av Markussen (Methods in Diabetes Research, vol. I,
 15 Laboratory Methods, del B, 404-410. Red.: J. Larner og S. Phol, John Wiley & Sons, 1984). 5 g humaninsulin ble oppløst i 500 ml vann mens pH-verdien i oppløsningen ble holdt ved 2,6 ved tilsetning av 0,5 M svovelsyre. Deretter ble insulinet utsaltet ved tilsetning av 100 g ammoniumsulfat, og utfellin-
 20 gen ble isolert ved sentrifugering. Pelleten ble oppløst i 800 ml 0,1 M ammoniumhydrogenkarbonat, og pH-verdien i oppløsningen ble regulert til 8,4 med 1 M ammoniakk.

50 mg bovin karboksypeptidase A ble oppslemmet i 25 ml vann og isolert ved sentrifugering. Krystallene ble opp-
 25 slemmet i 25 ml vann, og 1 M ammoniakk ble tilsatt inntil det ble oppnådd en klar oppløsning ved en slutt-pH på 10. Karboksypeptidaseoppløsningen ble tilsatt til insulinoppløsningen, og reaksjonen fikk forløpe i 24 timer. Noen få dråper toluen ble tilsatt for å virke som conserveringsmiddel under reaksjonen.
 30

Etter 24 timer ble des(B30)-humaninsulinet krystallisert ved suksessiv tilsetning av 80 g natriumklorid mens oppløsningen ble omrørt. pH-verdien ble så regulert til 8,3, og krystalliseringen fikk forløpe i 20 timer med forsiktig
 35 omrøring. Krystallene ble isolert på et 1,2 μ m filter, vasket med 250 ml iskald 2-propanol og til sist tørket under vakuum.

Eksempel 12Syntese av (A1,B1)-diBoc-des(B30)-humaninsulin

Tittelforbindelsen ble syntetisert ved hjelp av en lignende fremgangsmåte som den som er beskrevet i eksempel 7, under anvendelse av des(B30)-porcininsulin som utgangsmateriale. Råproduktet ble utfelt ved hjelp av aceton og tørket under vakuum. (A1,B1)-diBoc-des(B30)-humaninsulin ble rensset ved hjelp av reversfase-HPLC som beskrevet i eksempel 7.

10 Eksempel 13Syntese av N^{εB29}-dekanoyl-des(B30)-humaninsulin

400 mg (A1,B1)-diBoc-des(B30)-humaninsulin ble brukt som utgangsmateriale for syntesen av N^{εB29}-dekanoyl-des(B30)-humaninsulin ved å følge fremgangsmåten beskrevet i eksempel 10. Råproduktet ble utfelt ved hjelp av aceton, tørket under vakuum og avbeskyttet under anvendelse av TFA. Det resulterende produkt ble utfelt ved hjelp av aceton og tørket under vakuum. N^{εB29}-dekanoyl-des(B30)-humaninsulinet ble så rensset ved hjelp av reversfase-HPLC som beskrevet i eksempel 10.

20 Molekylvekt, funnet ved hjelp av MS: 5856, teori: 5861.

Eksempel 14Syntese av N^{εB29}-dodekanoyl-des(B30)-humaninsulin

25

a. Immobilisering av *A. lyticus*-protease

13 mg *A. lyticus*-protease oppløst i 5 ml vandig 0,2 M NaHCO₃-buffer, pH 9,4, ble blandet med 4 ml utskilt "MiniLeak" mediumgel, som var blitt vasket med den samme buffer ("MiniLeak" er en divinylsulfonaktivert "Sephacrose" CL 6B erholdt fra KemEnTec, København). Gelen ble holdt i suspensjon ved forsiktig omrøring i 24 timer ved romtemperatur. Så ble gelen isolert ved filtrering, vasket med vann og oppslemmet i 20 ml 1 M etanolaminbuffer, pH 9,4, og holdt i suspensjon i 24 timer ved romtemperatur. Til sist ble gelen vasket med vann, etterfulgt av 0,1 M eddiksyre og lagret ved 4 °C. Enzymaktiviteten i filtratet var 13% av aktiviteten i den opprinnelige oppløsning, noe som indikerer et utbytte ved immobilis-

eringsreaksjonen på ca. 87%.

b. Immobilisering av porcintrypsin

Porcintrypsin ble immobilisert til "MiniLeak Low"
 5 inntil en substitueringsgrad på 1 mg pr. ml gel under anvendelse av betingelsene beskrevet ovenfor for immobilisering av *A. lyticus*.

c. Syntese av Glu(GluAla)₃Arg-B(1-29), ThrArg-A(1-21)-insulin

10 under anvendelse av immobilisert *A. lyticus*-protease

Til 200 mg Glu(GluAla)₃Arg-B(1-29)-ThrArg-A(1-21)-enkeltkjedehumaininsulinforløper oppløst i 20 ml 0,1 M NaHCO₃-buffer, pH 9,0, ble det tilsatt 4 ml av gelen som bærer den immobiliserte *A. lyticus*-protease. Etter at gelen var blitt
 15 holdt i suspensjon i reaksjonsblandingen i 6 timer ved romtemperatur, var hydrolysen fullstendig, hvorved man fikk Glu(GluAla)₃-Arg-B(1-29), ThrArg-A(1-21)-humaninsulin (reaksjonen ble etterfulgt av reversfase-HPLC). Etter hydrolysen ble gelen fjernet ved filtrering. Til filtratet ble det til-
 20 satt 5 ml etanol og 15 µl 1 M ZnCl₂, og pH-verdien ble regulert til 5,0 under anvendelse av HCl. Utfellingen av produktet var fullstendig etter at det hadde stått over natten ved 4 °C med forsiktig omrøring. Produktet ble isolert ved sentrifugering. Etter én vasking med 1 ml iskald 20% etanol og tørking under
 25 vakuum var utbyttet 190 mg.

d. Syntese av N^α1, N^α81, N^ε829-tridodekanoyl-Glu(GluAla)₃Arg-B(1-29), Thr-Arg-A(1-21)-humaninsulin under anvendelse av dodekansyre-N-hydroksysuccinimidester

30 190 mg (30 µmol) Glu(GluAla)₃Arg-B(1-29), ThrArg-A(1-21)-insulin ble oppløst i 1 ml DMSO og 1,05 ml av en 0,572 M oppløsning av N,N-diisopropyletylamin i DMF. Oppløsningen ble avkjølt til 15 °C, og 36 mg (120 µl) dodekansyre-N-hydroksysuccinimidester oppløst i 0,6 ml DMSO, ble tilsatt. Reaksjonen
 35 var fullført innen 24 timer. Den lipofile tittelforbindelse ble ikke isolert.

e. Syntese av N⁶²⁹-dodekanoyl-des(B30)-insulin

Produktet fra det tidligere trinn, d., inneholdt i ca. 2,65 ml DMSO/DMF/N,N-diisopropyletylamin, ble fortynnet med 10,6 ml av en 50 mM glysinbuffer omfattende 20% etanol, og pH-verdien ble regulert til 10 med NaOH. Etter å ha stått i 1 time ved romtemperatur, ble det tilsatt 1 ml "MiniLeak"-gel med 1 mg immobilisert trypsin pr. ml gel. Reaksjonsblandingen ble forsiktig omrørt i 48 timer ved romtemperatur. For å isolere det ønskede produkt ble reaksjonsblandingen ført til en reversfase-HPLC-kolonne (5 cm i diameter, 30 cm høy), pakket med oktadecyldimetylsilylsubstituerte silikapartikler (gjennomsnittlig partikkelstørrelse 15 µm, porestørrelse 100 Å). For elueringen ble det brukt 20 mM Tris/HCl-buffere, regulert til pH 7,7 og omfattende en økende konsentrasjon av etanol, fra 40 til 44 volum%, ved en hastighet på 2 000 ml/time. Hovedtoppen som eluerte ved ca. 43-44% etanol, inneholdt tittelforbindelsen. Fraksjonene som inneholdt hovedtoppen, ble slått sammen, vann ble tilsatt for å redusere etanolkonsentrasjonen til 20 volum%, og pH-verdien ble regulert til 5,5. Opp-
 løsningen fikk stå over natten ved -20 °C, hvorved produktet utfeltes. Utfellingen ble isolert ved sentrifugering ved -8 °C og tørket under vakuum. Utbyttet av tittelforbindelsen var 90 mg.

Molekylvekt, funnet ved MS: 5892, teori: 5890.

Eksempel 15

Syntese av N⁶²⁹-(N-myristoyl-α-glutamyl)-humaninsulin

500 mg (A1,B1)-diBoc-humaninsulin ble oppløst i 2,5 ml DMSO, og 428 µl etyldiisopropylamin fortynnet med 2,5 ml DMSO/DMF i volumforholdet 1:1, ble tilsatt. Temperaturen ble regulert til 15 °C, og 85 mg N-myristoyl-Glu(OBut)-N-hydroksysuccinimidester oppløst i 2,5 ml DMSO/DMF i volumforholdet 1:1, ble tilsatt. Etter 30 minutter ble reaksjonsblandingen helt over i 60 ml vann, pH ble regulert til 5 og utfellingen isolert ved sentrifugering. Utfellingen ble tørket under vakuum. Den tørkede reaksjonsblanding ble oppløst i 25 ml TFA, og oppløsningen fikk stå i 30 minutter ved romtemperatur. TFA ble fjernet ved fordamping under vakuum. Den gelaktige rest ble oppløst i 60 ml vann og pH regulert til

11,2 under anvendelse av konsentrert ammoniakk. Tittelforbindelsen ble krystallisert ved denne oppløsningen ved regulering av pH-verdien til 8,5 under anvendelse av 6 N HCl. Produktet ble isolert ved sentrifugering, vasket én gang med 10 ml vann og tørket under vakuum. Utbytte 356 mg. Renhet ved HPLC 94%.

Produktet ifølge dette eksemplet er således humaninsulin hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en substituent med den følgende formel: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CO}-$.

