

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2004-710

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

C 07 K 14/62

A 61 K 38/28

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.12.2002**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **20.12.2001 27.09.2002**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/344310 2002/414604**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2005**

(Věstník č. 2/2005)

(86) PCT číslo: **PCT/US2002/037601**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2003/053339**

(71) Přihlašovatel:

ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US

(72) Původce:

Beals John Michael, Indianapolis, IN, US
DeFelippis Michael Rosario, Carmel, IN, US
DiMarchi Richard Dennis, Carmel, IN, US
Kohn Wayne David, Indianapolis, IN, US
Micanovic Radmila, Indianapolis, IN, US
Myers Sharon Ruth, Indianapolis, IN, US
Ng Kingman, Carmel, IN, US
Zhang Lianshan, Carmel, IN, US

(74) Zástupce:

Společná advokátní kancelář Všetečka Zelený Švorčík
Kalenský a partneři, JUDr. Otakar Švorčík, Hálkova 2,
Praha 2, 12000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Inzulínová sloučenina s protrahovaným
účinkem

(57) Anotace:

Řešení se týká inzulínové sloučeniny, která poskytuje protrahovanou a dokonce bazální dobu působení. Inzulínová sloučenina zahrnuje modifikaci v N-terminální části řetězce A a popřípadě modifikaci v N-terminální části řetězce B, modifikaci lysinu řetězce B a popřípadě modifikaci v C-terminální části řetězce A. Řešení se také týká způsobu léčení diabetu mellitu, který zahrnuje podávání inzulínové sloučeniny.

CZ 2004 - 710 A3

JUDr. Otakar Švorčík
advokát
Hálkova 2, 120 00 Praha 2

05.11.04 P 1004-710

Inzulínová sloučenina s protrahovaným účinkem

Tato předložená přihláška vynálezu požívá prioritní právo přihlášky vynálezu U.S. č. 60/344,310, přihlášené dne 20 prosince 2001 a U.S. přihlášky vynálezu č. 60/414,604, přihlášené dne 27 září 2002, které jsou zde uvedeny jako reference ve svých plných verzích.

Oblast techniky

Předložený vynález se vztahuje k inzulínovým sloučeninám, které jsou užitečné pro léčbu hyporglykemie, která je charakteristická pro diabetes mellitus.

Dosavadní stav techniky

Fyziologická potřeba inzulínu se může rozdělit do dvou fází: (a) fáze absorpce živin, která vyžaduje dávku inzulínu pro odstranění náporu krevní glukózy, která je spojena s přísunem jídla a (b) post-absorbční fázi vyžadující neustálou dodávku inzulínu za účelem regulace jaterního výdeje glukózy za účelem udržení optimální hladiny glukózy v lačném stavu, která je také známá jako bazální "sekrece" inzulínu.

Účinná terapie inzulínem u lidí, kteří jsou postiženi diabetem, obecně zahrnuje kombinované použití dvou typů exogenních formulací inzulínu: rychle účinkující inzulín

pro pokrytí příjmu potravy, který se podává jako injekční bolus a déle účinkující inzulin, podáváný injekcí jednou nebo dvakrát denní za účelem kontroly hladin krevní glukózy mezi příjmy potravy.

Ideální exogení bazální inzulin by zajišťoval prodloužený a "plochý" účinek rozložený v čase, to znamená, že by kontroloval hladinu krevní glukózy po dobu alespoň 12 hodin a výhodně po dobu 24 hodin, bez významného rizika hypoglykemie.

Komerčně dostupné déle účinkující inzulinové sloučeniny neposkytují účinek inzulinu po dobu 24 hodin. V souladu s tím existuje potřeba inzulinové sloučeniny, která by měla účinek inzulinu po dobu až 24 hodin.

Předmět vynálezu

Předložený vynález se týká inzulinové sloučeniny sestávající z

(a) řetězce A obecného vzorce I,

A-1 A0 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13
Xaa-Xaa-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-

A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21

Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa,

kde aminokyselinová sekvence obecného vzorce I je znázorněna v Sekv. ID č. 1, a

(b) řetězce B obecného vzorce II,

B-1 B0 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12
Xaa-Xaa-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-

B13 B14 B15 B16 B17 B18 B19 B20 B21 B22 B23 B24 B25 B26 B27
Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-

B28 B29 B30
Xaa-Xaa-Xaa,

kde aminokyselinová sekvence obecného vzorce II je znázorněna v Sekv. ID č. 2, kde

Xaa v poloze A-1 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze A0 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl arginin;

Xaa v poloze A21 je geneticky kódovatelná aminokyselina;

Xaa v poloze B-1 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,

derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino
homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze B0 představuje Arg, derivatizovaný Arg,
homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,
derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidin
homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze B28 je Lys nebo Pro;

Xaa v poloze B29 je Lys nebo Pro;

Xaa v poloze B30 je Thr, Ala nebo je nepřítomný;

jeden z Xaa v poloze B28 nebo Xaa v poloze B29 je Lys;

Xaa v poloze B28 a Xaa v poloze B29 nejsou oba Lys;

a ϵ -amino skupina Lys v poloze B28 nebo B29 je kovalentně
vázaná k α -karboxylové skupině kladně nabitě aminokyseliny
za účelem přípravy Lys-N ^{ϵ} -aminokyselinového derivátu.

