

(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

**213 018 B**

(21) A bejelentés ügyszáma: 5678/89  
(22) A bejelentés napja: 1989. 11. 06.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
P 38 37 825.6 1988. 11. 08. DE

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

**C 07 K 14/62**

A 61 K 38/28

C 12 N 15/17

(40) A közzététel napja: 1990. 07. 30.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1997. 01. 28.

(72) Feltaláló:

dr. Dörschug, Michael, Bochum (DE)

(73) Szabadalmas:

Hoechst Ag., Frankfurt/Main (DE)

(74) Képvisező:

ADVOPATENT Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) **Eljárás új humán inzulinszármazékok, valamint az ezeket tartalmazó  
gyógyászati készítmények előállítására**

(57) KIVONAT

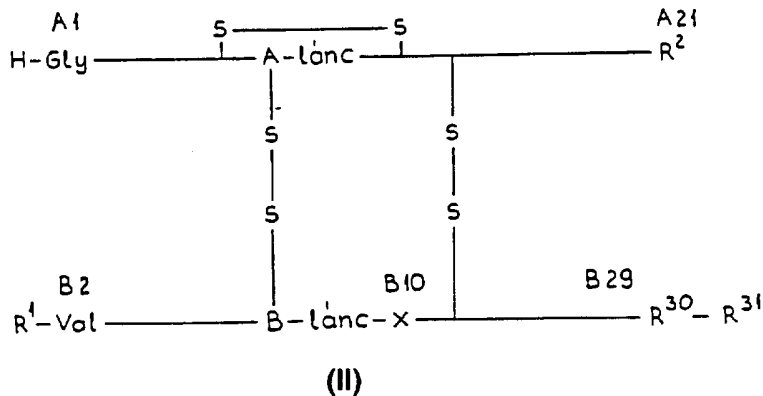
Az eljárás során megnövelt stabilitású, jó hatásprofilú (II) általános képletű, a diabetes mellitus kezeléséhez alkalmas új származékokat hoznak létre oly módon, hogy az Asn<sup>A21</sup>-t más, genetikusan kódolható aminosavakkal helyettesítik. A (II) általános képletben R<sup>1</sup> jelentése H-Phe, R<sup>2</sup> jelentése Asp, Gly vagy Ser,

R<sup>30</sup> jelentése Thr,

R<sup>31</sup> jelentése Arg-OH vagy Arg-Arg-OH,

X jelentése Asp, Asn vagy His.

A találmány körébe tartozik a (II) általános képletű új humán inzulinszármazékokat – kívánt esetben cink-só kíséretében – tartalmazó gyógyászati készítmények előállítása is.



A találmány tárgya eljárás diabetes mellitus kezeléséhez alkalmas inzulinszármazékok, valamint az ezeket tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására.

Ismeretes, hogy a diabetikus mellitus kezeléséhez nagy mennyiségű inzulinra és inzulinszármazékokra van szükség, ezeket részben nagyiparilag is előállítják. Annak ellenére, hogy jelentős számban állnak már inzulinkészítmények és -változatok rendelkezésre különféle hatásprofilokkal, a szervezetek különbözősége és egyéni ingadozásai miatt még mindig fennáll az igény más sajátosságokkal és hatás-jellegzetességekkel rendelkező további inzulinkészítményekre.

Késleltetett hatású inzulin-készítményeket ismeretnek például az EP-B 0 132 769 és EP-B 0 132 770 sz. szabadalmi leírásban: az (I) általános képletű, az inzulin-B-lánc B31-es pozíciójában bázikusan modifikált származékról van szó. A képletben

R<sup>1</sup> jelentése hidrogénatom vagy H-Phe,

R<sup>30</sup> jelentése valamely neutrális, genetikusan kódolható L-aminosav maradéka,

R<sup>31</sup> jelentése fiziológiai szempontból közömbös, bázikus karakterű, legfeljebb 50 szénatomos szerves csoport, melynek létrehozásában 0-3 α-aminosav részes, és amelynek adott esetben meglévő, véghelyzetű karboxilcsoportja észterfunkcióként, amidfunkcióként, laktonként vagy CH<sub>2</sub>OH-vá redukálva lehet jelen.

Ezekre az inzulinszármazékokra 5, 8 és 8,5 közötti izoelektromos pont (az izoelektromos fókuszálásban mérve) jellemző. Az izoelektromos pont – mely a modifikálatlan természetes inzulinnal vagy proinzulinnal (pH 5,4-nél) szemben a semleges tartományba tolódott – a járulékos, a bázikus modifikálás következtében a molekula felületén található pozitív töltések függvénye. Így ezek a bázikusan modifikált inzulinszármazékok a semleges tartományban kevésbé oldhatók mint a természetes inzulin vagy proinzulin, melyek semleges közegben rendszerint oldott állapotban találhatók.

Az (I) általános képletű modifikált inzulin-származékok késleltető vagy retard hatása az izoelektromos ponton mutató gyenge oldhatóságra vezethető vissza. Az előbb említett két leírás értelmében az inzulinszármazékok fiziológiai feltételek között újra oldhatóvá lesznek a járulékos bázisos csoportok lehasítása révén, ami a származéktól függően triptikus vagy tripszinhez hasonló és/vagy karboxipeptidáz B, vagy a karboxipeptidáz B-hez hasonló és/vagy észteráz aktivitás hatására megy végbe. A lehasított csoportok vagy tiszta fiziológiai metabolitok, vagy pedig könnyen metabolizálható, fiziológiai szempontból közömbös anyagok.

Az előbbieken említett, az inzulin bázikus modifikációja következtében fennálló retardelvet még tovább hasznosítják más – főleg az A- és B-láncon belül – bázikusan modifikált inzulinszármazékok megfelelő alkalmazásával; 1. pl. EP-A 0 194 864 és EP-A 0 254 516 sz. európai közrebocsátási iratot.

Az EP-A 0 194 864 sz. európai közrebocsátási irat szerinti inzulin-származékok B27-pozíciójába egy bázikus aminosav van beépítve és/vagy az A4, A17, B13 és/vagy B21 pozíciókban egy semleges aminosav van;

ezenfelül a B-lánc C-terminális karboxilcsoportját egy amid- vagy észtermaradék blokkolja.