Molekylvekt, funnet ved MS: 6146, teori: 6148.

10

Eksempel 16

Syntese av N^{B29}-undekanoyl-des(B30)-humaninsulin

Tittelforbindelsen ble syntetisert analogt med N^{B29}-dodekanoyl-des(B30)-humaninsulin som beskrevet i eksempel 14 ved å anvende undekansyre-N-hydroksysuccinimidester i stedet for dodekansyre-N-hydroksysuccinimidester.

Produktets molekylvekt funnet ved MS: 5876, teori: 5876.

20 Eksempel 17

Syntese av N^{B29}-tridekanoyl-des(B30)-humaninsulin

Tittelforbindelsen ble syntetisert analogt med N^{B29}-dodekanoyl-des(B30)-humaninsulin som beskrevet i eksempel 14, ved å anvende tridekansyre-N-hydroksysuccinimidester i stedet for dodekansyre-N-hydroksysuccinimidester.

Produktets molekylvekt funnet ved MS: 5899, teori: 5904.

Eksempel 18

30 Syntese av N^{B29}-myristoyl-des(B30)-humaninsulin

Tittelforbindelsen ble syntetisert analogt med N^{B29}-dodekanoyl-des(B30)-humaninsulin som beskrevet i eksempel 14, ved å anvende myristinsyre-N-hydroksysuccinimidester i stedet for dodekansyre-N-hydroksysuccinimidester.

35 Produktets molekylvekt funnet ved MS: 5923, teori: 5918.

Eksempel 19Syntese av N^{εB29}-palmitoyl-des(B30)-humaninsulin

Tittelforbindelsen ble syntetisert analogt med N^{εB29}-dodekanoyl-des(B30)-humaninsulin som beskrevet i eksempel 14, ved å anvende palmitinsyre-N-hydroksysuccinimidester i stedet for dodekansyre-N-hydroksysuccinimidester.

Produktets molekylvekt funnet ved MS: 5944, teori: 5946.

10 Eksempel 20Syntese av N^{εB29}-suberoyl-D-tyroksin-humaninsulina. Fremstilling av N-(succinimidylsuberoyl)-D-tyroksin

Disuccinimidylsuberat (1,0 g, Pierce) ble oppløst i DMF (50 ml), og D-tyroksin (2,0 g, Aldrich) ble tilsatt med omrøring ved 20 °C. Tyroksinet oppløstes sakte, og etter 20 timer ble oppløsningsmidlet fjernet ved fordamping under vakuum. Oljeresten ble krystallisert fra 2-propanol, hvorved man fikk 0,6 g N-(succinimidylsuberoyl)-D-tyroksin, smp. 128-133 °C.

b. Omsetning av (A1,B1)-diBoc-humaninsulin med N-(succinimidylsuberoyl)-D-tyroksin

(A1,B1)-diBoc-humaninsulin (200 mg) ble oppløst i tørt DMF (10 ml) ved tilsetning av trietylamin (20 µl) ved romtemperatur. Så ble N-(succinimidylsuberoyl)-D-tyroksin (80 mg) tilsatt. Reaksjonen ble overvåket ved hjelp av reversfase-HPLC, og da reaksjonen var omtrent 90% fullført, ble oppløsningsmidlet fjernet under vakuum. Til inndampingsresten ble det tilsatt vannfri trifluoreddiksyre (5 ml), og oppløsningen ble holdt i 1 time ved romtemperatur. Etter fjerning av trifluoreddiksyren i vakuum ble resten oppløst i en blanding av 1 M eddiksyre (5 ml) og acetonitril (1,5 ml), rensset ved preparativ reversfase-HPLC og avsaltet på en PD-10-kolonne. Utbyttet av N^{εB29}-suberoyl-D-tyroksin-humaninsulin var 50 mg.

Produktet fra dette eksemplet er således humaninsulin hvor ε-aminogruppen i Lys^{B29} har en substituent med den følgende formel: tyroks-CO(CH₂)₆CO-, hvor tyroks er tyroksin som er bundet til oktandisyreresten via en amidbinding til dets α-

aminogruppe.

Produktets molekylvekt funnet ved MS: 6724, teori: 6723.

5 Eksempel 21

Syntese av N⁸²⁹-(2-succinylamido)myristinsyre-humaninsulin

a. Fremstilling av α -aminomyristinsyre-metylester·HCl

Til metanol (5 ml, Merck) ved -10 °C ble tionylklorid (0,2 ml, Aldrich) dråpevis tilsatt mens det ble kraftig omrørt. Så ble det tilsatt α -aminomyristinsyre (0,7 g, fremstilt fra α -bromsyren ved omsetning med ammoniakk). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur og så inndampet til tørrhet. Råproduktet (0,7 g) ble brukt direkte i trinn b.

15

b. Fremstilling av N-succinoyl- α -aminomyristinsyre-metylester

α -aminomyristinsyre-metylester·HCl (0,7 g) ble oppløst i kloroform (25 ml, Merck). Trietylamin (0,35 ml, Fluka) ble tilsatt, etterfulgt av ravsyreanhydrid (0,3 g, Fluka). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer, konsentrert til tørrhet og resten rekrystallisert fra etylacetat og petroleter i forholdet 1:1. Utbytte: 0,8 g.

c. Fremstilling av N-(succinimidylsuccinoyl)- α -aminomyristinsyre-metylester

N-succinoyl- α -aminomyristinsyre-metylester (0,8 g) ble oppløst i tørt DMF (10 ml, Merck, tørket over 4Å molekylsikt). Tørt pyridin (80 μ l, Merck) og di(N-succinimidyl)karbonat (1,8 g, Fluka) ble tilsatt, og reaksjonsblandingen ble omrørt over natten ved romtemperatur. Inndampingsresten ble rensert ved hurtigkromatografi på silikagel 60 (Merck) og ble rekrystallisert fra 2-propanol/petroleter (1:1). Utbytte av N-(succinimidylsuccinoyl)- α -aminomyristinsyre-metylester: 0,13 g, smp. 64-66 °C.

35

d. Omsetning av (A1,B1)-diBoc-humaninsulin med N-(succinimidylsuccinoyl)- α -aminomyristinsyre-metylester

Reaksjonen ble utført som i eksempel 20 b., men under anvendelse av N-(succinimidylsuccinoyl)- α -aminomyristinsyre-

metylester (16 mg) i stedet for N-(succinimidylsuberoyl)-D-tyroksin. Etter fjerning av trifluoreddiksyren under vakuum ble inndampingsresten behandlet med 0,1 M natriumhydroksid ved 0 °C for å forsåpe metylesteren. Etter at forsåpningen var

5 bedømt til å være fullstendig ved hjelp av reversfase-HPLC, ble pH-verdien i oppløsningen regulert til 3, og oppløsningen ble lyofilisert. Etter rensing ved hjelp av preparativ reversfase-HPLC og avsalting på en PD-10-kolonne, var utbyttet av N^{εB29}-(2-succinylamido)myristinsyre-humaninsulin 39 mg.

10 Produktet fra dette eksemplet er således humaninsulin hvor ε-aminogruppen i Lys^{B29} har en substituent med den følgende formel: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{COOH})\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$.

Produktets molekylvekt funnet ved MS: 6130, teori: 6133.

15

Eksempel 22

Syntese av N^{εB29}-oktyloksykarbonyl-humaninsulin

Syntesen ble utført som i eksempel 20 b., men under anvendelse av n-oktyloksykarbonyl-N-hydroksysuccinimid (9 mg, 20 fremstilt fra n-oktylchlorformiat (Aldrich) og N-hydroksysuccinimid), i stedet for N-(succinimidylsuberoyl)-D-tyroksin. Utbyttet av N^{εB29}-oktyloksykarbonyl-humaninsulin var 86 mg.

Produktet fra dette eksemplet er således humaninsulin hvor ε-aminogruppen i Lys^{B29} har en substituent med den følgende 25 ende formel: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OCO}-$.

Produktets molekylvekt funnet ved MS: 5960, teori: 5964.

Eksempel 23

30 Syntese av N^{εB29}-(2-succinylamido)palmitinsyre-humaninsulin

a. Fremstilling av N-(succinimidylsuccinoyl)-α-aminopalmitinsyre-metylester

Denne forbindelsen ble fremstilt som beskrevet i eksempel 21 a.-c., under anvendelse av α-aminopalmitinsyre i 35 stedet for α-aminomyristinsyre.

b. Omsetning av (Al,B1)-diBoc-humaninsulin med N-(succinimidylsuccinoyl)- α -aminopalmitinsyre-metylester

Reaksjonen ble utført som i eksempel 21 d., men under anvendelse av N-(succinimidylsuccinoyl)- α -aminopalmitinsyre-metylester i stedet for N-(succinimidylsuccinoyl)- α -aminopalmitinsyre-metylester, hvorved man fikk N^{B29}-(2-succinylamido)-palmitinsyre-humaninsulin.

Produktet fra dette eksemplet er således humaninsulin hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en substituent med den følgende formel: CH₃(CH₂)₁₃CH(COOH)NHCOCH₂CH₂CO-.,

Eksempel 24

Syntese av N^{B29}-(2-succinylamidoetyloksy)palmitinsyre-humaninsulin

a. Fremstilling av N-(succinimidylsuccinoyl)-2-aminoetyloksypalmitinsyre-metylester

Denne forbindelsen ble fremstilt som beskrevet i eksempel 21 a.-c., men under anvendelse av 2-aminoetyloksypalmitinsyre (syntetisert ved hjelp av den generelle fremgangsmåte beskrevet av R. TenBrink, J. Org. Chem., 52 (1987), 418-422) i stedet for α -aminomyristinsyre.

b. Omsetning av (Al,B1)-diBoc-humaninsulin med N-(succinimidylsuccinoyl)-2-aminoetyloksypalmitinsyre-metylester

Omsetningen ble utført som i eksempel 21 d., men under anvendelse av N-(succinimidylsuccinoyl)-2-aminoetyloksypalmitinsyre-metylester i stedet for N-(succinimidylsuccinoyl)- α -aminomyristinsyre-metylester, hvorved man fikk N^{B29}-(2-succinylamidoetyloksy)palmitinsyre-humaninsulin.