Předložený vynález se také týká způsobu pro léčbu diabetu
mellitu, přičemž způsob zahrnuje podávání subjektu
inzulínové sloučeniny podle předloženého vynálezu v
množství, které je dostatečné pro regulaci koncentrace
krevní hladiny glukózy.

Předložený vynález se také týká mikrokryсталů zahrnujících inzulinovou sloučeninu podle předloženého vynálezu, způsobů pro přípravu mikrokryсталů a způsobu pro léčbu diabetu podáváním mikrokryсталů.

Předložený vynález se také týká přípravku v suspenzi zahrnující z nerozpustné fáze a fáze roztoku, nerozpustná fáze zahrnuje mikrokryстал podle předloženého vynálezu a fáze roztoku zahrnuje vodu. Předložený vynález se také týká způsobu pro přípravu přípravku v suspenzi.

Předložený vynález se také týká způsobu pro léčbu diabetu mellitu, přičemž způsob sestává z podávání přípravku v suspenzi subjektu v množství, které je dostatečné pro regulaci koncentrace krevní hladiny glukózy u subjektu.

Předložený vynález se také týká způsobu pro přípravu přípravku v suspenzi. Předložený vynález se také týká způsobu léčby diabetu mellitu, přičemž způsob zahrnuje podávání přípravku v suspenzi subjektu v množství, které je dostatečné pro regulaci koncentrace krevní hladiny glukózy u subjektu.

Předložený vynález se také týká způsobu pro přípravu inzulinové sloučeniny, sestávajícího z: (a) acylace každé volné amino skupiny templátu inzulinu chráněnou aminokyselinou nebo derivátem chráněné aminokyseliny za účelem přípravy acylované inzulinové sloučeniny; (b) čištění acylované inzulinové sloučeniny; (c) odstranění ochranné skupiny za každé chráněné aminokyseliny nebo

derivátu chráněné aminokyseliny za účelem přípravy
nechráněné acylované inzulínové sloučeniny; a (d) čištění
nechráněné acylované inzulínové sloučeniny. V jednom
výhodném provedení je chráněnou aminokyselinou chráněný Arg
a aminokyselina je Arg. V jiném výhodném provedení je
chráněnou aminokyselinou chráněný Lys a aminokyselinou je
Lys.

Stručný popis obecného vzorce

Obecný vzorec 1 znázorňuje Lys-N^ε-Arg derivát, který se
získá tvorbou kovalentní vazby mezi ε-amino skupinou Lys a
α-karboxylovou skupinou Arg.

Popis předloženého vynálezu

V jednom výhodném provedení se předložený vynález týká
inzulínové sloučeniny zahrnující modifikaci na jednom nebo
více místech N-terminálního konce inzulínového řetězce A,
C-terminálního konce inzulínového řetězce A, N-terminálního
konce inzulínového řetězce B a lysinu řetězce B.

V jiném výhodném provedení inzulínová sloučenina podle
předloženého vynálezu zahrnuje modifikaci N-terminálního
konce řetězce A, modifikaci N-terminálního konce řetězce B,
modifikaci lysinu řetězce B a popřípadě modifikaci C-
terminálního konce řetězce A. Takovou sloučeninou je
příklad taková inzulínová sloučenina, ve které byl Arg
kovalentně vázán k N-terminálnímu konci řetězce A, Arg byl

kovalentně vázán k N-terminálnímu konci řetězce B, Lys řetězce B byl modifikován a popřípadě C-koncová aminokyselina řetězce A byla substituována jinou aminokyselinou jako je Gly.

V jiném výhodném provedení inzulinová sloučenina podle předloženého vynálezu zahrnuje modifikaci N-terminálního konce řetězce A, modifikaci lysinu řetězce B a popřípadě modifikaci C-terminálního konce řetězce A. Takovou inzulinovou sloučeninu je taková, kde byl kovalentně vázán Arg k N-terminálnímu konci řetězce A, Lys řetězce B byl modifikován a popřípadě C-koncová aminokyselina řetězce A byla substituována jinou aminokyselinou jako je Gly.

V jiném výhodném provedení se předložený vynález týká inzulinové sloučeniny, která sestává z

(a) řetězce A obecného vzorce I,

A-1 A0 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13
Xaa-Xaa-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-

A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21

Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa,

kde aminokyselinová sekvence obecného vzorce I je znázorněna v Sekv. ID č. 1, a

(b) řetězce B obecného vzorce II,

B-1 B0 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12

Xaa-Xaa-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-

B13 B14 B15 B16 B17 B18 B19 B20 B21 B22 B23 B24 B25 B26 B27
Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-

B28 B29 B30
Xaa-Xaa-Xaa,

kde aminokyselinová sekvence obecného vzorce II je
znázorněna v Sekv. ID č. 2, kde

Xaa v poloze A-1 představuje Arg, derivatizovaný Arg,
homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,
derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino
homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze A0 představuje Arg, derivatizovaný Arg,
homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,
derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino
homoarginin nebo alfa methyl arginin;