Az EP-A 0 254 516 sz. európai közrebocsátási irat szerinti inzulinszármazékok az előbb említett EP-A leírásban ismertettekhez nagyon hasonlítanak; annak érdekében, hogy a megfelelő gyógyszerészeti készítmények stabilitását gyengén savas pH-értéknél megnöveljék, az A21 pozícióban lévő Asn aminosavakat még más, savas közegben stabil aminosavakkal, mint pl. Asp-vel helyettesítették. Asn (aszparagin) ismert módon abban különbözik az Asp-től (aszparaginsav), hogy a két karboxil-csoport egyike amidcsoporttal van helyettesítve. [(1') képletű vegyület: aszparagin, (2') képletű vegyület: aszparaginsav].

Az inzulinmolekulát az A- és B-láncban másképpen is modifikálták, különösen úgy, hogy a cinkkel történő komplexképzésért – és ezzel bizonyos késleltető hatásért – felelős, a B10 pozícióban lévő His-aminosavat más, megfelelő aminosavakkal cserélték ki, ily módon gyorsan ható inzulin-származékokat kaptak; 1.: az EP-A 0 214 826 sz. európai közrebocsátási iratot.

Az utoljára említett három leírásban szereplő valamennyi inzulin-származékot főleg az A- és B-láncon belül modifikálták; előállításukra géntechnológiai úton került sor.

Kutatásaink során azt a célt tűztük ki, hogy a bevezetőben említett EP-B 0 132 769 és EP-B 0 132 770 sz. szabadalmi leírások szerinti, a B-láncban a C-terminális végcsoportnál bázikusan modifikált inzulinszármazékok stabilitását savas közegben megnöveljük és adott esetben hatásprofilját is megváltoztassuk. Azt tapasztaltuk, hogy ezt a célt előnyös módon úgy érjük el, hogy az Asn<sup>A21</sup>-t más, genetikusan kódolható, amidcsoportot nem tartalmazó aminosavakkal helyettesítjük és adott esetben a His<sup>B10</sup>-t más, genetikusan kódolható aminosavakkal szubsztituáljuk.

Találmányunk tárgya tehát eljárás a (II) általános képletű humán inzulinszármazékok, valamint fiziológiai szempontból elfogadható sóik előállítására – a képletben

R<sup>1</sup> jelentése H-Phe,

R<sup>2</sup> jelentése Asp, Gly vagy Ser,

R<sup>30</sup> jelentése Thr,

R<sup>31</sup> jelentése Arg-OH vagy Arg-Arg-OH,

X jelentése Asp, Asn vagy His.

Az új inzulinszármazékok és fiziológiai szempontból elfogadható sóik hosszabb időn át is stabilak a gyengén savas pH-értékeknek megfelelő gyógyászati készítményeknél és – különösen ha a His<sup>B10</sup> is még Asp csoportra van helyettesítve – az ismert, változatlan, (I) általános képletű, bázikusan modifikált inzulinszármazékokkal szemben megváltozott (rövidebb) hatásprofilal rendelkeznek.

A (II) általános képletű humán inzulinszármazékokat főleg géntechnológiai úton, helyspecifikus mutagenézis révén, standard módszerekkel állítjuk elő.

A kívánt, (II) általános képletű inzulinszármazék előállításához kódoló génstruktúrát alakítunk ki, és egy gazdaságban – előnyösen egy baktériumban, mint az E. coli-ban vagy egy élesztőgombában, különösen a Saccha-

romyces cerevisiae-ben – expresszióra készítjük és – amennyiben a génstruktúra fúziós proteint kódol – a fúziós proteinből felszabadítjuk a (II) általános képletű inzulinszármazékot; analóg módszereket írunk le például a következő európai közrebocsátási iratokban: EP-A 0 211 299, EP-A 0 227 938, EP-A 0 229, EP-A 0 227 938, EP-A 0 229 998, EP-A 0 286 956.

A sejt feltárása után a fúziós protein-részt kémiai úton, halogén-cianiddal – az EP-A 0 180 920 szerint –, vagy enzimatikusan, lizosztafin alkalmazásával – a DE-A 3 739 347 szerint – hasítjuk le.

Ezután az elő-inzulint oxidatív szulfitolízisnek vetjük alá pl. az R. C. Marshall és A. S. Inglis „Practical Protein Chemistry-A. Handbook” (kiadó A. Darbre) 1986. c. kiadvány 49–53. oldalain leírt módszerrel, és végül egy tiol jelenlétében a szabályos diszulfid-hidak kiképzése mellett denaturáljuk, pl. G. H. Dixon és A. C. Warldow részéről a Nature-ben (1960), 721–724. old., leírt módszerrel.

A C-peptidet triptikus hasítás útján távolítjuk el, pl. Kemmler és tsai módszerét alkalmazva; l.: J. B. C. (1971), 6786–6791. old., és a (II) általános képletű inzulinszármazékot ismert technikai eljárásokkal, mint kromatográfiával – l.: pl. EP-A 0 305 760 – és kristályosítással tisztítjuk.

A (II) általános képletű inzulin-származékot, melynél  $R^2 = Asp$  és  $X = His$  célszerűen úgy is előállíthatjuk, hogy egy (I) általános képletű ismert, bázikusan modifikált inzulinszármazékot vizes-savas közegben hidrolizáljuk (mivel itt csak az aszparagin amidcsoportját az A21-pozícióban kell hidrolizálni), előnyösen kb. 2 és kb. 4 közötti, különösen kb. 2,5 pH-értéknél, és kb. 0–40 °C közötti hőmérsékleten, előnyösen szobahőmérsékleten.

A találmány szerinti (II) általános képletű inzulinszármazékokat és/vagy ezek fiziológiai szempontból elfogadható sóit főleg gyógyszerészeti készítmények hatóanyagaként, a diabetes mellitus kezeléséhez lehet alkalmazni.

A gyógyszerészeti készítmény előnyösen injekciós célokra szolgáló oldat vagy szuszpenzió; a készítmény legalább egy (II) általános képletű inzulinszármazékot és/vagy ennek legalább egy, fiziológiai szempontból elfogadható sóját tartalmazza oldott, amorf és/vagy kristályos – előnyösen oldott – formában.