Produktet fra dette eksemplet er således humaninsulin hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en substituent med den følgende formel: CH₃(CH₂)₁₃CH(COOH)NHCH₂CH₂OCOCH₂CH₂CO-.

Eksempel 25

Syntese av N^{B29}-litocholoyl- α -glutamyl-des(B30)-humaninsulin

Syntesen ble utført som i eksempel 13, men under anvendelse av N-litocholoyl-L-glutaminsyre- α -N-hydroksysuccin-

imidester, γ -tert.-butylester i stedet for dekansyre-N-hydroksysuccinimidester.

Produktet fra dette eksemplet er således des(B30)-humaninsulin hvor ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en substituent
 5 med den følgende formel: litocholoyl-NHCH(CH₂CH₂COOH)CO-.

Produktets molekylvekt funnet ved MS: 6194, teori: 6193.

Eksempel 26

10 Syntese av N^{εB29}-3,3',5,5'-tetraiodtyroacetyl-humaninsulin

Syntesen ble utført som i eksempel 10, men under anvendelse av 3,3',5,5'-tetraiodtyroeddiksyre-N-hydroksysuccinimidester i stedet for dekansyre-N-hydroksysuccinimidester.

Produktets molekylvekt funnet ved MS: 6536, teori:
 15 6538.

Eksempel 27

Syntese av N^{εB29}-L-tyroksyl-humaninsulin

Syntesen ble utført som i eksempel 10, men under anvendelse av Boc-L-tyroksin-N-hydroksysuccinimidester i stedet
 20 for dekansyre-N-hydroksysuccinimidester.

Produktets molekylvekt funnet ved MS: 6572, teori: 6567.

25 Eksempel 28

Farmasøytisk preparat som omfatter 600 nmol/ml N^{εB29}-dekanoyl-des(B30)-humaninsulin·1/3 Zn²⁺ i oppløsning

N^{εB29}-dekanoyl-des(B30)-humaninsulin (1,2 μ mol) ble oppløst i vann (0,8 ml), og pH-verdien ble regulert til 7,5
 30 ved tilsetning av 0,2 M natriumhydroksid. 0,01 M sinkacetat (60 μ l) og en oppløsning inneholdende 0,75% fenol og 4% glyserol (0,8 ml), ble tilsatt. pH-verdien i oppløsningen ble regulert til 7,5 under anvendelse av 0,2 M natriumhydroksid, og volumet av oppløsningen ble regulert til 2 ml med vann.

35 Den resulterende oppløsning ble sterilisert ved filtrering og overført aseptisk til en patron eller en ampulle.

Eksempel 29Farmasøytisk preparat omfattende 600 nmol/ml N^{B29}-dekanoyl-humaninsulin 1/2 Zn²⁺ i oppløsning

1,2 µmol av tittelforbindelsen ble oppløst i vann
 5 (0,8 ml), og pH-verdien ble regulert til 7,5 ved tilsetning av
 0,2 M natriumhydroksid. En oppløsning inneholdende 0,75% fenol
 og 1,75% natriumklorid (0,8 ml) ble tilsatt. pH-verdien i opp-
 løsningen ble regulert til 7,5 under anvendelse av 0,2 M
 natriumhydroksid, og volumet av oppløsningen ble regulert til
 10 2 ml med vann.

Den resulterende oppløsning ble sterilisert ved fil-
 trering og overført aseptisk til en patron eller en ampulle.

Eksempel 30

15 Farmasøytisk preparat som omfatter 60 nmol/ml N^{B29}-litocholoyl-
humaninsulin i oppløsning

1,2 µmol av tittelforbindelsen ble oppslemmet i vann
 (0,8 ml) og oppløst ved å regulere pH-verdien i oppløsningen
 til 8,5 under anvendelse av 0,2 M natriumhydroksid. Til opp-
 20 løsningen ble det så tilsatt 0,8 ml av en standardoppløsning
 inneholdende 0,75% kresol og 4% glyserol i vann. Til sist ble
 pH-verdien på nytt regulert til 8,5, og volumet av oppløsnin-
 gen ble regulert til 2 ml med vann.

Den resulterende oppløsning ble sterilisert ved fil-
 25 trering og overført aseptisk til en patron eller en ampulle.

SEKVENSLISTE

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 1:

5 (i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 21 aminosyrer

(B) Type: aminosyre

(D) Topologi: lineær

10 (ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 1:

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Xaa
 20

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 2:

20

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 30 aminosyrer

(B) Type: aminosyre

(D) Topologi: lineær

25

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 2:

Xaa Val Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Xaa
 20 25 30

35 (2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 3:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 110 basepar

(B) Type: nukleinsyre

- (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

5

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 3:

	TGGCTAAGAG ATTCGTTGAC CAACACTTGT GCGGTTCTCA CTTGGTTGAA GCTTTGTACT	60
10	TGGTTTGTGG TGAAAGAGGT TTCTTCTACA CTCCAAAGTC TGACGACGCT	110

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 4:

15

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 100 basepar
- (B) Type: nukleinsyre
- (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

20

(ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 4:

25	CTGCGGGCTG CGTCTAAGCA CAGTAGTTTT CCAATTGGTA CAAAGAACAG ATAGAAGTAC	60
	AACATTGTTC AACGATACCC TTAGCGTCGT CAGACTTTGG	100

30 (2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 5:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 25 basepar
- (B) Type: nukleinsyre
- (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

35

(ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 5:

GTCGCCATGG CTAAGAGATT CGTTG

25

5

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 6:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 27 basepar

10 (B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

15

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 6:

CTGCTCTAGA GCCTGCGGGC TCGTCT

27

20

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 7:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 110 basepar

25 (B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

30

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 7:

TGGCTAAGAG ATTCGTTACT CAACACTTGT GCGGTCTCA CTTGGTTGAA GCTTTGTACT

60

TGGTTTGTGG TGAAAGAGGT TTCTTCTACA CTCCAAAGTC TGACGACGCT

110

35

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 8:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 25 basepar

5 (B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

10

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 8:

GTCGCCATGG CTAAGAGATT CGTTA

25

15

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 9:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 100 basepar

20 (B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

25

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 9:

CTGCGGGCTG CGTCTAACCA CAGTAGTTTT CCAATTGGTA CAAAGAACAG ATAGAAGTAC

60

AACATTGTTT AACGATACCC TTAGCGTCGT CAGACTTTGG

100

30

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 10:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 27 basepar

(B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

35

(ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 10:

5 ACGTACGTTT TAGAGCCTGC GGGCTGC

27

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 11:

10 (i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 78 basepar

(B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

15

(ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 11:

20 CACTTGGTTG AAGCTTTGTA CTGGTTTGT GGTGAAAGAG GTTCTTCTA CACTCCAAAG

60

ACTAGAGGTA TCGTTGAA

78

25 (2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 12:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 63 basepar

(B) Type: nukleinsyre

30 (C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

35 (xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 12:

GCTAACGTCG CCATGGCTAA GAGAGAAGAA GCTGAAGCTG AAGCTAGATT CGTTAACCAA

60

CAC

63

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 13:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 65 basepar
- (B) Type: nukleinsyre
- (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 13:

GCTAACGTCG CCATGGCTAA GAGAGAAGAA GCTGAAGCGA AGCTGAAAGA TTCGTAAACC 60

AACAC 65

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 14:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 415 basepar
- (B) Type: nukleinsyre
- (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

(ix) Særtrekk:

- (A) Navn/nøkkel: CDS
- (B) Lokalisering: 80..391

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 14:

ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC AAACATCAA TTTCATACAC 60

AATATAAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG TCC TTG ATC 112
Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile
1 5 10

	GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT GTT GAG	160
	Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu	
	15 20 25	
5	ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG GCT AAC	208
	Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn	
	30 35 40	
	GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCT CAC	256
	Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His	
	45 50 55	
10	TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC TTC TAC	304
	Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr	
	60 65 70 75	
	ACT CCA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT ACT	352
	Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr	
	80 85 90	
15	TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT AAC TAGACGCAGC	401
	Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	
	95 100	
	CCGCAGGCTC TAGA	415

20

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 15:

- 25 (i) Sekvenskarakteristika:
- (A) Lengde: 104 aminosyrer
 - (B) Type: aminosyre
 - (D) Topologi: lineær

- 30 (ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 15:

	Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala	
35	1 5 10 15	
	Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser	
	20 25 30	
	Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn Val Ala Met Ala Lys	
	35 40 45	

Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
 50 55 60
 Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp
 5 65 70 75 80
 Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu
 85 90 95
 Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100

10

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 16:

- (i) Sekvenskarakteristika:
- 15 (A) Lengde: 415 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær

20 (ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 16:

TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG TTTGATAGTT AAAGTATGTG 60
 25 TTATATTTGC TGGTTTTCTT ACTICCGACA AAAGAACCAA AACAGG/ACT AGCCTAAGAC 120
 GACCCGGGTT GGTCASTGAC CGCTACTTAG TAGACAACTC TAAGGCCTTC TCAGAGACTA 180
 GTAGCGACTT TTGTGGTGAA ACCGATTGCA GCGGTACCGA TTCTCTAAGC AATTGGTTGT 240
 GAACACGCCA AGAGTGAACC AACTTCGAAA CATGAACCAA ACACCACTTT CTCCAAAGAA 300
 30 GATGTGAGGT TTCAGACTGC TCGATTCCC ATAGCAACTT GTTACAACAT GAAGATAGAC 360
 AAGAAACATG GTTAACCTTT TGATGACATT GATCTGCGTC GGGCGTCCGA GATCT 415

35

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 17:

- (i) Sekvenskarakteristika:
- (A) Lengde: 523 basepar

(B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

5 (ii) Molekyltype: cDNA

(ix) Særtrekk:

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 80..499

10

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 17:

	ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC AAACATATCAA TTTCATACAC	60
15	AATATAAACG ATTAAGAAG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT TTA Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu 1 5 10	112
	TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu 15 20 25	160
20	GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp 30 35 40	208
	TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr 45 50 55	256
25	AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala 60 65 70 75	304
	AAA GAA GAA GGG GTA TCT TTG GAT AAG AGA GAA GTT AAC CAA CAC TTG Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Asp Lys Arg Glu Val Asn Gln His Leu 80 85 90	352
30	TGC GGT TCT CAC TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg 95 100 105	400
	GGT TTC TTC TAC ACT GAA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC GTT GAA Gly Phe Phe Tyr Thr Glu Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu 110 115 120	448

CAA TGT TGT ACT TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT 496
 Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
 125 130 135

AAC TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA 523
 5 Asn
 140

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 18:

10 (i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 140 aminosyrer
- (B) Type: aminosyre
- (D) Topologi: lineær

15 (ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 18:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 20 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 25 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 30 Ser Leu Asp Lys Arg Glu Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
 85 90 95
 Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
 100 105 110
 Glu Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
 115 120 125
 35 Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 130 135 140

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 19:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 523 basepar

5 (B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

10

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 19:

TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG TTTGATAGTT AAAGTATGTG 60
 TTATATTTGC TAATTTTCTT ACTCTAAAGG AAGTTAAAAA TGACGTCAAA ATAAGCGTCG 120
 15 TAGGAGGCGT AATCGACGAG GTCAGTTGTG ATGTTGTCTT CTACTTTGCC GTGTTTAAGG 180
 CCGACTTCGA CAGTAGCCAA TGAGTCTAAA TCTTCCCCTA AAGCTACAAC GACAAAACGG 240
 TAAAAGGTTG TCGTGTTTAT TGCCCAATAA CAAATATTTA TGATGATAAC GGTCGTAACG 300
 20 ACGATTTCTT CTTCCCCATA GAAACCTATT CTCTCTTCAA TTGGTTGTGA ACACGCCAAG 360
 AGTGAACCAA CTTGAAACA TGAACCAAAC ACCACTTTCT CCAAAGAAGA TGTGACTTTT 420
 CAGACTGCTG CGATTCCCAT AGCAACTTGT TACAACATGA AGATAGACAA GAAACATGGT 480
 TAACCTTTTG ATGACATTGA TCTGCGTCGG GCGTCCGAGA TCT 523

25

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 20:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 415 basepar

(B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

35

(ii) Molekyltype: cDNA

(ix) Særtrekk:

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 80..391

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 20:

5	ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC AAACATCAA TTTCATACAC	60
	AATATAAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG TCC TTG ATC	112
	Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile	
	1 5 10	
10	GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT GTT GAG	160
	Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu	
	15 20 25	
	ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG GCT AAC	208
	Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn	
	30 35 40	
15	GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT GAC CAA CAC TTG TGC GGT TCT CAC	256
	Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His	
	45 50 55	
	TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC TTC TAC	304
	Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr	
	60 65 70 75	
20	ACT CCA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT ACT	352
	Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr	
	80 85 90	
	TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT GCT TAGACGCAGC	401
	Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Ala	
	95 100	
25	CCGCAGGCTC TAGA	415

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 21:

30

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 104 aminosyrer
- (B) Type: aminosyre
- (D) Topologi: lineær

35

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 21:

```

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala
 1          5          10          15
5  Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser
    20          25          30
    Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn Val Ala Met Ala Lys
    35          40          45
10 Arg Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
    50          55          60
    Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp
    65          70          75          80
    Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu
    85          90          95
15 Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Ala
    100

```

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 22:

20

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 415 basepar

(B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

25

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 22:

30

```

TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG TTGATAGTT AAAGTATGTG      60
TTATATTTGC TGGTTTTCTT ACTTCCGACA AAAGAACCAA AACAGGAACT AGCCTAAGAC      120
GACCCGGGTT GGTCAAGTAC CGCTACTTAG TAGACAACCTC TAAGGCCTTC TCAGAGACTA      180
35 GTAGCGACTT TTGTGGTGAA ACCGATTGCA GCGGTACCGA TTCTCTAAGC AACTGGTTGT      240
GAACACGCCA AGAGTGAACC AACTTCGAAA CATGAACCAA ACACCACTTT CTCCAAAGAA      300
GATGTGAGGT TTCAGACTGC TGCATTCCC ATAGCAACTT GTTACAACAT GAAGATAGAC      360
AAGAAACATG GTTAACCTTT TGATGACACG AATCTGCGTC GGGCGTCCGA GATCT          415

```

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 23:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 415 basepar

(B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

(ix) Særtrekk:

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 80..391

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 23:

	ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC AAACATCAA TTTCATACAC	60
	AATATAAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG TCC TTG ATC	112
	Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile	
	1 5 10	
	GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT GTT GAG	160
	Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu	
	15 20 25	
	ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG GCT AAC	208
	Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn	
	30 35 40	
	GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT ACT CAA CAC TTG TGC GGT TCT CAC	256
	Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Thr Gln His Leu Cys Gly Ser His	
	45 50 55	
	TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC TTC TAC	304
	Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr	
	60 65 70 75	
	ACT CCA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT ACT	352
	Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr	
	80 85 90	
	TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT GCT TAGACGCAGC	401
	Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Ala	
	95 100	
	CCGCAGGCTC TAGA	415

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 24:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 104 aminosyrer
 (B) Type: aminosyre
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 24:

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala
 1 5 10 15

Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser
 20 25 30

Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn Val Ala Met Ala Lys
 35 40 45

Arg Phe Val Thr Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
 50 55 60

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp
 65 70 75 80

Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu
 85 90 95

Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Ala
 100

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 25:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 415 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 25:

```

TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG TTTGATAGTT AAAGTATGTG      60
TTATATTTGC TGGTTTTCTT ACTTCCGACA AAAGAACCAA AACAGGAACT AGCCTAAGAC      120
5  GACCCGGGTT GGTCAAGTAC CGCTACTTAG TAGACAACCTC TAAGGCCTTC TCAGAGACTA      180
GTAGCGACTT TTGTGGTGAA ACCGATTGCA GCGGTACCGA TTCTCTAAGC AATGAGTTGT      240
GAACACGCCA AGAGTGAACC AACTTCGAAA CATGAACCAA ACACCACTTT CTCCAAAGAA      300
10 GATGTGAGGT TTCAGACTGC TGCGATTCCC ATAGCAACTT GTTACAACAT GAAGATAGAC      360
AAGAAACATG GTTAACCTTT TGATGACACG AATCTGCGTC GGGCGTCCGA GATCT          415

```

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 26:

15

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 415 basepar

(B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

20

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

(ix) Særtrekk:

25

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 80..391

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 26:

```

30 ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC AAACATCAA TTTCATACAC      60
AATATAAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG TCC TTG ATC      112
      Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile
      1          5          10
35 GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT GTT GAG      160
      Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu
      15          20          25
ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG GCT AAC      208
      Ile Pro Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn
      30          35          40

```

	GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT GAC CAA CAC TTG TGC GGT TCT CAC	256
	Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His	
	45 50 55	
5	TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC TTC TAC	304
	Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr	
	60 65 70 75	
	ACT CCA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT ACT	352
	Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr	
	80 85 90	
10	TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT GGT TAGACGCAGC	401
	Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly	
	95 100	
	CCGCAGGCTC TAGA	415

15

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 27:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 104 aminosyrer
- (B) Type: aminosyre
- (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

25 (xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 27:

	Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala	
	1 5 10 15	
30	Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser	
	20 25 30	
	Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn Val Ala Met Ala Lys	
	35 40 45	
	Arg Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu	
	50 55 60	
35	Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp	
	65 70 75 80	
	Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu	
	85 90 95	
	Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly	
	100	

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 28:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 415 basepar
- 5 (B) Type: nukleinsyre
- (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

10

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 28:

	TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG TTTGATAGTT AAAGTATGTG	60
	TTATATTTGC TGGTTTTCTT ACTTCCGACA AAAGAACCAA AACAGGAACT AGCCTAAGAC	120
15	GACCCGGGTT GGTCAGTGAC CGCTACTTAG TAGACAAC TC TAAGGCCCTC TCAGAGACTA	180
	GTAGCGACTT TTGTGGTGAA ACCGATTGCA GCGGTACCGA TTCTCTAAGC AACTGGTTGT	240
	GAACACGCCA AGAGTGAACC AACTTCGAAA CATGAACCAA ACACCACITT CTCCAAAGAA	300
20	GATGTGAGGT TTCAGACTGC TCGGATTCCC ATAGCAACTT GTTACAACAT GAAGATAGAC	360
	AAGAAACATG GTTAACCTTT TGATGACACC AATCTGCGTC GGGCGTCCGA GATCT	415

25 (2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 29:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 415 basepar
- (B) Type: nukleinsyre
- 30 (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

35 (ix) Særtrekk:

- (A) Navn/nøkkel: CDS
- (B) Lokalisering: 80..391

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 29:

	ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC AAACATCAA TTTCATACAC	60
	AATATAAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG TCC TTG ATC	112
5	Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile	
	1 5 10	
	GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT GTT GAG	160
	Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu	
	15 20 25	
	ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG GCT AAC	208
10	Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn	
	30 35 40	
	GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT ACT CAA CAC TTG TGC GGT TCT CAC	256
	Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Thr Gln His Leu Cys Gly Ser His	
	45 50 55	
	TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC TTC TAC	304
15	Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr	
	60 65 70 75	
	ACT CCA AAG TCT GAC GAC GCT AAG GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT ACT	352
	Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr	
	80 85 90	
	TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT GGT TAGACGCAGC	401
20	Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly	
	95 100	
	CCGCAGGCTC TAGA	415

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 30:

25

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 104 aminosyrer

(B) Type: aminosyre

(D) Topologi: lineær

30

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 30:

35	Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala	
	1 5 10 15	
	Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser	
	20 25 30	

Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn Val Ala Met Ala Lys
 35 40 45

5 Arg Phe Val Thr Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
 50 55 60

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp
 65 70 75 80

Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu
 85 90 95

10 Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly
 100

15 (2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 31:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 415 basepar

