

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

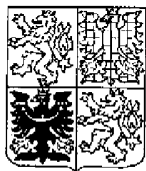
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1934-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18. 06. 98**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 20.06.97

(31) Číslo prioritní přihlášky: 97/19726167

(33) Země priority: DE

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 11. 99**

(Věstník č. 11/99)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/62

A 61 K 38/28

(71) Přihlášovatel:

HOECHST MARION ROUSSEL
DEUTSCHLAND GMBH, Frankfurt am Main,
DE;

(72) Původce:

Ertl Johann dr., Bremthal, DE;
Habermann Paul dr., Eppstein, DE;
Geisen Karl dr., Frankfurt, DE;
Seipke Gerhard dr., Hofheim, DE;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nové deriváty inzulinu a rychlým
začátkem působení, způsob jejich
přípravy a farmaceutický prostředek,
který je obsahuje**

(57) Anotace:

Popisují se deriváty inzulinu, které ve srovnání s lidským inzulinem vykazují zrychlený začátek působení, způsob jejich přípravy a jejich použití především ve farmaceutických prostředcích k léčení Diabetes mellitus. Zvláště se popisují deriváty inzulinu nebo jejich fyziologicky přijatelné soli, ve kterých je aminokyselina asparagin /Asp/ v pozici B3 řetězce B nahrazena přirozeně se vyskytující bazickou aminokyselinou a alespoň jedna z aminokyselin v pozicích B27, B28 nebo B29 řetězce B je nahrazena jinou přirozenou neutrální nebo kyslou aminokyselinou, přičemž může být rovněž asparagin v pozici A21 řetězce A nahrazen aminokyselinami Asp, Gly, Ser, Thr nebo Ala a aminokyselina fenylalanin /Phe/ v pozici B1 řetězce B a aminokyselina v pozici B30 řetězce B mohou zcela chybět.

CZ 1934-98 A3

Nové deriváty inzulínu s rychlým začátkem působení, způsob jejich přípravy a farmaceutický prostředek, který je obsahuje

Oblast techniky

Vynález popisuje deriváty inzulínu, které ve srovnání s lidským inzulínem vykazují zrychlený začátek působení, způsob jejich přípravy a jejich použití především ve farmaceutických prostředcích k léčení Diabetes mellitus.

Dosavadní stav techniky

Ve světě trpí asi 120 miliónů lidí na Diabetes mellitus. Mezi nimi je asi 12 miliónů diabetiků typu I, pro které je aplikace inzulínu v současnosti jedinou možností terapie. Postižení jsou doživotně, zpravidla několikrát denně odkázáni na injekci inzulínu. Ačkoli Diabetes typu II, kterým trpí asi 100 miliónů lidí, není primárně způsoben nedostatkem inzulínu, přesto se v mnoha případech léčba inzulínem používá jako příznivá nebo jediná možná forma terapie.

S pokračující dobou trvání onemocnění trpí velký počet pacientů takzvanými opožděnými diabetickými komplikacemi. Jedná se přitom v podstatě o mikro- a makrovaskulární poškození, které vedou, podle druhu a rozsahu, k selhání ledvin, k oslepnutí, ke ztrátě končetin nebo ke zvýšenému riziku onemocnění srdce nebo oběhového systému.

Příčinou komplikací je v první řadě chronicky zvýšená hladina glukózy v krevním obraze, protože i pečlivá snaha o dosažení normální hladiny glukózy v krvi takovou inzulínovou terapií, jaká by odpovídala fyziologické regulaci, není

úspěšná (Ward, J. D. (1989) British Medical Bulletin 45, strana 111 až 126; Drury, P.L. a další (1989) British Medical Bulletin 45, strana 127 až 147; Kohner, E.M. (1989) British Medical Bulletin 45, strana 148 až 173).

U zdravých jedinců sekrece inzulínu úzce závisí na koncentraci glukózy v krvi. Její zvýšená hladina, ke které dochází po požití potravy, je rychle kompenzována zvýšeným uvolňováním inzulínu. V období hladovění klesá hladina inzulínu v plazmě na bazální hodnotu, která zaručuje kontinuální zásobování inzulín-senzitivních orgánů a tkání glukózou. Optimalizace terapie, takzvaná intenzivní inzulínová terapie se v současnosti soustředí primárně na to, aby kolísání koncentrace glukózy v krvi, a to zvláště směrem nahoru, bylo co možná nejmenší (Bolli, G. B. (1989) Diabetes Res. Clin. Pract. 6, strana 3 až 16; Berger, M. (1989) Diabetes Res. Clin. Pract. 6, strana 25 až 32). To pak vede k výraznému snížení výskytu a nástupu poškození během pozdní fáze onemocnění. (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) N. Engl. J. Med. 329, strana 977 až 986).

Z fyziologie sekrece inzulínu je možné odvodit, že pro zlepšenou, intenzivní inzulínovou terapii jsou při použití subkutánně aplikovaných preparátů potřebné dva inzulínové přípravky s odlišnou farmakodynamikou. Ke kompenzaci vzestupu glukózy v krvi po požití jídla musí inzulín začít účinkovat rychle a může působit jen několik hodin. K bazálnímu zásobování, především v noci, by měl být k dispozici preparát, který působí dlouho, nedosahuje žádného výrazného maxima koncentrace a začíná účinkovat jen velmi pomalu.

Preparáty, které jsou odvozeny z lidského a zvířecího inzulínu, splňují nároky inzulínové terapie jenom omezeně. Rychle účinkující inzulín (Alt-inzulín) se po subkutánní

aplikaci dostává do krve a na místo působení příliš pomalu a působí po příliš dlouhou dobu. Důsledkem toho je, že postprandiální (po požití potravy) hladina glukózy je příliš vysoká a že za několik hodin po požití potravy hladina glukózy v krvi příliš výrazně klesne (Kang, S. a další (1991) Diabetes Care 14, strana 142 až 148; Home P.J. a další (1989) British Medical Bulletin 45, strana 92 až 110; Bolli, G. B. (1989) Diabetes Res. Clin. Pract. 6, strana S3 až S16). Dostupné bazální inzuliný, především NPH-inzuliný, vykazují příliš krátkou dobu působení a dosahují příliš výrazného maxima koncentrace glukózy.

Vedle možnosti ovlivnit profil účinku inzulinu galenickými principy se v současnosti naskytuje možnost navrhnout s pomocí genových technik deriváty inzulinu s určitými vlastnostmi, jako je například začátek působení a doba účinku. Této změny lze dosáhnout tím, že se změní strukturní vlastnosti inzulinu. Použitím vhodných derivátů inzulinu by pak bylo možné dosáhnout podstatně lepší nastavení hladiny glukózy v krvi, které by bylo více podobné přirozeným poměrům.

Deriváty inzulinu se zrychleným začátkem působení jsou popsány v EP 0 214 826, EP 0 375 437 a EP 0 678 522. EP 0 214 826 mimo jiné popisuje substituci v pozici B27 a B28 avšak ne ve spojení se substitucí v pozici B3. EP 0 678 522 popisuje deriváty inzulinu, které mají v pozici B29 různé aminokyseliny, zejména prolin avšak ne kyselinu glutamovou. EP 0 375 437 popisuje inzulinové deriváty s lysinem nebo argininem v pozici B28, které můžou být ještě výhodně modifikovány v pozici B3 a/nebo A21.

V EP 0 419 504 jsou popsány deriváty inzulinu, které jsou chráněny proti chemickým modifikacím, přičemž je zaměněn asparagin v pozici B3 a minimálně ještě jedna další aminokyselina v pozici A5, A15, A18 nebo A21. Kombinace s

modifikacemi v pozicích B27, B28 nebo B29 však nebyly dosud popsány. Rovněž nebyl dosud popsán důkaz toho, že tyto sloučeniny mají pozměněnou farmakodynamiku s rychlejším začátkem působení.

Ve WO 92/00321 byly popsány deriváty inzulinu, u kterých je minimálně jedna aminokyselina v pozicích B1 až B6 nahrazena lysinem nebo argininem. Takovéto inzuliny vykazují podle WO 92/00321 prodloužený účinek. Kombinace s modifikacemi v pozicích B27, B28 a B29 však nebyly popsány.

Cílem vynálezu je připravit deriváty inzulinu, které po aplikaci, především po subkutánní aplikaci, vykazují ve srovnání s lidským inzulinem zrychlený začátek působení.