A készítmény pH-ja előnyösen kb. 2,5 és 8,5 között, különösen kb. 4,0 és 8,5 között van,

megfelelő izotonizáló szert, konzerválószeret és adott esetben megfelelő puffert, valamint előnyösen egy meghatározott koncentrációban cink-ionokat tartalmaz,

valamennyit természetesen steril, vizes oldatban. A készítmény alkotóinak összessége – a hatóanyagot kivül – képezi a hordozót a készítményben.

5 Megfelelő izotonizáló szerek pl. a glicerin, glükóz, mannit, NaCl, kalcium- vagy magnéziumvegyületek, mint  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$  stb.

10 Az izotonizáló szer és/vagy a konzerválószer megválasztásával befolyásolni lehet az inzulinszármazék illetve fiziológiai szempontból elfogadható sójának oldhatóságát enyhén savas pH-értéknél.

Alkalmas konzerválószer pl. a fenol, m-krezol, benzilalkohol és/vagy p-hidroxi-benzoészter.

15 Pufferként, különösen a kb. 4,0 és 8,5 közötti pH értékek beállításához, pl. nátrium-acetátot, nátrium-citrátot, nátrium-foszfátot stb. lehet alkalmazni. A pH-érték beállításához egyébként fiziológiai szempontból közömbös savak (különösen a HCl) illetve lúgok (különösen a NaOH) is megfelelnek.

20 Ha a készítmény cinket is tartalmaz, 1 µg és 2 mg, különösen 5 µg és 200 µg közötti Zn/ml mennyiségek részesülnek előnyben.

Előnyös hatóanyag-koncentrációk a következők: mintegy 1–1500, még előnyösebb a kb. 5–1000 és különösen előnyös a 40–400 nemzetközi egység/ml.

25 A találmány szerinti (II) általános képletű új inzulinszármazékok géntechnológiai előállítási eljárásában kulcsfontosságú közbenső termék a pSW3 plazmid [(22) képlet], amelyet először egy korábbi, mini-proinzulin előállítására vonatkozó szabadalmi bejelentésünkben írtunk le; előállítási eljárását a jelen bejelentésünk példáiában is ismertetjük.

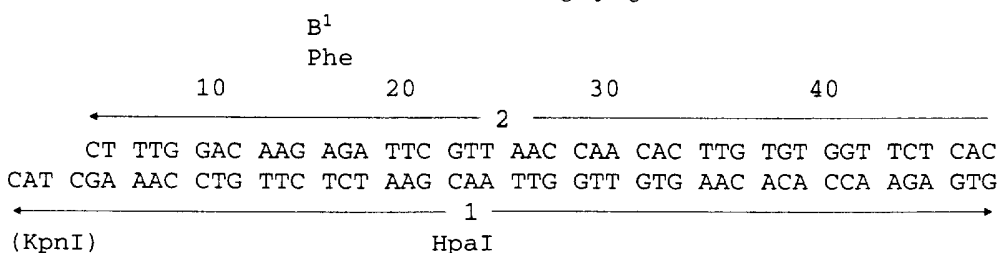
#### 1. példa

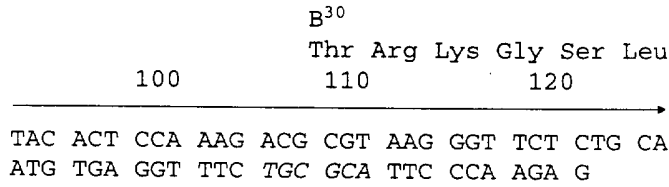
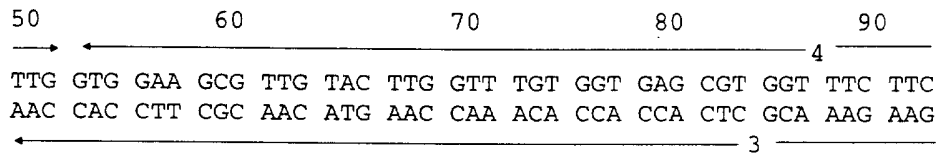
A pSW3 plazmid előállítása

a) A pIK1 és pIK2 plazmidok előállítása

35 A kereskedelemben beszerezhető pUC19 plazmidot a KpnI és PstI restrikciós enzimekkel felnyitjuk és a nagy fragmentumot (1) 0,8%-os „Seaplaque”-gélben elválasztjuk. Ezt a fragmentumot az 1. táblázat szerinti szintetikus 2. DNS-sel (2) és T4 DNS-ligázzal elegyítjük, és a ligációs elegyet kompetens Escherichia coli 79/02 sejtekkel inkubáljuk. A transzformációs keveréket 20 mg/l ampicillint tartalmazó IPTG/Xgal lemezekon szélesztjük. A fehér telepekből izoláljuk a plazmid-DNS-t, és restrikciós- és DNS-szekvenenciaanalízis révén jellemezzük. A kívánt plazmidokat a továbbiakban pIK1-nel (3) nevezzük. Hasonlóképpen ligáljuk a 2. táblázat szerinti DNS-t (5) is előzőleg PstI-gyel és HindIII-mal felnyitott pUC19-cel (4). Így a pIK2 plazmidot (6) kapjuk.

1. táblázat  
IK I génfragmentum

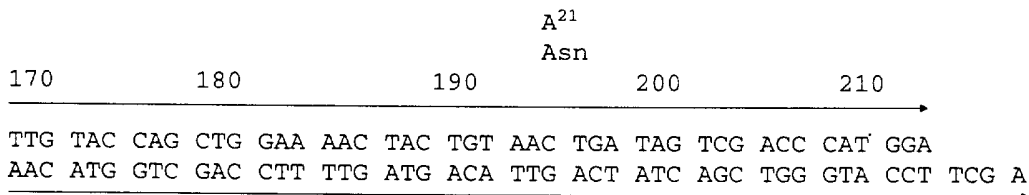
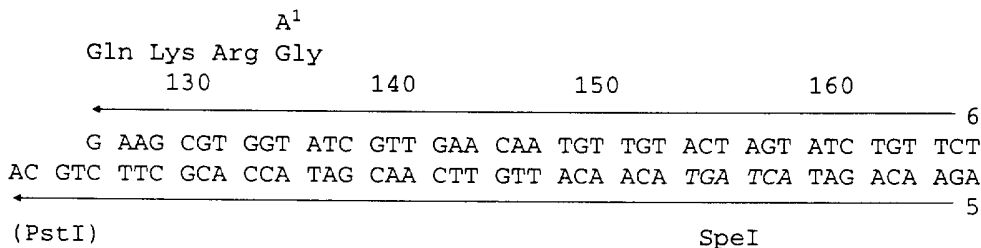