(B) Type: nukleinsyre

20 (C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

25 (xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 31:

	TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG TTTGATAGTT AAAGTATGTG	60
	TTATATTTGC TGGTTTTCTT ACTTCCGACA AAAGAACCAA AACAGGAACT AGCCTAAGAC	120
30	GACCCGGGTT GGTCA GTGAC CGCTACTTAG TAGACA ACTC TAAGGCCTTC TCAGAGACTA	180
	G TAGCGACTT TTGTGGTGAA ACCGATTGCA GCGGTACCGA TTCTCTAAGC AATGAGTTGT	240
	GAACACGCCA AGAGTGAACC AACTTCGAAA CATGAACCAA ACACCACTTT CTCCAAAGAA	300
	GATGTGAGGT TTCAGACTGC TCGGATTCCC ATAGCAACTT GTTACAACAT GAAGATAGAC	360
35	AAGAAACATG GTTAACCTTT TGATGACACC AATCTGCGTC GGGCGTCCGA GATCT	415

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 32:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 523 basepar

5 (B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

10

(ix) Særtrekk:

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 80..499

15

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 32:

	ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC AAACATATCAA TTTCATACAC	60
	AATATAAACG ATTAAGAAGA ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT TTA	112
	Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu	
20	1 5 10	
	TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA	160
	Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu	
	15 20 25	
	GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT	208
25	Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp	
	30 35 40	
	TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA	256
	Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr	
	45 50 55	
	AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT	304
30	Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala	
	60 65 70 75	
	AAA GAA GAA GGG GTA TCT TTG GAT AAG AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG	352
	Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Asp Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu	
	80 85 90	
	TGC CGT TCT CAC TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA	400
35	Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg	
	95 100 105	

(1) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 140 aminosyrer
(B) Type: aminosyre
(D) Topologi: linear

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 33:

Met	Arg	Phe	Pro	Ser	Ile	Phe	Thr	Ala	Val	Leu	Phe	Ala	Ala	Ser	Ser
1				5					10					15	
Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Val	Asn	Thr	Thr	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Ala	Gln
			20					25					30		
Ile	Pro	Ala	Glu	Ala	Val	Ile	Gly	Tyr	Ser	Asp	Leu	Glu	Gly	Asp	Phe
		35					40					45			
Asp	Val	Ala	Val	Leu	Pro	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Asn	Gly	Leu	Leu
	50					55					60				
Phe	Ile	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Gly	Val
65					70					75					80
Ser	Leu	Asp	Lys	Arg	Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu
				85					90					95	
Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr
			100					105					110		

Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
 115 120 125
 Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 130 135 140

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 34:

(i) Sekvenskarakteristika:

- 10 (A) Lengde: 523 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær

15 (ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 34:

	TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG TTTGATAGTT AAAGTATGTG	60
20	TTATATTTGC TAATTTTCTT ACTCTAAAGG AAGTTAAAAA TGACGTCAAA ATAAGCGTCG	120
	TAGGAGGCGT AATCGACGAG GTCAGTTGTG ATGTTGTCTT CTACTTTGCC GTGTTTAAGG	180
	CCGACTTCGA CAGTAGCCAA TGAGTCTAAA TCTTCCCCTA AAGCTACAAC GACAAAACGG	240
	TAAAAGGTTG TCGTGTTTAT TGCCCAATAA CAAATATTTA TGATGATAAC GGTCGTAACG	300
25	ACGATTTCTT CTCCCCATA GAAACCTATT CTCTAAGCAA TTGGTTGTGA ACACGCCAAG	360
	AGTGAACCAA CTTCGAAACA TGAACCAAAC ACCACTTTCT CCAAAGAAGA TGTGAGGTTT	420
	CAGACTGCTG CGATTCCCAT AGCAACTTGT TACAACATGA AGATAGACAA GAAACATGGT	480
30	TAACCTTTTG ATGACATTGA TCTGCGTCGG GCGTCCGAGA TCT	523

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 35:

35

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 409 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

5 (ix) Særtrekk:

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 80..385

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 35:

10

ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC AAACATCAA TTTCATACAC 60

AATATAAACG ACCAAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG TCC TTG ATC 112
 Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile
 1 5 10

15 GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT GTT GAG 160
 Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu
 15 20 25

ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG GCT AAC 208
 Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn
 30 35 40

20 GTC GCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCT CAC 256
 Val Ala Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His
 45 50 55

TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC TTC TAC 304
 Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr
 60 65 70 75

25 ACT CCT AAG GAA AAG AGA GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT ACT TCT ATC 352
 Thr Pro Lys Glu Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile
 80 85 90

TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGT GGT TAGACGCAGC CCGCAGGCTC 405
 Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly
 95 100

30

TAGA 409

35 (2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 36:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 102 aminosyrer

(B) Type: aminosyre

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

5 (xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 36:

	Met	Lys	Ala	Val	Phe	Leu	Val	Leu	Ser	Leu	Ile	Gly	Phe	Cys	Trp	Ala
	1				5					10					15	
10	Gln	Pro	Val	Thr	Gly	Asp	Glu	Ser	Ser	Val	Glu	Ile	Pro	Glu	Glu	Ser
				20					25					30		
	Leu	Ile	Ile	Ala	Glu	Asn	Thr	Thr	Leu	Ala	Asn	Val	Ala	Met	Ala	Lys
			35					40					45			
	Arg	Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu
		50					55					60				
15	Tyr	Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Glu	Lys
	65					70					75				80	
	Arg	Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln
					85					90					95	
20	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Gly										
					100											

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 37:

25

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 409 basepar

(B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

30

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 37:

35

TAGCTTAAGG	TAAGTTCTTA	TCAAGTTTGT	TCTTCTAATG	TTTGATAGTT	AAAGTATGTG	60
TTATATTTGC	TGGTTTTCTT	ACTTCCGACA	AAAGAACCAA	AACAGGAACT	AGCCTAAGAC	120
GACCCGGGTT	GGTCAGTGAC	CGCTACTTAG	TAGACAACTC	TAAGGCCTTC	TCAGAGACTA	180

GTAGCGACTT TTGTGGTGAA ACCGATTGCA GCGGTACCGA TTCTCTAAGC AATTGGTTGT 240
 GAACACGCCA AGAGTGAACC AACTTCGAAA CATGAACCAA ACACCACTTT CTCCAAAGAA 300
 5 GATGTGAGGA TTCCTTTTCT CTCCATAGCA ACTTGTTACA ACATGAAGAT AGACAAGAAA 360
 CATGGTTAAC CTTTGTATGA CACCAATCTG CGTCGGGCGT CCGAGATCT 409

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 38:

10

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 511 basepar

(B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

15

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

(ix) Sætrekk:

20

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 77..487

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 38:

25

GAATTCCATT CAAGAATAGT TCAAACAAGA AGATTACAAA CTATCAATTT CATACACAAT 60

ATAAACGATT AAAAGA ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT TTA 109

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu
 1 5 10

30

TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA 157

Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu
 15 20 25

GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT 205

Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp
 30 35 40

35

TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA 253

Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr
 45 50 55

	AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT	301
	Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala	
	60 65 70 75	
5	AAA GAA GAA GGG GTA TCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG	349
	Lys Glu Glu Gly Val Ser Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu	
	80 85 90	
	TGC GGT TCC CAC TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA	397
	Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg	
	95 100 105	
10	GGT TTC TTC TAC ACT CCA AAG ACT AGA GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT	445
	Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys	
	110 115 120	
	ACT TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGC AAC	487
	Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	
	125 130 135	
15	TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA	511

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 39:

20 (i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 137 aminosyrer
- (B) Type: aminosyre
- (D) Topologi: linear

25 (ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 39:

30	Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser	
	1 5 10 15	
	Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln	
	20 25 30	
	Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe	
	35 40 45	
35	Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu	
	50 55 60	
	Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val	
	65 70 75 80	

Ser Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
 85 90 95
 Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
 5 100 105 110
 Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser
 115 120 125
 Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 130 135

10

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 40:

- (i) Sekvenskarakteristika:
- 15 (A) Lengde: 511 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær

20 (ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 40:

CTTAAGGTAA GTTCTTATCA AGTTTGTCT TCTAATGTTT GATAGTTAAA GSTATGTGTTA 60
 25 TATTTGCTAA TTTTCTTACT CTAAAGGAAG TTAAAAATGA CGTCAAATA AGCGTCGTAG 120
 GAGGCGTAAT CGACGAGGTC AGTTGTGATG TTGTCTTCTA CTTTGCCGTG TTTAAGGCCG 180
 ACTTCGACAG TAGCCAATGA GTCTAAATCT TCCCCTAAAG CTACAACGAC AAAACGGTAA 240
 AAGGTTGTCTG TGTATTATGC CCAATAACAA ATATTTATGA TGATAACGGT CGTAACGACG 300
 30 ATTTCTTCTT CCCCATAGGT ACCGATTCTC TAAGCAATTG GTTGTGAACA CGCCAAGGGT 360
 GAACCAACTT CGAAACATGA ACCAAACACC ACTTTCTCCA AAGAAGATGT GAGGTTTCTG 420
 ATCTCCATAG CAACTTGTTA CAACATGAAG ATAGACAAGA AACATGGTTA ACCTTTTGAT 480
 35 GACGTTGATC TCGTCGGGC GTCCGAGATC T 511

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 41:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 523 basepar

5 (B) Type: nukleinsyre

(C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

10

(ix) Særtrekk:

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 80..499

15

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 41:

	ATCGAATTCC ATTCAAGAAT AGTTCAAACA AGAAGATTAC AAACATATCAA TTTCATACAC	60
	AATATAAACG ATTAAGAAGA ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT TTA	112
	Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu	
20	1 5 10	
	TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA	160
	Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu	
	15 20 25	
	GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT	208
25	Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp	
	30 35 40	
	TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA	256
	Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr	
	45 50 55	
	AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT	304
30	Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala	
	60 65 70 75	
	AAA GAA GAA GGG GTA TCC ATG GCT AAG AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG	352
	Lys Glu Glu Gly Val Ser Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu	
	80 85 90	
35	TGC GGT TCC CAC TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGC GGT GAA AGA	400
	Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg	
	95 100 105	