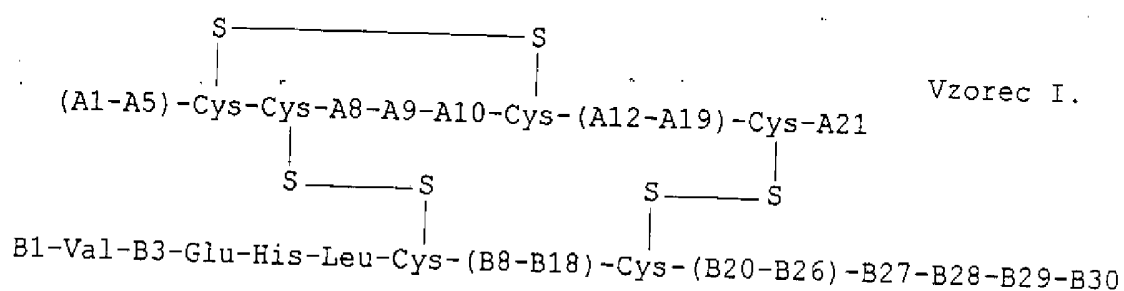
Deriváty inzulinu jsou deriváty přirozeně se vyskytujících inzulinů, t.j. lidského (viz. Sekvence id.č.:1 t.j. A-řetězec lidského inzulinu; Sekvence id.č.:2 t.j. B-řetězec lidského inzulinu, sekvenční protokol) nebo zvířecího inzulinu, které se od odpovídajícího, přirozeně se vyskytujícího inzulinu odlišují substitucí alespoň jednoho přirozeně se vyskytujícího aminokyselinového zbytku a/nebo adicí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku a/nebo organického zbytku.

Cílem předloženého patentu je dále poskytnout postup pro přípravu derivátů inzulinů s jmenovanými vlastnostmi, odpovídajících meziproduktů jako i jejich prekurzorů.

Vynález popisuje inzulinový derivát nebo jeho fyziologicky přijatelnou sůl který splňuje tento cíl, ve kterém je asparagin (Asn) v pozici B3 řetězce B zaměněn za přirozeně se vyskytující bazický aminokyselinový zbytek a alespoň jeden aminokyselinový zbytek v pozicích B27, B28 nebo B29 B-řetězce je zaměněn za jiný přirozeně se vyskytující aminokyselinový zbytek, přičemž může být fakultativně vyměněn asparagin (Asn) v pozici A21 řetězce A

za Asp, Gly, Ser, Thr nebo Ala a fenylalanin (Phe) v pozici B1 řetězce Ba aminokyselinový zbytek v pozici B 30 řetězce B mohou zcela chybět.

Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelnou sůl jsou znázorněny Vzorcem I



kde

(A1-A5) označují aminokyselinové zbytky v pozicích A1 až A5 řetězce A lidského (srovnej se Sekvencí id.č.:1) nebo zvířecího inzulínu,

(A12-A19) označují aminokyselinové zbytky v pozicích A12 až A19 řetězce A lidského (srovnej se Sekvencí id.č.:1) nebo zvířecího inzulínu,

(B8-B18) označují aminokyselinové zbytky v pozicích B8 až B18 řetězce B lidského (srovnej se Sekvencí id.č.:2) nebo zvířecího inzulínu,

(B20-B26) označují aminokyselinové zbytky v pozicích B20 až B26 řetězce B lidského (srovnej se Sekvencí id.č.:2) nebo zvířecího inzulínu,

A8, A9, A10 označují aminokyselinové zbytky v pozicích A8, A9 a A10 řetězce Alidského (srovnej se Sekvencí id.č.: 1) nebo zvířecího inzulínu,

A21 je Asn, Asp, Gly, Ser, Thr nebo Ala

B30 označuje -OH nebo aminokyselinový zbytek v pozici B30 řetězce B lidského (srovnej se Sekvencí id.č.:2) nebo zvířecího inzulínu

B1 označuje fenylalaninový zbytek (Phe) nebo atom vodíku

B3 označuje přirozeně se vyskytující bazický aminokyselinový zbytek

B27, B26 a B29 označují aminokyselinové zbytky v pozicích B27, B28, a B29 řetězce B lidského (srovnej se Sekvencí id.č.:2) nebo zvířecího inzulínu nebo vždy jiný přirozeně se vyskytující aminokyselinový zbytek, přičemž alespoň jeden aminokyselinový zbytek v pozici B27, B28 a B29 řetězce B je vyměněn za jiný přirozeně se vyskytující aminokyselinový zbytek.

Z dvaceti přirozeně se vyskytujících aminokyselin, které jsou geneticky kódovány, jsou v dalším textu glycin (Gly), alanin (Ala), valin (Val), leucin (Leu), isoleucin (Ile), serin (Ser), threonin (Thr), cystein (Cys), methionin (Met), asparagin (Asn), glutamin (Gln), fenylalanin (Phe), tyrosin (Tyr), tryptofan (Trp) a prolin (Pro) označovány jako neutrální aminokyseliny, aminokyseliny arginin (Arg), lysin (Lys) a histidin (His) jako bazické a aminokyseliny kyselina asparagová (Asp) a kyselina glutamová (Glu) jako kyselé aminokyseliny.

Výhodné jsou deriváty inzulínu podle vynálezu nebo jejich fyziologicky přijatelné soli odvozené od hovězího, vepřového nebo lidského inzulínu, zvláště výhodné jsou pak deriváty inzulínu nebo jejich fyziologicky přijatelné soli podle Vzorce I, kde

A8 znamená alanin (Ala),

A9 serin (Ser),

A10 valin (Val) a

B30 alanin (Ala) (aminokyselinové zbytky A8 až A10 a B30 hovězího insulínu);

A8 znamená threonin (Thr),

A9 serin (Ser) a

A10 isoleucin (Ile) (aminokyselinové zbytky A8 až A10 lidského nebo prasečího insulínu), přičemž

B30 znamená alanin (Ala) (aminokyselinový zbytek B30 prasečího insulínu) nebo

B30 znamená threonin (Thr) (aminokyselinový zbytek B30 lidského insulínu, srovnej se Sekvencí id.č.:2).

Ve zvláště výhodném provedení vynálezu má derivát inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I aminokyselinové zbytky A8 až A10 a B30 lidského inzulinu a dále:

(A1 až A5) označuje aminokyselinové zbytky v pozicích A1 až A5 řetězce A lidského inzulinu (srovnej se Sekvencí id.č.: 1),

(A12 až A19) aminokyselinové zbytky v pozicích A12 až A19 řetězce A lidského inzulinu (srovnej se Sekvencí id.č.:1),

(B8 až B18) aminokyselinové zbytky v pozicích B8 až B18 řetězce B lidského inzulinu (srovnej se Sekvencí id.č.:2) a

(B20 až B26) aminokyselinové zbytky v pozicích B20 až B26 řetězce B lidského inzulinu (srovnej se Sekvencí id.č.:2).

V dalších výhodných provedeních vynálezu má derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I v pozici B1 řetězce B fenylalaninový zbytek (Phe) nebo

derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl Vzorce I, který má jako aminokyselinový zbytek v pozici B3 řetězce B histidin (His), lysin (Lys) nebo arginin (Arg).

V jiném výhodném provedení vynálezu má derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B nahrazen jedním přirozeně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem, který patří do skupiny tvořené neutrálními nebo kyselými aminokyselinami.

Vynález dále popisuje výhodný derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelnou sůl podle Vzorce I kde alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B je přirozeně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem, který je vybrán ze skupiny tvořené aminokyselinami: isoleucin (Ile), kyselina asparagová (Asp) a kyselina glutamová (Glu); a ve zvláště výhodném je alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27 a B28 řetězce B nahrazen přirozeně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem, který je vybrán ze skupiny neutrálních aminokyselin, nebo v dalším obzvláště výhodném provedení vynálezu je alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B derivátu inzulínu podle vynálezu isoleucinovým zbytkem (Ile).

Vynález dále popisuje výhodný derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelnou sůl podle Vzorce I, kde alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B je přirozeně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem, který je vybrán ze skupiny kyselých aminokyselin; nebo výhodně kde alespoň jeden z

aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B je zbytek kyseliny asparagové (Asp); nebo výhodně kde aminokyselinový zbytek v pozicích B27 nebo B28 řetězce B je zbytkem kyseliny asparagové (Asp), nebo ještě výhodněji kde alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B je zbytkem kyseliny glutamové (Glu).