MluI

(PstI)

2. táblázat  
IK II génfragmentum



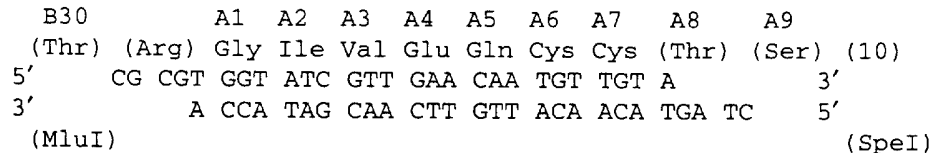
(HindIII)

*A pIK4 plazmid előállítása*

A pIK1 (3) és pIK2 (6) plazmidokból ismét izoláljuk az 1. és 2. táblázat szerinti DNS-szekvenciákat [(2) és (5)], és előzőleg KpnI-gyel és HindIII-mal felnyitott puC19-cel (7) ligáljuk. Így nyerjük a pIK3 (8) plazmi-

dot, amely egy módosított humán inzulin-szekvenciát kódol.

A pIK3 (8) plazmidot MluI-gyel és SpeI-gyel felnyitjuk és izoláljuk a nagy fragmentumot (9). Ezt az alábbi DNS-szekvenciával (10)



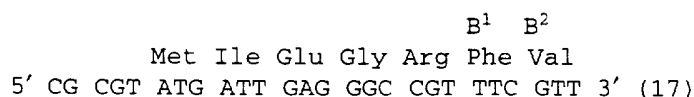
kapcsoljuk össze, amely a B-lánc utolsó kodonját (B30) egy arginin-kodonnal kiegészíti, az A-lánc első 7 aminosavját kódoló kivágott kodonokat helyettesíti, és az A-lánc 8. és 9. aminosavját kódoló kodonokkal kiegészíti. Így a pIK4 plazmidhoz (11) jutunk.

ismert pK50 (12) plazmidot EcoRI-gyel és HindIII-mal hasítjuk [ott a 3. példa: 3. ábra (33)]. Mindkét fragmentumot [(13) és (14)] izoláljuk. Az IL-2 rész-szekvenciájú kis fragmentumot (14) MluI-gyel továbbhasítjuk és izoláljuk az IL-2 rész-szekvenciát (15).

*c) A pIK10 expressziós vektor előállítása*

Az A 0 229 999 számú európai szabadalmi leírásból

55 A pIK4 plazmidot EcoRI-gyel és HpaI-gyel hasítjuk és a nagyobbik fragmentumot (16) izoláljuk, majd az IL-2 rész-szekvenciával (15) és az alábbi szintetikus DNS-sel (17)



3' A TAC TAA CTC CCG GCA AAG CAA 5'  
(MluI) (HpaI)

ligáljuk, ezáltal nyerjük a pIK8 (18) plazmidot. Ez egy fúziós proteint kódoló, amelyben az IL-2 első 38 aminosavját egy Met-Met-Ile-Glu-Gly-Arg képletű áthidaló tag követi, ezután pedig a mini-proinzulin aminosavszekvenciája következik.

A pIK8 (18) plazmidból kihalásztjuk a fenti fúziós proteint kódoló EcoRI-HindIII-fragmentumot (19). Ezt a fragmentumot a pK50 hasításával kapott nagy fragmentummal (13) ligáljuk. Így nyerjük a pIK10 (20) expressziós vektort, amely a fentebb jellemzett fúziós proteint kódolja.

#### d) A pSW3 plazmid előállítás

Ha eltávolítjuk a pIK10 (20) vektorból az NdeI-BstEII-szegmentumot, amely az úgynevezett „bom site”-ot tartalmazza, olyan vektort kapunk, amely több példányban van jelen a sejtben és a „bom site” hiánya miatt nem mobilizálható többé konjugatív plazmidok által.

A fenti célra a pIK10 (20) vektort BstEII-vel és NdeI-vel hasítjuk, a DNS-t etanollal kicsapjuk, DNS-polimerázt tartalmazó pufferbe visszük és Klenow-féle polimeráz-reakciónak vetjük alá. Az így keletkezett csonka végű DNS-fragmentumokat gélelektroforézissel szétválasztjuk, és a nagyobbik fragmentumot (21) izoláljuk. Ligálással kapjuk a pSW3 (22) vektort. A vektorral kompetens *Escherichia coli* Mc1061 sejteket transzformálunk, és a sejteket szaporítjuk, majd a pSW3 (22) plazmidot izoláljuk és jellemezzük.

#### 2. példa

##### Plazmid létrehozása Gly<sup>A21</sup>-humán-inzulin-Arg<sup>B31</sup>-OH előállításához

A plazmid-DNS-t a Pvu2 és SalI restriktív-enzimokkal átalakítjuk és utána alkalikus marhafoszfátázal (a Boehringer Mannheim NSZK-beli cég készítménye) kezeljük az előállító vállalat használati utasításában előírt módon.

A keletkező két fragmentumot gélelektroforétikus szétválasztjuk és a nagy fragmentumot elkülönítjük. Ezt a fragmentumot T4-DNS-kapcsolási reakció során a következő szintetikus DNS-szekvenciával kapcsoljuk össze:

5' - CTG GAA AAC TAC TGT GGT TGA TAG  
GAC CTT TTG ATG ACA CCA ACT  
ATC AGCT - 5'

A kapcsolási eleggyel *E. coli* W-3110 (ATCC 27 325) sejteket transzformálunk. A transzformációs elegyet 20 µg/ml ampicillint tartalmazó NA-lemezekre szélesztjük és éjjelen át 37 °C-on inkubáljuk. (Az NA-lemezeket oly módon állítjuk elő, hogy 8 g Bacto tápanyagot (a Difco cég készítménye), 15 g Bacto-agart (Difco) és 5 g nátrium-kloridot 1 liter vízben oldunk, az oldatot autoklávban sterilizáljuk, azután hozzáadjuk a kívánt mennyiségű (20–25 mg/l) ampicillint, majd az így készített agar-oldatot lemezekké hagyjuk szilárdulni.) Az egyes képződött telepekből éjjelen át kultúrát

készítünk és ezekből plazmid-DNS-t nyerünk. A megfelelő plazmidok, amelyek a megváltozott A-láncot kódolják, a pIK100 megjelölést kapják.