GGT TTC TTC TAC ACT CCT AAG TCT GAC GAT GCT AAG GGT ATT GTC GAG 448
 Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu
 110 115 120

CAA TGC TGT ACC TCC ATC TGC TCC TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGC 496
 Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
 125 130 135

AAC TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA 523
 Asn
 140

10

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 42:

(i) Sekvenskarakteristika:

- 15 (A) Lengde: 140 aminosyrer
 (B) Type: aminosyre
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

20

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 42:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 25 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 30 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Met Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
 85 90 95
 35 Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
 100 105 110

Pro Lys Ser Asp Asp Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
 115 120 125
 Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 130 135 140

5

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 43:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 523 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær

10

(ii) Molekyltype: DNA

15

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 43:

20

TAGCTTAAGG TAAGTTCTTA TCAAGTTTGT TCTTCTAATG TTTGATAGTT AAAGTATGTG	60
TTATATTTGC TAATTTTCTT ACTCTAAAGG AAGTTAAAAA TGACGTCAAA ATAAGCGTCG	120
TAGGAGGCGT AATCGACGAG GTCAGTTGTG ATGTTGTCTT CTACTTTGCC GTGTTTAAGG	180
CCGACTTCGA CAGTAGCCAA TGAGTCTAAA TCTTCCCTA AAGCTACAAC GACAAAACGG	240
TAAAAGGTTG TCGTGTTTAT TGCCCAATAA CAAATATTYA TGATGATAAC GGTCGTAACG	300
ACGATTCTT CTTCCTCCATA GGTACCGATT CTCTAAGCAA TTGGTTGTGA ACACGCCAAG	360
GGTGAACCAA CTTGGAAPCA TGAACCAAAC GCCACTTCT CCAAAGAAGA TGTGAGGATT	420
CAGACTGCTA CGATTCCCAT AACAGCTCGT TACGACATGG AGGTAGACGA GGAACATGdT	480
TAACCTTTTG ATGACGTTGA TCTGCGTCGG GCGTCCGAGA TCT	523

30

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 44:

35

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 535 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

(ix) Særtrekk:

(A) Navn/nøkkel: CDS

5 (B) Lokalisering: 77..511

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 44:

	GAATTCATT CAAGAATAGT TCAAACAAGA AGATTACAAA CTATCAATTT CATACACAAT	60
10	ATAAACGATT AAAAGA ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT TTA Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu 1 5 10	109
	TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu 15 20 25	157
15		
	GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp 30 35 40	205
	TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr 45 50 55	253
20		
	AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala 60 65 70 75	301
	AAA GAA GAA GGG GTA TCC ATG GCT AAG AGA GAA GAA GCT GAA GCT GAA Lys Glu Glu Gly Val Ser Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu 80 85 90	349
25		
	GCT AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCC CAC TTG GTT GAA GCT Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala 95 100 105	397
	TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC TTC TAC ACT CCA AAG ACT Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr 110 115 120	445
30		
	AGA GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT ACT TCT ATC TGT TCT TTG TAC CAA Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln 125 130 135	493
	TTG GAA AAC TAC TGC AAC TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA Leu Glu Asn Tyr Cys Asn 140 145	535
35		

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 45:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 145 aminosyrer

5 (B) Type: aminosyre

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

10 (xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 45:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 15 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Arg Phe Val Asn
 85 90 95
 Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
 25 100 105 110
 Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val Glu
 115 120 125
 Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
 130 135 140
 30 Asn
 145

35 (2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 46:

(i) Sekvenskarakteristika:

(A) Lengde: 535 basepar

(B) Type: nukleinsyre

- (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: DNA

5

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 46:

	CTTAAGGTAA GTTCTTATCA AGTTTGTCT TCTAATGTTT GATAGTTAAA GTATGTGTTA	60
10	TATTTGCTAA TTTTCTTACT CTAAAGGAAG TAAAAATGA CGTCAAATA AGCGTCGTAG	120
	GAGGCGTAAT CGACGAGGTC AGTTGTGATG TTGTCTTCTA CTTTGCCGTG TTTAAGGCCG	180
	ACTTCGACAG TAGCCAATGA GTCTAAATCT TCCCCTAAAG CTACAACGAC AAAACGGTAA	240
	AAGGTTGTGCG TGTATTATTC CCAATAACAA ATATTTATGA TGATAACGGT CGTAACGACG	300
15	ATTTCTTCTT CCCCATAGGT ACCGATTCTC TCTTCTTCTG CTTGCACTTC GATCTAAGCA	360
	ATTGGTTGTG AACACGCCAA GGGTGAACCA ACTTCGAAAC ATGAACCAAA CACCACTTTC	420
	TCCAAAGAAG ATGTGAGGTT TCTGATCTCC ATAGCAACTT GTTACAACAT GAAGATAGAC	480
	AAGAAACATG GTTAACCTTT TGATGACGTT GATCTGCGTC GGGCGTCCGA GATCT	535
20		

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 47:

25

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 538 basepar
- (B) Type: nukleinsyre
- (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

30

(ii) Molekyltype: cDNA

(ix) Særtrekk:

35

- (A) Navn/nøkkel: CDS
- (B) Lokalisering: 77..514

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 47:

	GAATTCATT CAAGAATAGT TCAAACAAGA AGATTACAAA CTATCAATTT CATAACAAT	60
5	ATAAACGATT AAAAGA ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT TTA Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu 1 5 10	109
	TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu 15 20 25	157
10	GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp 30 35 40	205
	TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr 45 50 55	253
15	AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala 60 65 70 75	301
	AAA GAA GAA GGG GTA TCC ATG GCT AAG AGA GAA GAA GCT GAA GCT GAA Lys Glu Glu Gly Val Ser Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu 80 85 90	349
20	GCT GAA AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCC CAC TTG GTT GAA Ala Glu Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu 95 100 105	397
	GCT TTG TAC TTG GTT TGT GGT GAA AGA GGT TTC TTC TAC ACT CCA AAG Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys 110 115 120	445
25	ACT AGA GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT ACT TCT ATC TGT TCT TTG TAC Thr Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr 125 130 135	493
	CAA TTG GAA AAC TAC TGC AAC TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn 140 145	538

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 48:

- 35 (i) Sekvenskarakteristika:
- (A) Lengde: 146 aminosyrer
 - (B) Type: aminosyre
 - (D) Topologi: linear

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 48:

5 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
10 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80
15 Ser Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Arg Phe Val
85 90 95
Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
100 105 110
20 Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val
115 120 125
Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr
130 135 140
Cys Asn
145

25

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 49:

- 30 (i) Sekvenskarakteristika:
 (A) Lengde: 538 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær

35

(ii) Molekyltype: DNA

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 49:

CTTAAGGTAA GTTCTTATCA AGTTTGTCT TCTAATGTT GATAGTTAA GTATGTGTTA 60
5 TATTTGCTAA TTTTCTTACT CTAAAGGAAG TAAAAATGA CGTCAAATA AGCGTCGTAG 120
GAGGCGTAAT CGACGAGGTC AGTTGTGATG TTGTCTTCTA CTTTGCCGTG TTTAAGGCCG 180
ACTTCGACAG TAGCCAATGA GTCTAAATCT TCCCCTAAAG CTACAACGAC AAAACGGTAA 240
AAGGTTGTCG TGTATTATGC CCAATAACAA ATATTTATGA TGATAACGGT CGTAACGACG 300
10 ATTTCTTCTT CCCCATAGGT ACCGATTCTC TCTTCTTCTA CTTGACTTC GACTTTCTAA 360
GCAATTGGTT GTGAACACGC CAAGGGTGAA CCAACTTCGA AACATGAACC AACACCACT 420
TTCTCCAAAG AAGATGTGAG GTTCTGATC TCCATAGCAA CTTGTTACAA CATGAAGATA 480
GACAAGAAAC ATGGTTAACC TTTTGATGAC GTTGATCTGC GTCGGGCGTC CGAGATCT 538
15

20

25

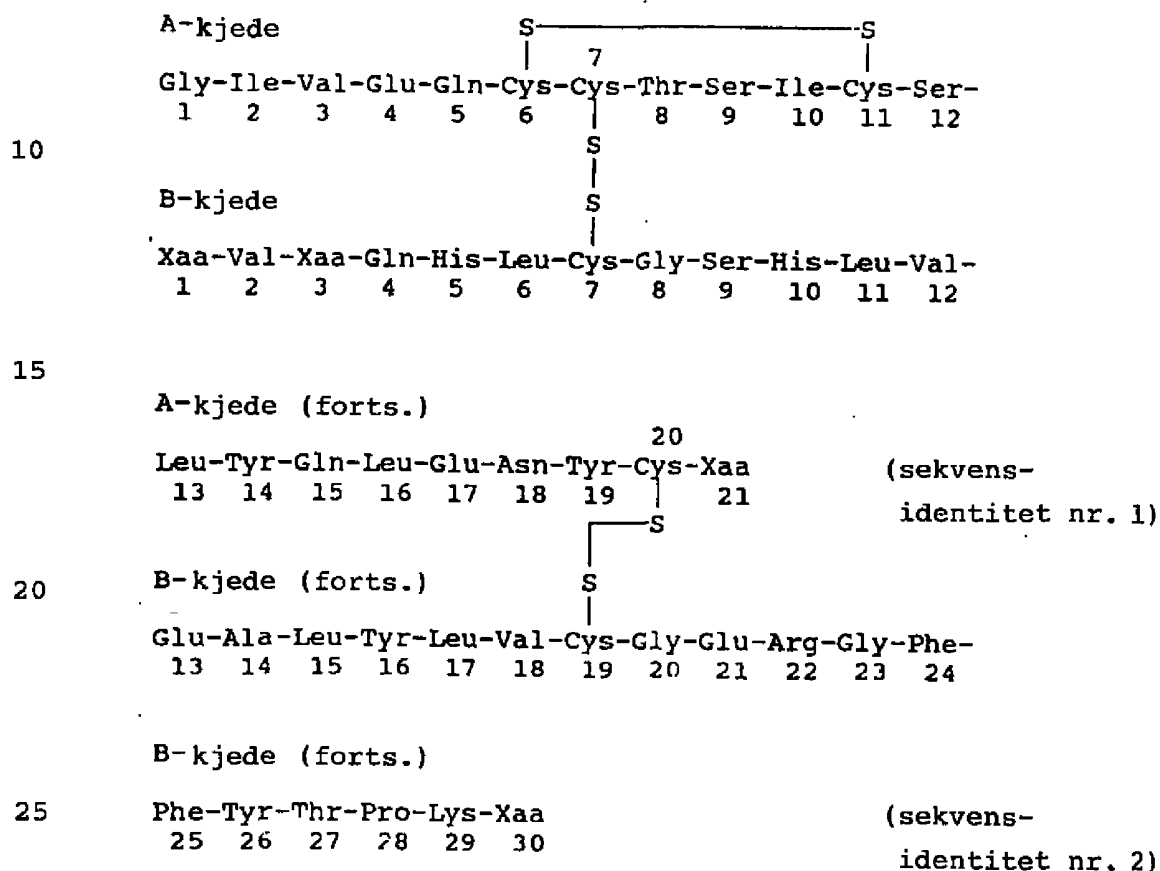
30

35

P a t e n t k r a v

1. Humaninsulinderivater,

5 k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e t h a r d e n f ø l g e n d e
sekvens:



hvor

30 Xaa i stillingene A21 og B3 uavhengig av hverandre er
hvilken som helst aminosyrerest som kan kodes for av den
genetiske kode, bortsett fra Lys, Arg og Cys,

Xaa i B1-stilling er Phe eller er delert,

35 Xaa i B30-stilling er (a) en ikke-kodbar, lipofil
aminosyre med 10-24 karbonatomer, i hvilket tilfelle en acyl-
gruppe med en karboksylsyre med opptil 5 karbonatomer er bundet
til ϵ -aminogruppen i Lys^{B29}, (b) hvilken som helst aminosyrerest
som kan kodes for av den genetiske kode, bortsett fra Lys, Arg
og Cys, i hvilket tilfelle ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en lipo-
fil substituent, eller (c) delert, i hvilket tilfelle

ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en lipofil substituent, og
 hvilke som helst Zn²⁺-komplekser derav,
 forutsatt at når Xaa i B30-stilling er Thr eller Ala, Xaa i
 A21- og B3-stillingene begge er Asn, og Xaa i B1-stilling er
 5 Phe, er insulinderivatet et Zn²⁺-kompleks.

2. Humaninsulinderivat ifølge krav 1,
 k a r a k t e r i s e r t v e d a t

Xaa i A21- og B3-stillingene uavhengig av hverandre er
 10 hvilken som helst aminosyrerest som kan kodes for av den
 genetiske kode, bortsett fra Lys, Arg og Cys,
 Xaa i B1-stilling er Phe eller er delert,
 Xaa i B30-stilling er en ikke-kodbar, lipofil amino-
 syre med 10-24 karbonatomer og idet en acylgruppe er bundet til
 15 ϵ -aminogruppen i Lys^{B29}, hvor acylgruppen er en acylgruppe i en
 monokarboksytsyre med opptil 4 karbonatomer eller en dikarbok-
 sylsyre med opptil 5 karbonatomer.

3. Humaninsulinderivat ifølge krav 1,
 20 k a r a k t e r i s e r t v e d a t

Xaa i A21- og B3-stillingene uavhengig av hverandre er
 hvilken som helst aminosyrerest som kan kodes for av den
 genetiske kode, bortsett fra Lys, Arg og Cys,
 Xaa i B1-stilling er Phe eller er delert,
 25 Xaa i B30-stilling er delert eller er hvilken som
 helst aminosyrerest som kan kodes for av den genetiske kode,
 bortsett fra Lys, Arg og Cys, og ϵ -aminogruppen i Lys^{B29} har en
 lipofil substituent som omfatter minst 6 karbonatomer.

30 4. Humaninsulinderivat ifølge krav 2,
 k a r a k t e r i s e r t v e d a t Xaa i B30-stilling er
 valgt fra gruppen bestående av α -aminodekansyre, α -amino-
 dodekansyre, α -aminotetradekansyre og α -aminoheksadekansyre.

35 5. Humaninsulinderivat ifølge krav 2,
 k a r a k t e r i s e r t v e d a t acylgruppen som er bun-
 det til ϵ -aminogruppen i Lys^{B29}, er valgt fra gruppen bestående
 av formyl, acetyl, propionyl og n-butyryl.

6. Humaninsulinderivat ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at acylgruppen som er bun-
det til ϵ -aminogruppen i Lys^{B29}, er en acylgruppe i ravsyre.
- 5 7. Humaninsulinderivat ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at Xaa i B30-stilling er
delert.
8. Humaninsulinderivat ifølge krav 3,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at Xaa i B30-stilling er
Asp, Glu eller Thr.
9. Humaninsulinderivat ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den lipofile substitu-
15 ent som er bundet til ϵ -aminogruppen i Lys^{B29}, er en acylgruppe
avledet fra en karboksylsyre med minst 6 karbonatomer.
10. Humaninsulinderivat ifølge krav 9,
k a r a k t e r i s e r t v e d at acylgruppen som kan
20 være forgrenet, omfatter en hovedkjede av karbonatomer som er
8-24 atomer lang.
11. Humaninsulinderivat ifølge krav 9,
k a r a k t e r i s e r t v e d at acylgruppen er en acyl-
25 gruppe i en fettsyre med minst 6 karbonatomer.
12. Humaninsulinderivat ifølge krav 9,
k a r a k t e r i s e r t v e d at acylgruppen er en acyl-
gruppe i en lineær, mettet karboksylsyre med 6-24 karbon-
30 atomer.
13. Humaninsulinderivat ifølge krav 9,
k a r a k t e r i s e r t v e d at acylgruppen er valgt
fra gruppen som omfatter dodekansyre, tridekansyre og tetra-
35 dekansyre.
14. Humaninsulinderivat ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at Xaa i A21-stilling er
Ala, Gln, Gly eller Ser.

15. Humaninsulinderivat ifølge krav 1,
karakterisert ved at Xaa i B3-stilling er
Asp, Gln eller Thr.

5 16. Humaninsulinderivat ifølge krav 1,
karakterisert ved at Xaa i B1-stilling er
delert.

17. Humaninsulinderivat ifølge krav 3,
10 karakterisert ved at det er N^{cB29}-tetra-
dekanoyl-des(B30)-humaninsulin.

18. Humaninsulinderivat ifølge krav 3,
karakterisert ved at det er et hvilket som
15 helst Zn²⁺-kompleks av N^{cB29}-tetradekanoyl-des(B30)-humaninsulin.

19. Humaninsulinderivat ifølge krav 3,
karakterisert ved at det er Zn²⁺-kompleks av
N^{cB29}-tetradekanoyl-des(B30)-humaninsulin som inneholder 2, 3
20 eller 4 Zn²⁺-ioner pr insulinheksamer.

20. Humaninsulinderivat ifølge krav 3,
karakterisert ved at det er N^{cB29}-(litoko-
loyl-glutamyl)-des(B30)-humaninsulin.

25

21. Humaninsulinderivat ifølge krav 3,
karakterisert ved at det er et hvilket som
helst Zn²⁺-kompleks av N^{cB29}-(litokoloyl-glutamyl)-des(B30)-
humaninsulin.

30

22. Humaninsulinderivat ifølge krav 3,
karakterisert ved at det er et Zn²⁺-kompleks
av N^{cB29}-(litokoloyl-glutamyl)-des(B30)-humaninsulin som
inneholder 2, 3 eller 4 Zn²⁺-ioner pr insulinheksamer.

35

23. Farmasøytisk preparat for behandling av diabetes hos
en pasient som trenger slik behandling,
karakterisert ved at det omfatter en tera-

peutisk effektiv mengde av et humaninsulinderivat ifølge krav 1 sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

24. Farmasøytisk preparat for behandling av diabetes hos
5 en pasient som trenger slik behandling,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en tera-
peutisk effektiv mengde av et humaninsulinderivat ifølge krav 1
i blanding med et insulin eller en insulinanalog som har en
hurtig virkningsstart, sammen med en farmasøytisk akseptabel
10 bærer.