Výhodným provedením vynálezu je také derivát inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I, kde je aminokyselinový zbytek v pozici B29 řetězce B zbytkem kyseliny asparagové (Asp).

Dalším výhodným provedením vynálezu je derivát inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B27 řetězce B zbytkem kyseliny glutamové (Glu); nebo

derivát inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B28 řetězce B zbytkem kyseliny glutamové (Glu) nebo

derivát inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl Vzorce I, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B29 řetězce B zbytkem kyseliny glutamové (Glu).

Zvláště výhodným provedením vynálezu je derivát inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I, který se vyznačuje tím, že řetězec B vykazuje sekvenci

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr
(Sekvence id.č.:3), například lidský mutantní inzulin Lys
(B3), Glu (B29).

Dalším zvláště výhodným provedením vynálezu je derivát inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B27 řetězce

B zbytkem aminokyseliny isoleucinu (Ile); a zvláště výhodným pak je zejména derivát inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I, ve kterém B-řetězec vykazuje sekvenci

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr
(Sekvence id.č.:5), například lidský mutantní inzulin Lys
(B3), Ile (B27).

Dalším výhodným provedením vynálezu je derivát inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I, ve kterém je v pozici B28 řetězce B isoleucinový zbytek (Ile); a zvláště výhodným pak je zejména derivát inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I, ve kterém B-řetězec vykazuje sekvenci:

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr
(Sekvence id.č.:4), například lidský mutantní inzulin Lys
(B3), Ile (B28).

Dalším výhodným provedením vynálezu je derivát inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle Vzorce I, který se vyznačuje tím, že aminokyselinový zbytek v pozici B28 řetězce B je isoleucin (Ile) a aminokyselinový zbytek v pozici A21 je asparagin (Asp); zejména výhodný pak je derivát inzulinu jehož A-řetězec vykazuje sekvenci:

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asp (Sekvence id.č.: 9)

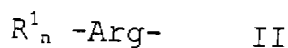
a B-řetězec sekvenci

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr

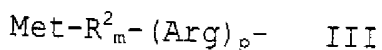
(Sekvence id.č.:10), například lidský mutantní inzulin (Lys (B3), Ile (B28), Asp (A21)).

Deriváty inzulinu podle vzorce I je možné připravit pomocí genových technologií.

Vynález dále popisuje způsob přípravy derivátu inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelné soli podle Vzorce I konstrukcí replikovatelného expresního systému, který obsahuje DNA sekvenci kódující prekursor derivátu inzulinu, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici A1 řetězce A spojen s aminokyselinovým zbytkem B30 řetězce B peptidovým řetězcem podle Vzorce II



kde, R^1_n - znamená peptidový řetězec s n aminokyselinovými zbytky přičemž n je celé číslo z intervalu od 0 do 34; a řetězec B je v pozici B1 prodloužen o peptidový řetězec podle Vzorce III



kde, R^2_m dole znamená peptidový řetězec s m aminokyselinovými zbytky přičemž m celé číslo od 0 do 40, ve výhodném provedení vynálezu od 0 po 9, a p znamená 0, 1 nebo 2, přičemž pro p=0 končí R^2_m výhodně aminokyselinou lysinem (Lys). Exprese v hostitelské buňce a uvolnění derivátu inzulinu z jeho prekursoru je realizováno chemickými a/nebo enzymatickými způsoby.

Ve způsobu podle vynálezu může být hostitelskou buňkou bakterie, zejména pak bakterie E. coli.

Ve způsobu podle vynálezu může být hostitelskou buňkou rovněž kvasinka, přičemž ve výhodném provedení vynálezu je touto buňkou kvasinka Saccharomyces cerevisiae.

K přípravě derivátu inzulinu s aminokyselinovou sekvencí podle Sekvence id.č.:9 (řetězec A) a Sekvence id.č.:10 (řetězec B) je výhodně použit prekurzor derivátu inzulinu se sekvencí:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln
His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr Arg Arg Glu Ala
Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr
Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asp

(Sekvence id.č.:11), Lys (B3), Ile (B28), Asp (A21)-preproinsulin.

K přípravě derivátu insulínu s aminokyselinovou sekvencí podle Sekvence id.č.:3 je výhodně použit prekurzor derivátu inzulinu se sekvencí:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

(Sekvence id.č.: 6), Lys (B3), Glu (B29)-preproinsulin.

K přípravě derivátu inzulinu s aminokyselinovou sekvencí podle Sekvence id.č.:5 je výhodně použit prekurzor derivátu inzulinu se sekvencí:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
(Sekvence id.č.:8), Lys (B3), Ile (B27)-preproinsulin.

K přípravě derivátu inzulinu s aminokyselinovou sekvencí podle Sekvence id.č.:4 je výhodně použit prekurzor derivátu inzulinu se sekvencí:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
(Sekvence id.č.:7), Lys (B3), Ile (B28)-preproinsulin.

Vynález rovněž popisuje jmenované prekurzory výhodného derivátu inzulinu, totiž peptidy podle Sekvence id.č.:11, Sekvence id.č.:6, Sekvence id.č.:7 a Sekvence id.č.: 8; sekvence DNA, které kódují vzpomínané prekurzory, expresní systémy, které obsahují tyto DNA sekvence jakož i hostitelské buňky, které jsou transformovány tímto expresním systémem.

Derivátu inzulinu podle Vzorce I se připravují hlavně genovými technikami prostřednictvím cílené mutagenese pomocí způsobů známých ze stavu techniky.

Pro požadovaný derivát inzulinu Vzorce I se konstruuje genová struktura, která je poté exprimována v hostitelské

buňce, výhodně v bakterii *E. coli* nebo v kvasince, zejména v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. V případě kdy genová struktura kóduje fúzní protein, je z něho uvolněn derivát inzulinu podle Vzorce I; analogické způsoby jsou popsány například v EP-A-0 211 299, EP-A-0 227 938, EP-A-0 229 998, EP-A 0 286 956 a v DE-patentové přihlášce číslo P 38 21 159.

Odštěpení fúzní části proteinu po rozbití buňky může být realizováno chemicky halogencyanem (viz. EP-A-0 180 920).

Při výrobě derivátu inzulinu prostřednictvím preproinzulinového prekursoru, který obsahuje část fúzního proteinu (presekvence) podle US 5,358,857 dochází k odštěpení fúzní části v dalším kroku spolu s odštěpením C-terminálního peptidu.

Inzulínový prekursor je dále podroben oxidační sulfitolýze podle metody popsané například R.C. Marshall a A.S. Inglis v "Practical Protein Chemistry - A Handbook" (vydavatel A. Darbre) 1986, strany 49 až 53 a následně je v přítomnosti thiolu renaturován za tvorby požadovaných disulfidických můstků způsobem popsaným například G.H. Dixon a A.C. Wardlow v Nature (1960), strana 721 až 724.

Inzulínový prekursor může být složen také přímo, viz EP-A-0 600 372; EP-A-0 668 292.

C-terminální peptid se odstraní štěpením trypsinem - například způsobem popsaným v Kemmler a další, J.B.C. (1971), strana 6786 až 6791 a derivát inzulinu Vzorce I je přečištěn prostřednictvím známých technik, například chromatograficky viz EP-A-0 305 760 a krystalizací.

V případě, kdy je n ve Vzorci II rovno nule, štěpení trypsinem slouží k rozštěpení peptidové vazby mezi řetězcem A a B.

V tomto způsobu končí řetězec B na C-konci argininem nebo dvěma argininovými zbytky. Ty mohou být odstraněny prostřednictvím karboxypeptidázy B.

Inzulínový derivát podle vynálezu má plnou biologickou aktivitu. To bylo prokázáno prostřednictvím intravenózní aplikace na králíkům a z poklesu glukózy v jejich krvi (Příklad 5 a 6).