A transzformált *E. coli* sejtekkel éjjelen át készített kultúrát, amely a pIK100 plazmidot tartalmazza, 50 µg/ml ampicillint tartalmazó LB tápközeggel (J. H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972) hígítjuk 1:100 tf. arányban, és a kultúra fejlődését OD-méréssel követjük. OD = 0,5 érték elérésekor a kultúrát 1 mM IPTG-re állítjuk be és a baktériumokat 3 óra múlva lecentrifugáljuk. Az elkülönített baktériumokat 7 M karbamidot, 0,1 SDS-t és 0,1 M nátrium-foszfátot tartalmazó, 7,0 pH-értékű pufferoldatban 5 percig forraljuk, és egy SDS gélelektroforézis-lemezre mintákat veszünk. A gélelektroforézis analízis kb. 10 000 móltömegnek megfelelő tartományban egy olyan sávot mutat, amely a kívánt fúziós fehérjének felel meg. Az itt kapott anyag a „Western Blot” próbában az inzulin elleni antitestekkel reagál.

A sejtek nyomás alatti feltárása és a centrifugálás után az üledékben kapjuk a fúziós fehérjét, egyéb oldhatatlan sejt-alkotórészek kíséretében.

A kapott fúziós fehérjéből a cím szerinti módosított inzulin-származékot az alábbi 3 példában leírt eljárással állítjuk elő.

#### 3. példa

##### Gly<sup>A21</sup>-humán inzulin-Arg<sup>B31</sup>-OH előállítás

A centrifugálással és foszfát-pufferrel (pH 7), illetőleg vízzel való mosással tisztított fúziós proteinekből (szárazanyagtartalma körülbelül 25%) 40 g-ot 75 ml 98–100%-os foszforsavban oldunk és 5 g BrCN-ot adunk hozzá. 6 órán keresztül hagyjuk szobahőmérsékleten reagálni, majd az elegyhez 2 liter vizet adunk és fagyasztva szárítjuk.

A fragmentumok keverékét (10 g) feloldjuk 1 liter pufferoldatban [8 mól/l karbamid, 0,2 mól/l Tris-HCl (pH 8,5)] 30 °C-ra melegítjük és 10 g nátrium-szulfitot és 2,5 g nátrium-tetratiónátot adunk hozzá. 90 perc elteltével 30 °C-on 3 liter hideg vizet adunk hozzá és a pH-t 7,0-re állítjuk. A kivált csapadékot centrifugálással elkülönítjük; a szupernatáns folyadékból a proinzulin S-szulfonátot tartalmazó nyers terméket a pH-érték 3,5-re állításával leválasztjuk. Az elegyet 15 óra hosszat inkubáljuk, majd 4 °C-on centrifugáljuk. A csapadékot 200 ml vízzel mossuk és fagyasztva szárítjuk.

A kapott nyers termékben az S-szulfonát dúsítása két lépésben történik az alábbiak szerint:

1. lépés: Anioncserélő kromatográfiás eljárással 5×60 cm-es oszlopon, amely 3 mól/l karbamidot és 0,05 mól/l Tris-HCl-ot tartalmazó pufferben (pH 8,3) Fractogel<sup>R</sup> TSK DEAE-650 M-mel van megtöltve. Az eluálást 0,05–0,5 mól/l NaCl-gradienssel végezzük, 6 literes mennyiségekkel. Az eluátum analízise után izoelektromos fókuszálással csapjuk ki a terméket az egyesített frakciókból úgy, hogy 1 mól/l karbamid-koncentrációig hígítunk és a pH-t 3,5-re állítjuk.

2. lépés: Nagy és kis molekulatömegű szennyezések eltávolítása géliszűrővel, <sup>R</sup>Sephacril S200-on 3 mól/l karbamidot, 0,05 mól/l Tris-HCl-ot, 0,05 mól/l NaCl-ot tartalmazó pufferben (pH 8,3). A frakciók analízise és a termék izolálása ugyanúgy történik, mint az előző lépésnél. A csapadékot 20 ml vízzel mossuk és fagyaszttva szárítjuk.

A térszerkezet kialakításához és a diszulfid-hidak képzéséhez az S-szulfonátot 50 ml 8 mól/l karbamidot, 0,02 mól/l Tris-HCl-ot tartalmazó pufferben (pH 8,6) oldjuk. Néhány csepp oktanol hozzáadása után 15 percen keresztül utótisztított nitrogént vezetünk keresztül az oldaton. 1,1 ml (16 mól/l koncentrációjú) 2-merkaptó-etanol hozzáadása után 1 órán belül, szobahőmérsékleten végbemege a teljes redukció. Az oldatot <sup>R</sup>Sephadex G25-oszlop (5×60 cm) visszük, és 0,05 mól/l koncentrációjú glicin/NaOH (pH 10,6) oldattal eluáljuk. 300 ml glicin-pufferben lévő fehérje-frakciót a pH-érték ellenőrzése, és esetleges korrigálása (pH 10,6) után 2 napig 4 °C-on tartjuk. Ezután a pH-t 6,8-ra állítjuk, és az oldatot 1 mg (3,5 egység) L-[1-(p-tozil-amino)-2-fenil-etil]-(klór-metil)-ketonnal (TPCK) kezelt tripszinnel (Merck) inkubáljuk szobahőmérsékleten, 4 órán keresztül. Ezután a pH-t 3,5-re állítjuk be, az oldathoz 1 mg tripszin-inhibitor [szőjababból (Sigma)] és 3 ml 10%-os ZnCl<sub>2</sub>-ot adunk és a pH-t ismét visszaállítjuk 6,8-ra. A kivált csapadékot centrifugálással elválasztjuk. A kapott nyers termék cím szerinti inzulin tartalmaz, amelyet S-Sepharose<sup>R</sup>-on végzett ioncserélő kromatográfiás eljárással (2,5×40 cm-es oszlop) 50 mmól/l tejsavat és 30% izopropanolt tartalmazó pufferben tisztítunk. Az eluálást 0,05–0,50 mól/l koncentrációjú NaCl-oldattal (1–1 liter) végezzük, gradiens-elúcióval. Az eluátumot nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással analizáljuk. A terméket tartalmazó frakciókat vízzel 1:1 arányban hígítjuk, majd a cím szerinti inzulin 10 ml/l 10%-os ZnCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó víz hozzáadásával kicsapjuk a pH 6,8-ra való beállítása után. A centrifugálás útján elválasztott csapadékot 1 g/l fenolt, 10,5 g/l citromsavat és 200 mg/l ZnCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó pufferből (pH 6) kristályosítjuk. A kevés vízzel mosott kristályokat fagyaszttva szárítjuk.