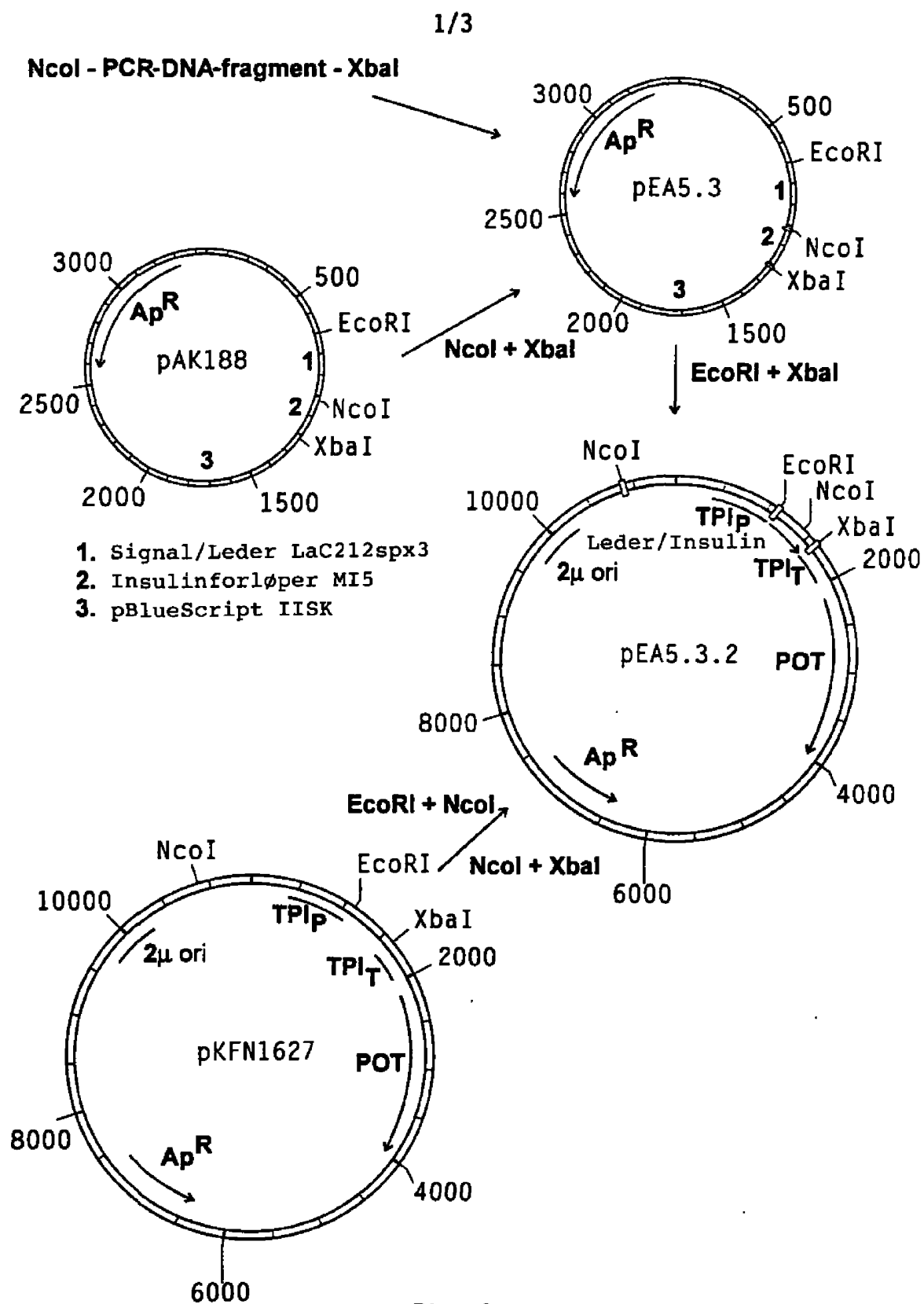


Fig. 1

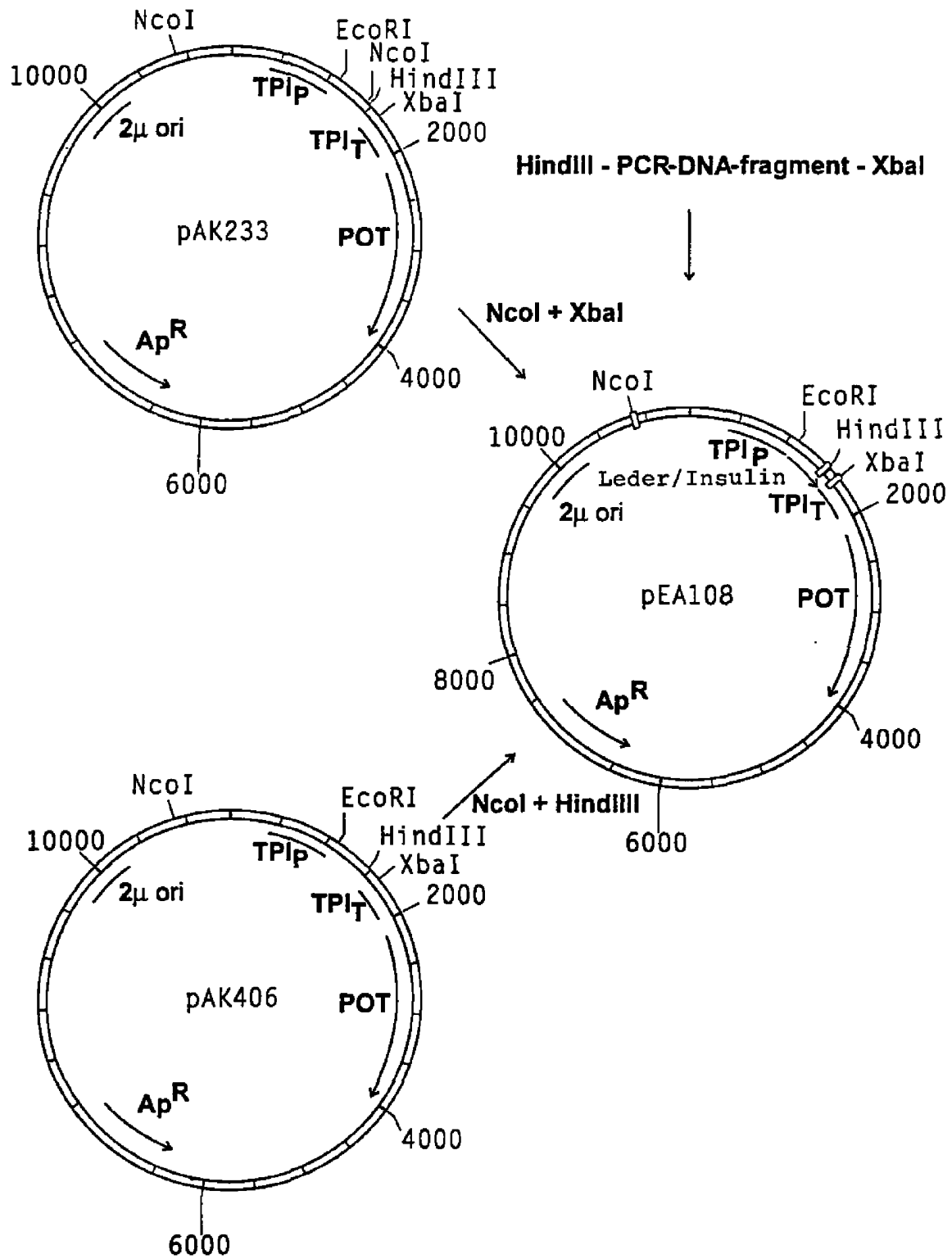


Fig. 2

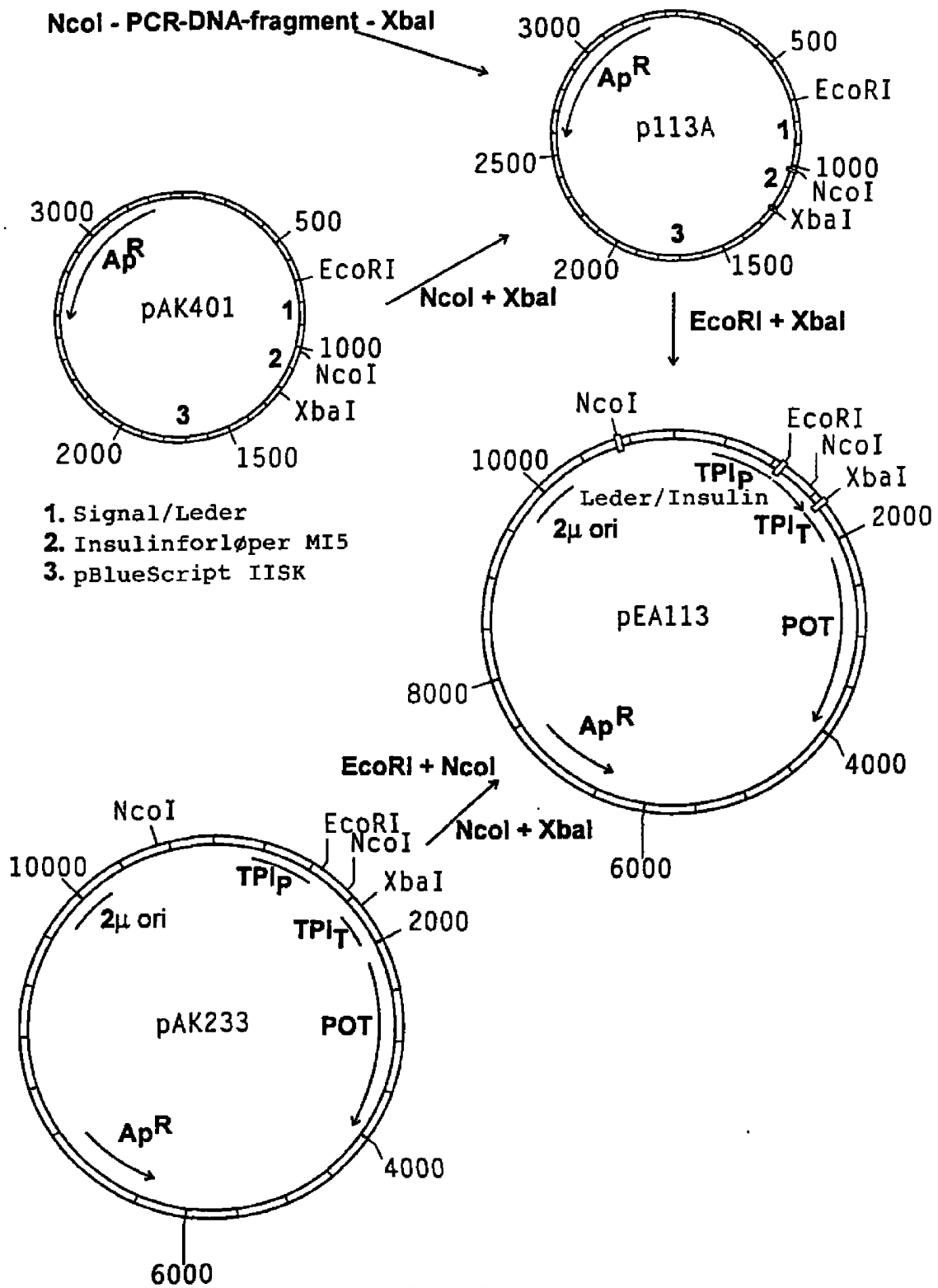


Fig. 3