Rychlejší nástup účinku inzulínového derivátu po subkutánní aplikaci byl prokázán euglykemickou clamp technikou na hladovějícím psovi (Příklad 7). Bylo podáváno 0,3 IU/kg derivátu inzulínu a jako referenční preparát byl použit lidský inzulín. Při clamp technice je po aplikaci inzulínu v krátkých časových intervalech měřená hladina glukózy v krvi a stejné množství glukózy je aplikováno, aby se kompenzoval její pokles. Výhodou metody je, že u zvířat nenastupuje genová regulace, která by se dala očekávat v případě rychlého úbytku krevní glukózy po podání inzulínu. Množství a časový průběh glukózy podané infuzí, charakterizují působení inzulínu. Inzulíny Lys(B3), Glu(B29)- (Sekvence id.č.:3) a Lys(B3),Ile(B28)- (Sekvence id.č.:4) vykazují zřetelně rychlejší začátek působení než lidský inzulín. K maximálnímu účinku (infúzní rychlosti glukózy) je dosaženo s lidským inzulínem 100 minut po aplikaci zatímco s inzulínem Lys(B3),Glu(B29)- (Sekvence id.č.:3) 80 minut a s inzulínem Lys(B3),Ile(B28)- (Sekvence id.č.:4) již po 60minutách. Proto by měla tato analoga lépe kompenzovat postprandiální nárůst glukózy v krvi než lidský inzulín, když se aplikují krátce před jídlem.

Popsané inzulínové deriváty jsou vhodné k terapii diabetes mellitus typu I jakož i typu II zejména ve spojení s bazálním inzulínem.

Vynález se proto také týká použití derivátu inzulínu a/nebo jeho fyziologicky přijatelné soli podle Vzorce I k výrobě farmaceutického přípravku, který vykazuje rychlý začátek působení.

Jako fyziologicky nezávadné a s inzulínovým derivátem snášené nosné médium je vhodný sterilní vodní roztok například glukózy, glycerínu, kuchyňské soli, který je izotonický vůči krvi a který také obsahuje konzervační prostředek jako je například fenol, m-kresol nebo ester kyseliny p-hydroxybenzoové. Nosné médium může navíc obsahovat pufr, například acetát sodný, citrát sodný, fosfát sodný. K nastavení pH se používají zředěné kyseliny (obvykle HCl) popřípadě louhy (NaOH). Přípravek může dále obsahovat ionty zinku.

Deriváty inzulínu mohou být použity ve farmaceutických přípravcích ve formě jejich fyziologicky přijatelných solí, jako jsou soli amonné nebo alkalické. Libovolný díl jednoho nebo několika derivátů inzulínu podle Vzorce I nebo derivát inzulínu podle Vzorce I mohou existovat ve směsi dalších těchto derivátů inzulínu vždy navzájem nezávisle, v rozpuštěné, amorfní a/nebo v krystalické formě.

Někdy je výhodné k přípravku podle vynálezu přidat patřičné množství vhodného stabilizátoru, který zabrání precipitaci proteinů při termicko-mechanické námaze přípravku při kontaktu s různými materiály. Takovéto stabilizátory jsou například popsány v patentech EP-A-18609 DE-A 32 40 177 nebo WO-83/00288.

Vynález dále popisuje farmaceutický přípravek, který obsahuje alespoň jeden derivát inzulínu a/nebo jeho fyziologicky přijatelnou sůl podle Vzorce I, zejména v rozpuštěné, amorfní a/nebo krystalické formě.

Derivát inzulínu podle vynálezu se vyznačuje rychlým začátkem působení. V praktické inzulínové terapii je podle okolností vhodné rychle působící inzulín smíchat s přípravkem, který obsahuje depotní pomocnou látku (např. NPH-inzulín). Následkem toho je podle složení přípravku jeho profil účinku složen z profilů jednotlivých komponent, jestliže jsou jednotlivé komponenty směsi stabilní a navzájem se neovlivňují. Při smíchání inzulínového derivátu s lidským NPH-inzulínem se však dá očekávat, že zejména při dlouhodobém skladování dochází k výměně mezi rozpuštěným derivátem a krystalickým NPH-inzulínem. Proto může být farmakodynamika depotního inzulínu jakož i rozpuštěného inzulínu s rychlým pozměněna nepředvídatelným způsobem. Proto je vhodné připravit rychle působící derivát s použitím depotní pomocné látky - jako je například NPH-inzulín. Tato depotní forma inzulínového derivátu může být libovolně míchána s rozpuštěnou rychle působící formou bez toho, aby se složení jedné nebo druhé formy v průběhu skladování měnilo.

Ačkoli vynález popisuje především rychle působící inzulínový derivát, zahrnuje také možnost připravit tento derivát pro lepší mísitelnost jako depotní formy, přičemž se jako depotní pomocná látka používá zejména aprotaminsulfát a inzulínový derivát a/nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl se pak převede na kokristalickou formu s protaminsulfátem.

Vynález dále popisuje injikovatelný roztok, který obsahuje farmaceutické přípravky podle vynálezu v rozpuštěné formě.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Konstrukce proinzulínu Lys (B3) jako východisko pro plazmidy podle příkladů 2 až 4

V patentu Spojených států US 5,258,857 je popsán vektor pINT 90d jakož i PCR primery Tir a Insu 11. Tyto komponenty slouží jakožto výchozí materiál pro konstrukci plazmidu pINT 125d, který kóduje požadovaný proinzulín Lys (B3). Dodatečně byl syntetizován primer Insu 35 se sekvencí:

5' TTT GTG AAG CAG CAC CTG 3'

a primer Insu 36 se sekvencí:

5' CAG GTG CTG CTT CAC AAA 3'.

Poté byla provedena jedna PCR reakce pomocí primerů Tir a Insu 36 a druhá PCR reakce za použití primerů Insu 11 a Insu 35. Jako templát byl využit plazmid pINT 90d.

Produkty obou reakcí jsou navzájem částečně komplementární takže je lze použít jako templáty pro další PCR reakci s primery Tir a Insu 11. Produktem této reakce byl sjednocený fragment kódující variantu proinzulínu, která obsahuje v pozici 3 řetězce B aminokyselinu lysin. Tento PCR fragment byl poté přečištěn ethanolem, vysušen a poté se naštěpen restrikčními enzymy NcoI a SalI. Reakční směs byla po restrikci elektroforeticky rozdělena a byl vyizolován požadovaný fragment NcoI/Sal I.

V citované přihlášce je popsána plazmid pINT 91d, který kóduje mini-proinzulín. Sekvence kódující mini-proinzulín byla vyštěpena pomocí restrikčních enzymů NcoI a SalI a byl vyizolován zbývající plazmid. Do tohoto plazmidu byl vložen NcoI/SalI PCR fragment pomocí T4 ligázy za vzniku plazmidu pINT 125d. Tímto plazmidem byly transformovány bakterie E.coli K12, namnoženy a plazmid opětovně

vyizolován. Struktura plazmidu byla překontrolována pomocí DNA-sekvenování a restriční analýzy. Po této analýze byla DNA plazmidu pINT 125d použita jako templát pro vložení dalších mutací do této varianty genu pro proinzulín.

Příklad 2: Konstrukce proinzulínu Lys (B3) Glu (B29)

Pro přípravu mutovaných proteinů byly nasyntetizovány dva primery: primer 329 se sekvencí

5' TTC TAC ACA CCC GAG ACC CGC GGC ATC G - 3'

a primer 329b se sekvencí

5' GCC GCG GGT CTC GGG TGT GTA GAA GAA GC 3'

Jako templátu bylo použito DNA z plazmidů pINT125d a pINT91d. Primer 329a byl použit v PCR reakci spolu s primerem Insu 11 a plazmidem pINT 91d jakožto templátem a primer 329b byl použit v další PCR reakci s primerem Tir (viz příklad 1) a plazmidem pINT 125d. Vzhledem k tomu, že jsou oba produkty částečně komplementární, lze je spojit v další přímé PCR reakci s primery Tir a Insu 11. Vzniklý fragment DNA kóduje protein s požadovanou mutací. Tento fragment byl poté naštěpen enzymy NcoI a Sall a vzniklý NcoI/Sall fragment byl pomocí T4 ligázy vložen do zbytkového plazmidu pINT 91d.

Tímto postupem byl vytvořen plazmid pINT 329, který byl po amplifikaci v E.coli kmene K12 podroben sekvenční a restriční analýze, čímž byla ověřena jeho struktura.

Derivát proinzulínu kódovaný tímto plazmidem je charakterizován jak výše uvedenou záměnou aminokyselin tak i C-spojovacím peptidem, který sestává z argininu.

Příklad 3: Konstrukce proinzulínu Lys (B3) Ile (B27)

Konstrukce tohoto proinzulínu byla provedena způsobem popsaným v předešlém příkladu s tím, že bylo použito následujících párů primerů:

primer KB3 JB 27A se sekvencí

5' TTC TAC ATC CCC AAG ACC CGC CG 3'

spolu s primerem Insu 11 a

primer K B3 J 27B se sekvencí

5' CTT GGG GAT GTA GAA GAA GCC TCG 3'

spolu s primerem Tir.