#### 4. példa

*Plazmid létrehozása Gly(A21)-Asn(B10)-humán inzulin-Arg(B31)-OH előállításához*

A pIK100 plazmid-DNS-t a HpaI és Dra3 restriktív enzimekkel hasítjuk és alkálikus marha-foszfátázzal kezeljük. A keletkező két fragmentumot gél-elektroforitikus úton szétválasztjuk és a nagyobb fragmentumot elkülönítjük. A fragmentumot a következő szintetikus DNS-szekvenciával kapcsoljuk:

5' – AAC CAA CAC TTG TGT GGT TCT AAC TTG  
TTG GTT GTG AAC ACA CCA AGA TTG – 5'

A kapcsolási keverékkel megfelelő E. coli W3110 sejteket transzformálunk. A keletkező pIK101 plazmidot a továbbiakban a 2. példában leírtak szerint kezeljük.

#### 5. példa

*Plazmid létrehozása Gly<sup>A21</sup>-Asp<sup>B10</sup>-humán inzulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH előállításához.*

A pSW21 plazmid-DNS-ből kiindulva, a 4. példá-

ban leírt módon hozzuk létre a pSW30 plazmidot; az eljárásban a következő szintetikus DNS-szekvenciát alkalmazzuk:

5' – AAC CAA CAC TTG TGT GGT TCT GAC CTA  
5 TTG GTT GTG AAC ACA CAA AGA CTG – 5'

Az eljárást a továbbiakban a fenti 2. példa szerint folytatjuk le.

#### 6. példa

10 *Expressziós plazmid létrehozása majom-proinzulinhoz*

A majom-proinzulin csupán abban tér el a humán-proinzulintól, hogy a C-peptidben egyetlen aminosav különbözik [B37-Pro a humán proinzulin B37-Leu csoportja helyett, vö. (3') képlet].

15 A pSW3 plazmidot HpaI-gyel és SalI-gyel nyitjuk és a maradék plazmid-DNS-t elkülönítjük. Az EP-A 0 229 998 sz. szabadalmi dokumentumban leírt pK50 plazmidból a Dra3-SalI-majom proinzulin-fragmentumot elkülönítjük. A két fragmentumot egy T4-DNS-

20 kapcsolási reakcióban az alábbi szintetikus DNS-fragmentummal kapcsoljuk:

5' – AAC CAG CAC CTG TGC GGT TCT CAC CTA  
TTG GTC GTG GAC ACG CCA AGA GTG – 5'

25 Ily módon a pSW2 plazmidot nyerjük, melynek DNS-e kiindulási anyagul szolgál a következőkben a di-Arg-humán inzulin-származékokat kódoló expressziós plazmidok létrehozásához.

#### 7. példa

30 *Plazmid létrehozása Gly(A21)-humán inzulin-Arg(B31)-Arg(B32)-OH előállításához*

A pSW2 plazmid DNS-ét a 2. példának megfelelően Pvu2-vel és SalI-gyel hasítjuk és a nagyobb fragmentumot a 2. példa szerinti szintetikus DNS-seL kapcsoljuk; a pSW21 plazmid keletkezik.

#### 8. példa

*Plazmid létrehozása Ser(A21)-humán inzulin (Arg B31)-OH előállításához*

40 A plazmidot a 2. példában leírt úton hozzuk létre. A szintetikus DNS-szekvencia azonban a következőképpen változik:

5' – CTG GAA AAC TAC TGT TCA TGA TAG  
45 GAC CTT TTG ATG ACA AGT ATC AGCT – 5'

#### 9. példa

*Plazmid létrehozása Ser(A21)-humán inzulin-Arg(B31)-Arg(B32)-OH előállításához*

50 A pSW2-DNS-ből kiindulva a 8. példával analóg módon a pSW22 plazmidot hozzuk létre.

#### 10. példa

*Plazmid létrehozása Gly(A21)-Asn(B10)-humán inzulin-Arg(B31)-Arg(B32)-OH előállításához*

A pSW21-DNS-ből kiindulva a 4. példával analóg módon a pSW23 plazmidot hozzuk létre.

60 Ennek során szintetikus DNS-szekvenciaként a következő szekvenciát alkalmazzuk:

5' - AAC CAA CAC TTG TGT GGT TCT AAC CTA  
TTG GTT GTG AAC ACA CAA AGA TTG - 5'

### 11. példa

*Plazmid létrehozása Ser(A21)-Asn(B10)-humán inzulín-B31(Arg)-B32(Arg)-OH előállításához*

A pSW22-DNS-ből kiindulva a 3. példával analóg módon, a 10. példában leírt szintetikus DNS-szekvencia alkalmazásával a pSW24 plazmidot hozzuk létre.

### 12. példa

*Eljárás Asp<sup>A21</sup>-humán inzulín-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH előállítására humán inzulín-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH-ből hidrolízis útján*

1 g humán inzulín-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH-t 100 ml vízben feliszapolunk. Sósav hozzáadásával a pH-értéket 2,5-re állítjuk be, és az oldatot 37 °C-on tartjuk. Egy hét után az anyagnak kb. a felét Asp<sup>A21</sup>-humán inzulín-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH-vá alakítjuk. A terméket anioncserélővel ismert módon elválasztjuk a kiindulási anyagtól, kicsapjuk az eluátumból, és literenként 10,5 g citromsavat, 1 g fenolt és 5 ml 1%-os cink-klorid oldatot tartalmazó pufferben 5 g/l protein koncentrációval 6,0 pH-nál kristályosítjuk. Hozam: 390 mg Asp<sup>A21</sup>-humán inzulín-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>.

Hasonló módon alakítjuk át az egyéb hasonló, az A21 helyen Asn csoportot tartalmazó inzulinszármazékokban az Asn csoportot hidrolízis útján Asp csoporttá.

A 12. példa kiindulási anyagaként alkalmazott humán inzulín-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH az EP-A 0 132 770 számú európai közrebecsítési iratban leírt módon állítható elő.

### 13. példa

*Injekció-oldat előállítása*

A B/ szerinti inzulín-származékokat 1,4 mg/ml koncentrációval az alábbi összetételű (per ml) steril hordozó-oldatban oldjuk:

18 mg glicerin, 10 mg benzilalkohol, 80 µg Zn<sup>2+</sup>, pH 4,0.

### 14. példa

Asp<sup>A21</sup>-humán inzulín-Arg<sup>B32</sup>-OH készítmény hatásprofilja kutyán, összehasonlítva a humáninzulín-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH és Basal-H-inzulín-Hoechst<sup>(R)</sup> (= NPH azaz Neutral-Protamin Hagedorn szerint, kb. 10 µg Zn<sup>2+</sup> tartalommal) készítményekkel.

A kutyáknak beadott inzulinszármazék adagja 0,3 NE/kg testtömeg volt.

Készítmény		Vércukor a kezdeti érték százalékában órákban (h)				
		1 h	2 h	3 h	5 h	7 h
találmány szerint	Asp <sup>A21</sup> -humán inzulín Arg <sup>B31</sup> -Arg <sup>B32</sup> -OH	99	62	51	75	98

Készítmény		Vércukor a kezdeti érték százalékában órákban (h)				
		1 h	2 h	3 h	5 h	7 h
5	Összehasonlítás					
	humán inzulín Arg <sup>B31</sup> -Arg <sup>B32</sup> -OH	77	52	64	85	98
10	Basal-H-Inzulín Hoechst <sup>(R)</sup>	71	49	59	83	100

Ez a példa azt mutatja, hogy az Asp<sup>A21</sup>-humán inzulín-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH ugyanazzal az előnyös Bas 1-profilal rendelkezik, mint a humán inzulín-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH. Kiegészítésként az Asp<sup>A21</sup>-humáninzulín-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH előnyös tulajdonságára kell rámutatni, vagyis arra, hogy a megválasztott feltételek között a vegyület hosszú ideig stabil.

Az alább A-E alatt felsorolt további új inzulinszármazékok ugyancsak 0,3 NE/kg adagjával hasonló körülmények között kezelt kutyákkal az alábbi eredményeket kaptuk:

Vegyület	Vércukor a kezdeti érték százalékában								
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	
25	A	86	58	55	70	80	100		
	B	93	58	62	73	90	100		
30	C	98	88	66	62	62	64	70	80
	D	100	98	91	87	78	72	70	69
	E	70	72	78	81	93	92	94	96

A fenti kísérletekben az alább felsorolt humán inzulín-származékokat alkalmaztuk, amelyeket a találmány szerinti eljárással, a fentebbi példákban leírthoz hasonló módon állítottunk elő:

A Asp<sup>B10</sup>-Gly<sup>A21</sup>-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH

B Asp<sup>B10</sup>-Ser<sup>A21</sup>-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH

40 C Gly<sup>A21</sup>-Arg<sup>B31</sup>-OH

D Gly<sup>A21</sup>-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH

E Ser<sup>A21</sup>-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH

A fentebbi összehasonlító kísérletek eredményeihez hasonló módon ezek a kísérleti eredmények is mutatják a találmány szerinti új inzulinszármazékok hatásereőség és hatásprofil szempontjából előnyös tulajdonságait.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás (II) általános képletű humán inzulinszármazékok – ebben a képletben

R<sup>1</sup> jelentése H-Phe,

R<sup>2</sup> jelentése Asp, Gly vagy Ser,

55 R<sup>30</sup> jelentése Thr,

R<sup>31</sup> jelentése Arg-OH vagy Arg-Arg-OH,

X jelentése Asp, Asn vagy His –

és adott esetben fiziológiai szempontból elfogadható sóik előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a fenti meghatározásnak megfelelő inzulín-származékokat és kívánt

estben egy fúziós partner-peptidet kódoló génstruktúrát expressziós plazmidba építjük, bakteriális gazdasejtben kifejezzük és a fehérjét kinyerjük, és amennyiben a génstruktúra fúziós fehérjét kódol, a kapott fúziós fehérjéből az inzulinszármazékot felszabadítjuk – és adott esetben a kapott (II) általános képletű inzulinszármazékot fiziológiai szempontból elfogadható sóvá alakítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan (II) általános képletű inzulinszármazékot állítunk elő, amelynél  $R^2$  jelentése Asp csoport.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan (II) általános képletű inzulinszármazékot állítunk elő, amelynél X jelentése Asp csoport.