Jako templát posloužil v obou PCR reakcích plazmid pINT 125d. Produkty obou reakcí byly spojeny třetí PCR reakcí tak, jak bylo popsáno v příkladu 1 a vzniklý produkt byl naklonován do plazmidu obdobným způsobem za vzniku plazmidu pINT332.

Příklad 4: Konstrukce proinzulínu Lys (B3) Ile (B28)

Konstrukce tohoto proinzulínu byla provedena způsobem popsaným v příkladu 3 s tím, že bylo použito následujících párů primerů:

primer KB3 JB 28A se sekvencí

5' TAC ACA ATC AAG ACC CGC CGG GAG - 3'

spolu s primerem Insu 11 a

primer KB J B28B se sekvencí

5' GGT CTT GAT TGT GTA GAA GAA GCC TCG - 3'

spolu s primerem Tir.

Způsobem obdobným výše popsanému byl vytvořen plazmid pINT 333.

Expres zkonstruovaných variant inzulínu

Bakterie *E. coli* kmene K12 byly transformovány pomocí plazmidů pINT 329, 332 a 333. Rekombinantní bakterie obsahující příslušné plazmidy byly kultivovány podle příkladu 4 Patentu Spojených států číslo 5227293. Tak byly připraveny požadované výchozí suroviny pro výrobu příslušných variant inzulínu.

Příklad 5: Konstrukce proinzulínu Lys (B3), Ile (B28), Asp (A21)

Konstrukce tohoto proinzulínu byla provedena způsobem popsaným v příkladu 3. Místo plazmidu pINT 125d však byl jakožto templát pro PCR reakci použit plazmid pINT 333, připravený v příkladu 4. Pro vložení mutace byly použity následující primery:

primer P-pint365

5'-TTTTTGTCTGACTATTAGTCGCAGTAGTTCTACCAGCTG-3'

a primer Tir.

Vzniklý plazmid byl označen pINT 365.

Příklad 6: Biologická aktivita inzulínu Lys(B3), Glu(B29) po intravenózní aplikaci králíkovi

Čas [h]	Lidský inzulín	Inzulín
		Lys (B3), Glu (B29)
0	100	100
0,25	89,17	89,47
0,5	67,56	58,32
0,75	73,24	66,59
1	73,13	68,21
1,5	78,12	71,95

Čas [h]	Lidský inzulín	Inzulín
		Lys(B3), Glu(B29)
2	89,47	80,88
3	107,01	94,2
4	104,55	99,78

8 králíků obdrželo intravenózně uvedený inzulín v dávce 0,2 IU/kg. V průběhu následujících čtyř hodin byly v uvedených okamžicích stanovovány koncentrace krevní glukózy a byly vztahovány k počáteční hodnotě v čase 0. Průměrné hodnoty nevykazují žádné významné rozdíly biologické aktivity mezi lidským inzulínem a inzulínem Lys(B3), Glu(B29).

Příklad 7: Biologická aktivita inzulínů Lys(B3), Ile(B27) a Lys(B3), Ile(B28) po intravenózní aplikaci králíkovi

6 králíků obdrželo intravenózně uvedený inzulín v dávce 0,2 IU/kg. V průběhu následujících čtyř hodin byly v uvedených okamžicích stanovovány koncentrace krevní glukózy a byly vztahovány k počáteční hodnotě v čase 0. Průměrné hodnoty nevykazují žádné významné rozdíly biologické aktivity mezi lidským inzulínem a inzulíny Lys(B3), Ile(B27) a Lys(B3), Ile(B28).

Čas [h]	Lidský inzulín	Inzulín Lys(B3), Ile(B27)	Inzulín Lys(B3), Ile(B28)
0	100	100	100
0,33	67,8	62,6	63,3
0,66	54,9	60,6	55,8
1	55,2	66,8	59,3
1,5	63	79,2	66,7

Čas [h]	Lidský inzulín	Inzulín Lys(B3), Ile(B27)	Inzulín Lys(B3), Ile(B28)
2	77,8	90,9	81,6
3	91,5	96,3	97,2
4	99,5	96	101,6

Příklad 8: Farmakodynamika inzulínu Lys(B3),Glu (B29) a Lys (B3),Ile (B28) po subkutánní aplikaci do psiho organismu

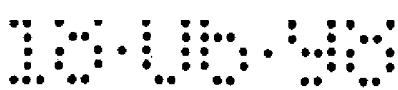
Psů (po čtyřech pro každý inzulín) byla subkutánně podána dávka 0,3 IU/kg inzulínu. Koncentrace krevní glukózy byla kontinuální infuzí udržována na 3,7 až 4 mmol/l. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty infúzní rychlosti glukózy $\pm$ střední chyba průměru (SEM). Hodnoty jsou uváděny v intervalu 0 (okamžik aplikace) až 240 minut.

Průběh koncentrací glukózy u hladovějících psů po podání derivátů
inzulínu s rychlým účinkem

Parametry profilu udávajícího rychlost infuze glukózy

Dávka činila 1 x 0,3 IU/kg subkutánně v t=0, n=4

Preparát	Vzestupná fáze		t _{max}	Sestupná fáze	
	Inflexní bod (min)	Směrnice v infl. bodě		Inflexní bod (min)	Směrnice v infl. bodě
H-inzulín Hoechst	43	0,144	100	156	-0,065
Inzulín Lys (B3), Glu(B29)	33	0,227	80	127	-0,091
Inzulín Lys(B3), Ile(B28)	16	0,267	60	104	-0,102



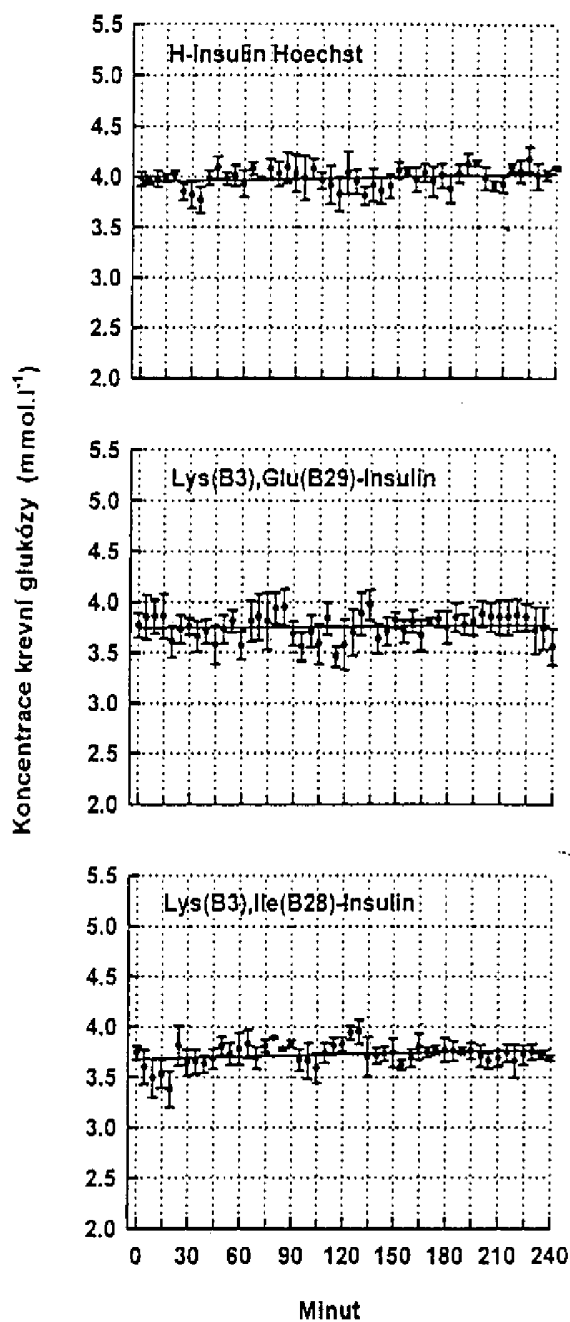
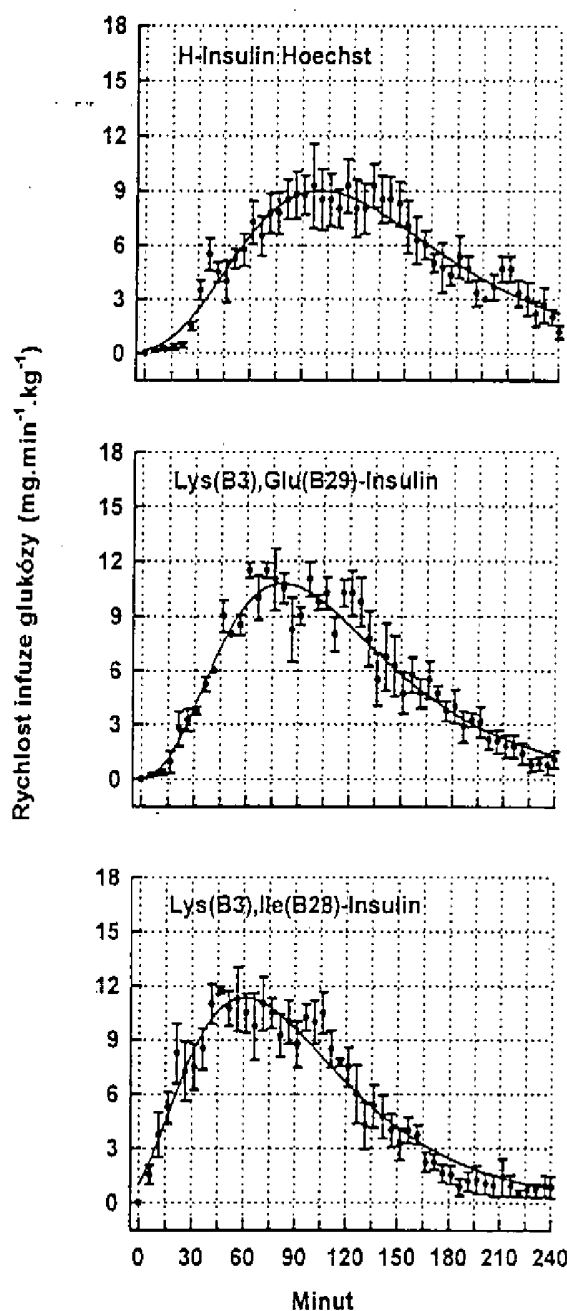
Průběh koncentrací glukózy u lačných psů po podání derivátů inzulínu s rychlým účinkem
(průměr ± SEM)
Dávka činila 1 x 0,3 IU/kg subkutánně v t=0

H-inzulín Hoechst										Inzulín Lys (B3), Glu(B29)										Inzulín Lys(B3), Ile(B28)									
rychlost infuze glukózy					koncentrace krevní glukózy					rychlost infuze glukózy					koncentrace krevní glukózy					rychlost infuze glukózy					koncentrace krevní glukózy				
mmol.l ⁻¹					mmol.l ⁻¹					mmol.l ⁻¹					mmol.l ⁻¹					mmol.l ⁻¹					mmol.l ⁻¹				
Čas	průměr	SEM	Čas	průměr	SEM	Čas	průměr	SEM	Čas	průměr	SEM	Čas	průměr	SEM	Čas	průměr	SEM	Čas	průměr	SEM	Čas	průměr	SEM	Čas	průměr	SEM	Čas	průměr	SEM
0	0,00	0,00	0	3,98	0,07	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0	3,77	0,12	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0	3,74	0,07	0	0,00	0,00	0	3,74	0,07
6	0,14	0,01	4	3,97	0,04	6	0,24	0,08	5	3,85	0,22	6	1,54	0,53	4	3,60	0,17	4	1,54	0,53	4	3,60	0,17	4	1,54	0,53	4	3,60	0,17
11	0,23	0,08	9	3,98	0,08	11	0,36	0,18	10	3,86	0,17	11	3,75	1,24	10	3,49	0,19	10	3,75	1,24	10	3,49	0,19	10	3,75	1,24	10	3,49	0,19
16	0,35	0,19	14	3,99	0,04	16	0,95	0,60	15	3,86	0,22	16	5,25	0,89	15	3,53	0,14	15	5,25	0,89	15	3,53	0,14	15	5,25	0,89	15	3,53	0,14
21	0,44	0,18	19	4,01	0,05	21	2,75	0,96	20	3,61	0,16	21	8,25	1,67	20	3,38	0,18	20	8,25	1,67	20	3,38	0,18	20	8,25	1,67	20	3,38	0,18
26	1,50	0,25	24	3,85	0,08	26	3,25	0,65	25	3,73	0,14	26	7,25	1,63	25	3,81	0,20	25	7,25	1,63	25	3,81	0,20	25	7,25	1,63	25	3,81	0,20
31	3,50	0,56	29	3,82	0,13	31	3,75	0,22	30	3,76	0,08	31	7,50	1,25	30	3,64	0,13	30	7,50	1,25	30	3,64	0,13	30	7,50	1,25	30	3,64	0,13
36	5,50	0,90	34	3,77	0,13	36	5,25	0,41	35	3,66	0,15	36	8,50	1,15	35	3,65	0,12	35	8,50	1,15	35	3,65	0,12	35	8,50	1,15	35	3,65	0,12
41	4,50	0,56	39	3,89	0,07	41	6,00	0,00	40	3,71	0,12	41	11,00	1,12	40	3,63	0,09	40	11,00	1,12	40	3,63	0,09	40	11,00	1,12	40	3,63	0,09
46	4,00	1,17	44	4,09	0,11	46	9,00	0,87	45	3,58	0,19	46	11,75	0,22	45	3,68	0,10	45	11,75	0,22	45	3,68	0,10	45	11,75	0,22	45	3,68	0,10
51	5,25	0,54	49	3,98	0,06	51	8,00	0,00	50	3,73	0,14	51	10,75	0,96	50	3,81	0,09	50	10,75	0,96	50	3,81	0,09	50	10,75	0,96	50	3,81	0,09
56	5,75	0,89	54	4,01	0,10	56	8,50	0,56	55	3,81	0,11	56	11,25	1,78	55	3,73	0,11	55	11,25	1,78	55	3,73	0,11	55	11,25	1,78	55	3,73	0,11
61	7,25	1,19	59	3,93	0,13	61	11,50	0,43	60	3,57	0,14	61	10,50	1,09	60	3,78	0,16	60	10,50	1,09	60	3,78	0,16	60	10,50	1,09	60	3,78	0,16
66	6,50	1,09	84	4,08	0,06	67	10,00	1,22	65	3,81	0,20	66	9,75	1,85	65	3,83	0,14	65	9,75	1,85	65	3,83	0,14	65	9,75	1,85	65	3,83	0,14
71	7,75	1,08	69	3,98	0,01	71	11,50	0,43	70	3,85	0,23	71	11,00	1,50	70	3,69	0,11	70	11,00	1,50	70	3,69	0,11	70	11,00	1,50	70	3,69	0,11
76	7,75	1,14	74	4,08	0,10	76	11,00	1,70	75	3,81	0,28	76	10,50	0,83	75	3,81	0,06	75	10,50	0,83	75	3,81	0,06	75	10,50	0,83	75	3,81	0,06
81	8,50	1,09	79	4,03	0,12	81	10,50	0,83	80	3,84	0,15	81	9,25	1,19	80	3,89	0,01	80	9,25	1,19	80	3,89	0,01	80	9,25	1,19	80	3,89	0,01
86	8,75	1,29	84	4,09	0,15	86	8,25	1,75	85	3,95	0,18	86	10,00	1,22	85	3,78	0,02	85	10,00	1,22	85	3,78	0,02	85	10,00	1,22	85	3,78	0,02
91	8,75	1,08	89	4,03	0,18	91	9,00	0,50	90	3,89	0,12	91	8,75	1,29	90	3,83	0,04	90	8,75	1,29	90	3,83	0,04	90	8,75	1,29	90	3,83	0,04
96	9,25	2,33	94	3,99	0,22	96	11,00	0,94	95	3,58	0,14	96	10,25	0,74	95	3,67	0,11	95	10,25	0,74	95	3,67	0,11	95	10,25	0,74	95	3,67	0,11
101	8,50	1,68	99	4,08	0,10	101	9,75	0,41	100	3,71	0,16	101	10,00	1,22	100	3,66	0,18	100	10,00	1,22	100	3,66	0,18	100	10,00	1,22	100	3,66	0,18
106	8,50	1,44	104	3,96	0,08	106	10,25	0,89	105	3,59	0,20	106	10,50	1,15	105	3,59	0,15	105	10,50	1,15	105	3,59	0,15	105	10,50	1,15	105	3,59	0,15
111	8,00	1,06	109	3,82	0,19	111	8,00	0,94	110	3,84	0,16	111	8,50	1,03	110	3,74	0,10	110	8,50	1,03	110	3,74	0,10	110	8,50	1,03	110	3,74	0,10
116	9,25	1,47	114	3,83	0,17	116	10,25	0,74	115	3,45	0,10	116	7,75	0,22	115	3,81	0,08	115	7,75	0,22	115	3,81	0,08	115	7,75	0,22	115	3,81	0,08
121	8,00	1,58	119	4,04	0,21	121	10,25	1,24	120	3,58	0,25	121	7,50	1,09	120	3,63	0,07	120	7,50	1,09	120	3,63	0,07	120	7,50	1,09	120	3,63	0,07
126	8,00	1,37	124	3,95	0,12	126	9,75	1,34	125	3,70	0,23	126	6,00	1,62	125	3,94	0,07	125	6,00	1,62	125	3,94	0,07	125	6,00	1,62	125	3,94	0,07
131	9,25	1,19	129	3,81	0,09	131	7,75	1,52	130	3,88	0,21	131	4,25	1,29	130	3,95	0,12	130	4,25	1,29	130	3,95	0,12	130	4,25	1,29	130	3,95	0,12
136	8,50	1,30	134	3,92	0,16	136	5,50	1,44	135	3,97	0,15	136	5,33	1,19	135	3,70	0,20	135	5,33	1,19	135	3,70	0,20	135	5,33	1,19	135	3,70	0,20
141	8,50	1,25	139	3,86	0,13	141	6,75	1,85	140	3,64	0,15	141	4,75	1,19	140	3,71	0,08	140	4,75	1,19	140	3,71	0,08	140	4,75	1,19	140	3,71	0,08
146	8,25	1,24	144	3,91	0,12	146	6,25	1,67	145	3,71	0,14	146	4,00	0,94	145	3,73	0,07	145	4,00	0,94	145	3,73	0,07	145	4,00	0,94	145	3,73	0,07