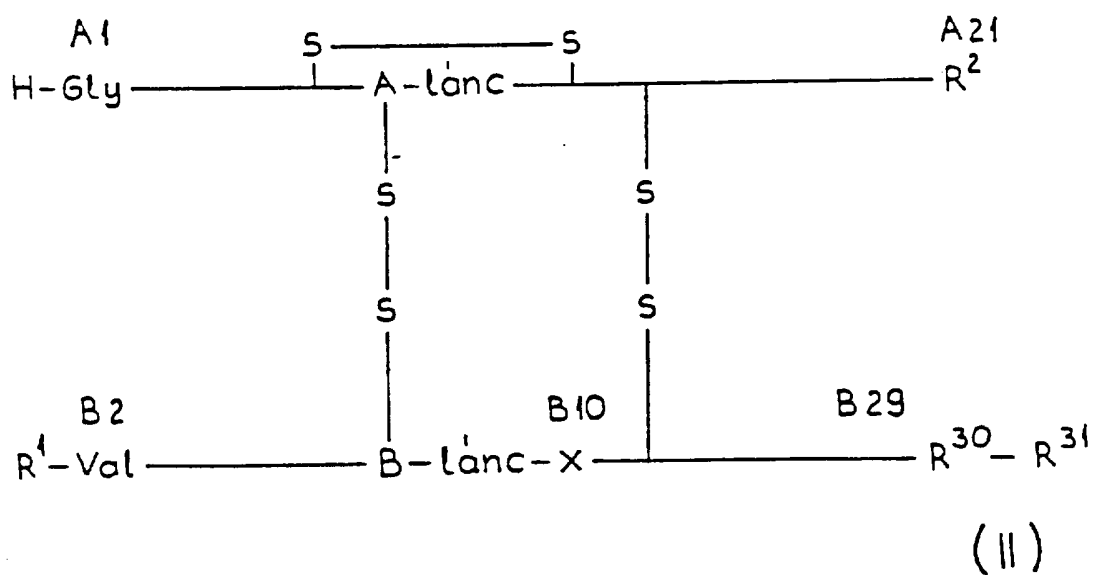
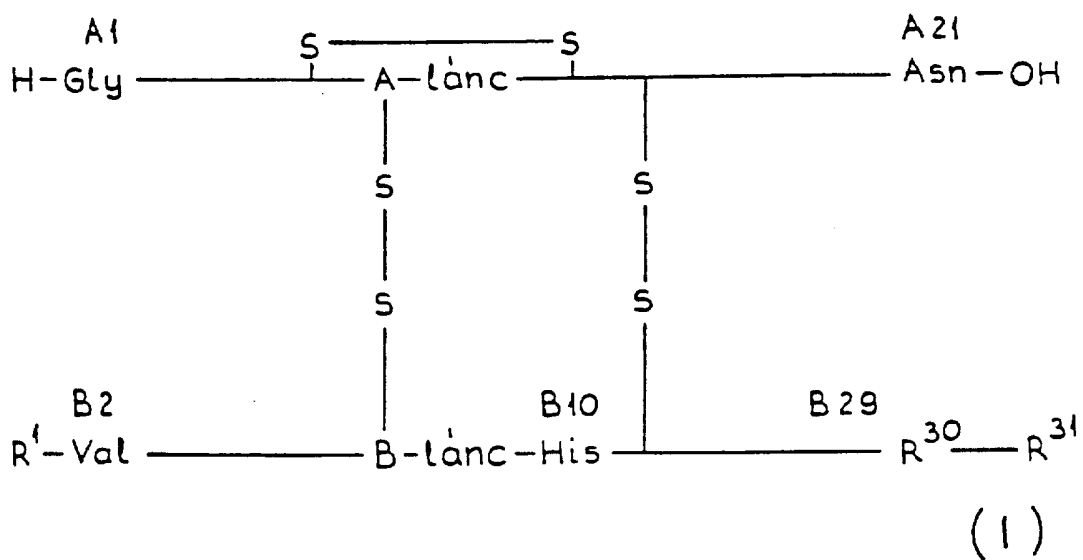
4. Eljárás olyan (II) általános képletű humán inzulinszármazékok és adott esetben fiziológiai szempontból elfogadható sóik előállítására, amelyeknél  $R^1$  jelentése H-Phe,  $R^2$  jelentése Asp,  $R^{30}$  jelentése Thr,  $R^{31}$  jelentése Arg-OH vagy Arg-Arg-OH és X jelentése His

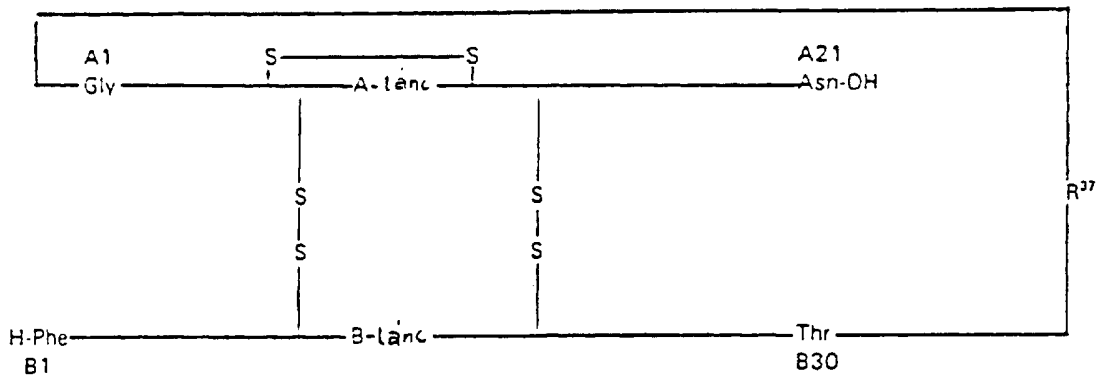
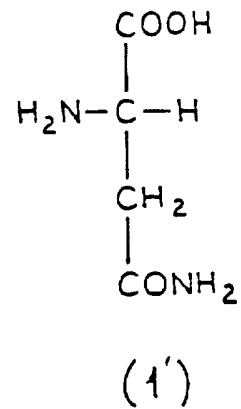
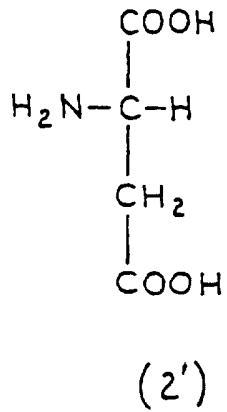
csoport, *azzal jellemezve*, hogy egy (I) általános képletű inzulinszármazékot – ahol  $R^1$ ,  $R^{30}$  és  $R^{31}$  jelentése egyezik a fent megadottal – vizes-savas közegben hidrolizálunk, és adott esetben a kapott (II) általános képletű inzulinszármazékot fiziológiai szempontból elfogadható sóvá alakítjuk.

5. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely az 1. igénypont szerint előállított (II) általános képletű inzulinszármazékot – ahol  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^{30}$ ,  $R^{31}$  és X jelentése egyezik az 1. igénypontban megadottal – vagy ennek fiziológiai szempontból elfogadható sóját vivőanyaggal és/vagy egyéb gyógyszerészeti segédanyaggal, és adott esetben cinkvegyülettel összekeverve gyógyászati célokra alkalmas készítménnyé alakítjuk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a (II) általános képletű inzulinszármazék oldatához 1 ml-re számítva 1  $\mu$ g–1 mg, előnyösen 5  $\mu$ g–200  $\mu$ g cinkvegyületet, előnyösen cink-kloridot adunk.







Humánproinzulin: R<sup>37</sup> = leucin      majomproinzulin: R<sup>37</sup> = prolin

(3')