Průběh koncentrací glukózy u hladovějících psů po podání
derivátů inzulínu s rychlým účinkem

Dávka činila $1 \times 0,3$ IU/kg subkutánně v $t=0$

formát dat (průměr $\pm$ SEM)



INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 1:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 21 aminokyseliní
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) POČET VLÁKEN: jedno
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: protein
 (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID.Č: 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 Asn
 20

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 2:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 30 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) POČET VLÁKEN: jedno
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: protein
 (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 30

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID.Č: 2

Phe Val Asn 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 Thr
 20 25 30

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: protein
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 30

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID.Č: 3

Phe	Val	Lys	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	Glu	Thr		
		20					25						30		

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: protein
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 30

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID.Č: 4

Phe	Val	Lys	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	Ile	Lys	Thr		
		20					25						30		

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 30 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) POČET VLÁKEN: jedno

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

(A) JMÉNO/KLÍČ: protein

(B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 30

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID.Č: 5

Phe Val Lys 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 Ile Pro Lys Thr
 20 25 30

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 97 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) POČET VLÁKEN: jedno

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

(A) JMÉNO/KLÍČ: protein

(B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 97

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID.Č: 6

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His
 1 5 10 15

Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu
 20 25 30

Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro
 35 40 45

Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu
50 55 60

Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu
65 70 75 80

Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
85 90 95
Asn

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKQUENCE:

- (A) DÉLKA: 97 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: protein
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 97

(xi) POPIS SEKQUENCE: SEKQUENCE ID.Č: 7

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His
1 5 10 15

Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu
20 25 30

Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro
35 40 45

Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu
50 55 60

Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu
65 70 75 80

Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
85 90 95

Asn

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 8:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 97aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) POČET VLÁKEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

- (ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:
 - (A) JMÉNO/KLÍČ: protein
 - (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 97

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID.Č: 8

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

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 9:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 21 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) POČET VLÁKEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

- (ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:
 - (A) JMÉNO/KLÍČ: protein

(B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID.Č: 9

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

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 30 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) POČET VLÁKEN: jedno

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

(A) JMÉNO/KLÍČ: protein

(B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 30

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID.Č: 10

Phe Val Lys 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 Ile Lys Thr
 20 25 30

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 97 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) POČET VLÁKEN: jedno

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

(A) JMÉNO/KLÍČ: protein

(B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 97

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID.Č: 11

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His
1 5 10 15

Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu
20 25 30

Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro
35 40 45

Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu
50 55 60

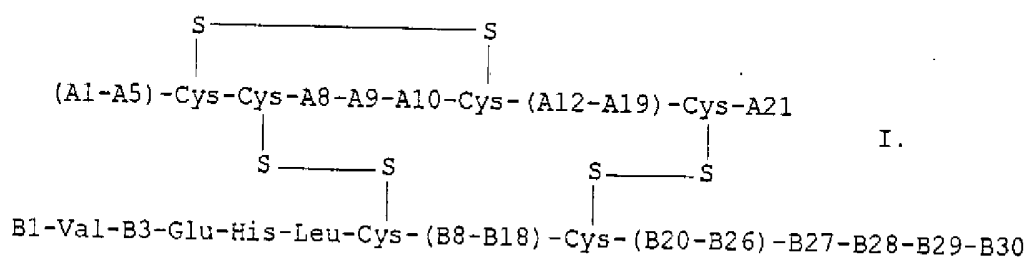
Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu
65 70 75 80

Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
85 90 95

Asp

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl, kde aminokyselina asparagin (Asp) v pozici B3 řetězce B je nahrazena přirozeně se vyskytující bazickou aminokyselinou a alespoň jedna z aminokyselin v pozicích B27, B28 nebo B29 řetězce B je nahrazena jinou přirozenou neutrální nebo kyselou aminokyselinou přičemž může být rovněž asparagin v pozici A21 řetězce A nahrazen aminokyselinami Asp, Gly, Ser, Thr nebo Ala a aminokyselina fenylalanin (Phe) v pozici B1 řetězce B a aminokyselina v pozici B30 řetězce B mohou zcela chybět.
2. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 1, obecného vzorce I



kde

- (A1-A5) jsou aminokyselinové zbytky v pozicích A1 až A5 řetězce A lidského nebo zvířecího inzulínu
- (A12-A19) jsou aminokyselinové zbytky v pozicích A12 až A19 řetězce A lidského nebo zvířecího inzulínu
- A21 je Asn, Asp, Gly, Ser, Thr nebo Ala

- (B8-B18) jsou aminokyselinové zbytky v pozicích B8 až B18 řetězce B lidského nebo zvířecího inzulínu
- (B20-B26) jsou aminokyselinové zbytky v pozicích B20 až B26 řetězce B lidského nebo zvířecího inzulínu
- A8, A9, A10 jsou aminokyselinové zbytky v pozicích A8, A9 a A10 řetězce A lidského nebo zvířecího inzulínu
- B30 je OH nebo aminokyselinový zbytek v pozici B30 řetězce B lidského nebo zvířecího inzulínu
- B1 je zbytek aminokyseliny fenylalaninu (Phe) nebo vodíkový atom
- B27, B28 a B29 jsou aminokyselinové zbytky v pozici B27, B28 a B29 řetězce B lidského nebo zvířecího inzulínu nebo vždy jeden jiný přirozeně se vyskytující aminokyselinový zbytek, přičemž vždy alespoň jeden ze zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B je nahrazen přirozeně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem který je vybrán ze skupiny tvořené neutrálními nebo kyselými aminokyselinami.

3. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl obecného vzorce I podle nároku 2, ve kterém

- A8 je alanin (Ala),
- A9 je serin (Ser),
- A10 je valin (Val) a
- B30 je alanin (Ala).

4. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 2, ve kterém
 - A8 je threonin (Thr),
 - A9 je serin (Ser) a
 - A10 je isoleucin (Ile).
5. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 4 obecného vzorce I, ve kterém symbol B30 znamená alanin (Ala).
6. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 4 obecného vzorce I, ve kterém symbol B30 ve Vzorci I. znamená threonin (Thr).
7. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 6 obecného vzorce I, ve kterém symboly znamenají
 - (A1-A5) jsou aminokyselinové zbytky v pozicích A1 až A5 řetězce A lidského inzulínu
 - (A12-A19) jsou aminokyselinové zbytky v pozicích A12 až A19 řetězce A lidského inzulínu
 - (B8-B18) jsou aminokyselinové zbytky v pozicích B8 až B18 řetězce B lidského nebo zvířecího inzulínu
 - (B20-B26) jsou aminokyselinové zbytky v pozicích B20 až B26 řetězce B lidského nebo zvířecího inzulínu
8. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle alespoň jednoho z nároků 1 až 7, ve kterém

aminokyselinový zbytek v pozici B1 řetězce B je zbytek aminokyseliny fenylalaninu (Phe).

9. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle alespoň jednoho z nároků 1 až 8, ve kterém aminokyselinový zbytek v pozici B3 řetězce B je zbytek aminokyseliny histidinu (His), lysinu (Lys) nebo argininu (Arg).
10. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 9, ve kterém aminokyselinový zbytek v pozici B3 řetězce B je zbytek aminokyseliny histidinu (His).
11. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 9, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B3 řetězce B zbytkem aminokyseliny argininu (Arg).
12. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 9, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B3 řetězce B zbytkem aminokyseliny lysinu (Lys).
13. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle alespoň jednoho z nároků 1 až 12, ve kterém alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B přísluší přirozeně se vyskytující aminokyselině, která je vybrána ze skupiny tvořené isoleucinem (Ile), kyselinou asparagovou (Asp) a kyselinou glutamovou (Glu).

14. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle alespoň jednoho z nároků 1 až 13, ve kterém alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B přísluší přirozeně se vyskytující aminokyselině, která je vybrána ze skupiny tvořené kyselými aminokyselinami.
15. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 14, ve kterém je alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B zbytkem kyseliny asparagové (Asp).
16. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 14, ve kterém je alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B zbytkem kyseliny glutamové.
17. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle alespoň jednoho z nároků 1 až 13, ve kterém alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B přísluší přirozeně se vyskytující aminokyselině, která je vybrána ze skupiny tvořené neutrálními aminokyselinami.
18. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 17, ve kterém je alespoň jeden z aminokyselinových zbytků v pozicích B27, B28 a B29 řetězce B zbytkem aminokyseliny isoleucinu (Ile).
19. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 15, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B27 řetězce B zbytkem kyseliny asparagové (Asp).

20. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 15, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B28 řetězce B zbytkem kyseliny asparagové (Asp).
21. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 15, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B29 řetězce B zbytkem kyseliny asparagové (Asp).
22. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 16, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B27 řetězce B je zbytkem kyseliny glutamové (Glu).
23. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 16, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B28 řetězce B zbytkem kyseliny glutamové (Glu).
24. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 16, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B29 řetězce B zbytkem kyseliny glutamové (Glu).
25. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 18, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B28 řetězce B zbytkem aminokyselinu isoleucinu (Ile).
26. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle alespoň jednoho z nároků 1 až 25, ve kterém je

aminokyselinový zbytek v pozici A21 řetězce A zbytkem kyseliny asparagové (Asp).

27. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 26, ve kterém řetězec A obsahuje sekvenci Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asp (Sekvence id.č.: 9)

a řetězec B obsahuje sekvenci

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr (Sekvence id.č.: 10).

28. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 24, ve kterém řetězec B obsahuje sekvenci Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr (Sekvence id.č.: 3).

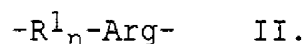
29. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 18, ve kterém je aminokyselinový zbytek v pozici B27 řetězce B zbytkem aminokyseliny isoleucinu (Ile).

30. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 29, ve kterém řetězec B obsahuje sekvenci Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr (Sekvence id.č.: 5).

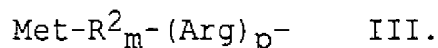
31. Derivát inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 25, ve kterém řetězec B obsahuje sekvenci

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu
Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr
Thr Ile Lys Thr (Sekvence id.č.: 4).

32. Způsob přípravy derivátu inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelné soli podle alespoň jednoho z nároků 1 až 30 v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje konstrukci replikovatelného expresivního přenašeče, který obsahuje sekvenci DNA kódující prekurzor derivátu inzulínu, v němž je aminokyselinový zbytek v pozici A1 řetězce A spojen s aminokyselinovým zbytkem B30 řetězce B peptidovým řetězcem podle vzorce II



kde R^1_n značí peptid s n aminokyselinovými zbytky a n je celé číslo z intervalu 0 až 34 a řetězec B je v pozici B1 prodloužen peptidovým řetězcem podle vzorce III



kde R^2_m je peptid s m aminokyselinovými zbytky a m je celé číslo z intervalu 0 až 40 a p je 0, 1 nebo 2 a dále zahrnuje expresi v hostitelských buňkách a postranslační úpravy derivátu inzulínu z prekurzoru chemickým a/nebo enzymatickým způsobem.

33. Způsob podle nároku 32 v y z n a č u j í c í s e t í m , že hostitelská buňka je buňka bakteriální.
34. Způsob podle nároku 33 v y z n a č u j í c í s e t í m , že bakteriální buňka je E. coli.

35. Způsob podle nároku 32 v y z n a ě u j í c í s e t í m , že hostitelská buňka je kvasinka.

36. Způsob podle nároku 35 v y z n a ě u j í c í s e t í m , že kvasinka je *Sacharomyces cerevisiae*.

37. Způsob podle libovolného z nároků 32 až 36 na přípravu derivátu inzulinu podle nároku 26 v y z n a ě u j í c í s e t í m , že prekursor inzulinu obsahuje sekvenci

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val
Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile
Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln
Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln
Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile
Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu Glu Asn Tyr Cys Asp (Sekvence id. č.:11).

38. Způsob podle libovolného z nároků 32 až 36 na přípravu derivátu inzulinu podle nároku 28 v y z n a ě u j í c í s e t í m , že prekursor inzulinu obsahuje sekvenci

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val
Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro
Glu Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln
Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln
Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile
Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn (Sekvence id. č.:6).

39. Způsob podle libovolného z nároků 32 až 36 na přípravu derivátu inzulínu podle nároku 30 v y z n a č u j í c í s e t í m , že prekurzor inzulínu obsahuje sekvenci

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val
Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro
Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln
Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln
Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile
Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn (Sekvence id. č.:8).

40. Způsob podle libovolného z nároků 32 až 36 na přípravu derivátu inzulínu podle nároku 31 v y z n a č u j í c í s e t í m , že prekurzor inzulínu obsahuje sekvenci

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val
Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile
Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln
Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln
Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile
Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn (Sekvence id. č.:7).

41. Prekurzor derivátu inzulínu podle nároku 37.
42. Prekurzor derivátu inzulínu podle nároku 38.
43. Prekurzor derivátu inzulínu podle nároku 39.

44. Prekurzor derivátu inzulínu podle nároku 40.
45. Sekvence DNA, která kóduje prekurzor inzulínu podle nároku 41.
46. Sekvence DNA, která kóduje prekurzor inzulínu podle nároku 42.
47. Sekvence DNA, která kóduje prekurzor inzulínu podle nároku 43.
48. Sekvence DNA, která kóduje prekurzor inzulínu podle nároku 44.
49. Expresivní přenašeč v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje sekvenci DNA podle nároku 45.
50. Expresivní přenašeč v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje sekvenci DNA podle nároku 46.
51. Expresivní přenašeč v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje sekvenci DNA podle nároku 47.
52. Expresivní přenašeč v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje sekvenci DNA podle nároku 48.
53. Hostitelská buňka transformovaná expresivním přenašečem podle libovolného z nároků 49 až 52.
54. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje alespoň jeden derivát inzulínu

a/nebo jeho fyziologicky přijatelnou sůl podle alespoň jednoho z nároků 1 až 30.

55. Farmaceutický přípravek podle nároku 54 v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje derivát inzulínu a/nebo jeho fyziologicky přijatelnou sůl v rozpuštěné , amorfni nebo krystalické formě.
56. Farmaceutický přípravek podle nároku 54 v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále obsahuje depotní pomocnou látku.
57. Farmaceutický přípravek podle nároku 56 v y z n a č u j í c í s e t í m , že depotní pomocná látka je protamin sulfát a derivát inzulínu a/nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl jsou ve formě společného krystalu.
58. Injikovatelný roztok s inzulínovou aktivitou v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje farmaceutický přípravek podle libovolného z nároků 54 až 56 v rozpuštěné formě.
59. Použití derivátu inzulínu a/nebo jeho fyziologicky přijatelné soli podle alespoň jednoho z nároků 1 až 31 k výrobě farmaceutického přípravku, který vykazuje inzulínovou aktivity s rychlým účinkem.