Xaa v poloze A21 je geneticky kódovatelná aminokyselina;

Xaa v poloze B-1 představuje Arg, derivatizovaný Arg,
homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,
derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidine
homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze B0 představuje Arg, derivatizovaný Arg,
homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,

derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino
homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze B28 je Lys nebo Pro;

Xaa v poloze B29 je Lys nebo Pro;

Xaa v poloze B30 je Thr, Ala nebo je nepřítomný;

jeden z Xaa v poloze B28 nebo Xaa v poloze B29 je Lys;

Xaa v poloze B28 a Xaa v poloze B29 nejsou oba Lys; a

ϵ -amino skupina Lys v poloze B28 nebo B29 je kovalentně
vázaná k α -karboxylové skupině kladně nabitě
aminokyseliny.

Podle jednoho výhodného provedení přihlášky vynálezu je Xaa
v poloze A-1 je nepřítomný, Xaa v poloze A0 představuje
Arg, derivatizovaný Arg, desaminoarginin, Lys,
derivatizovaný Lys, alfa guanidino homoarginin nebo alfa
methyl arginin, Xaa v poloze B-1 je nepřítomný a Xaa v
poloze B0 představuje Arg, derivatizovaný Arg,
desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, alfa guanidino
homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný.

Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je Xaa
v poloze A-1 je nepřítomný, Xaa v poloze A0 představuje

Arg, Xaa v poloze B-1 je nepřítomný a Xaa v poloze B0 je nepřítomný.

Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je Xaa v poloze A-1 je nepřítomný, Xaa v poloze A0 je derivatizovaný Lys, Xaa v poloze B-1 je nepřítomný a Xaa v poloze B0 je nepřítomný.

"Obecný vzorec I" je

A-1 A0 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13
Xaa-Xaa-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-

A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21
Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa,

a je aminokyselinová sekvence obecného vzorce I znázorněna v Sekv. ID č. 1. Aminokyseliny v pozicích A-1 až A21 obecného vzorce I odpovídají, s ohledem na pořadí, aminokyselinám v pozicích 1-23 Sekv. ID č. 1. Aminokyseliny v pozicích A1 až A20 obecného vzorce I a v pozicích 3-22 Sekv. ID č. 1 odpovídají aminokyselinám v pozicích 1-20 řetězce A lidského inzulinu (Sekv. ID č. 3).

"Obecný vzorec II" je

B-1 B0 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12
Xaa-Xaa-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-

B13 B14 B15 B16 B17 B18 B19 B20 B21 B22 B23 B24 B25 B26 B27
Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-

B28 B29 B30

Xaa-Xaa-Xaa,

a je aminokyselinová sekvence obecného vzorce II znázorněna v Sekv. ID č. 2. Aminokyseliny v pozicích B-1 až B30 obecného vzorce II odpovídají, s ohledem na pořadí, aminokyselinám v pozicích 1-32 Sekv. ID č. 2. Aminokyseliny v pozicích B 1 to B27 obecného vzorce II a v pozicích 3-29 Sekv. ID č. 2 odpovídají aminokyselinám v pozicích 1-27 řetězce B lidského inzulínu (Sekv. ID č. 4).

Polynukleotidové a aminokyselinové sekvence inzulínové sloučeniny od členů různých druhů jsou dobře známy odborníkovi v oboru. Výhodně představuje "inzulín" lidský inzulín. "Lidský inzulín" má dvaceti-jedna aminokyselinový řetězec A, který sestává z

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (Sekv. ID č. 3),

a třiceti-aminokyselinový řetězec B, který sestává z

Phe-Val-Asn-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-Lys-Thr (Sekv. ID č. 4).

Řetězce A a B lidského inzulínu jsou zkříženě vázány disulfidovými vazbami. Jedna meziřetězcová disulfidová vazba je mezi Cys v poloze A7 obecného vzorce I a Cys v

poloze B7 obecného vzorce II a jiná meziřetězcová disulfidová vazba je mezi Cys v poloze A20 obecného vzorce I a Cys v poloze B19 obecného vzorce II. Meziřetězcová disulfidová vazba je mezi Cystiny v pozicích A6 a A11 obecného vzorce I.

Výraz "hostitelská buňka" se vztahuje k jak jedné hostitelské buňce a tak k více než jedné hostitelské buňce.

"Inzulínová sloučenina" ve zde uvedeném významu zahrnuje inzulíny divokého typu, inzulínové deriváty a inzulínová analoga.

"Pozitivně nabitá aminokyselina" je přirozená nebo v přírodě se nevyskytující aminokyselina, která má výsledný kladný náboj při hodnotě pH, která se rovná 6,0. V jednom výhodném provedení přihlášky vynálezu je kladně nabitou aminokyselinou Arg. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je kladně nabitou aminokyselinou Lys.

"Inzulínový derivát" ve zde užívaném smyslu představuje inzulínovou sloučeninu, kde Lys je derivatizovaný za účelem přípravy kovalentní vazby mezi ϵ -amino skupinou ($-N\epsilon$) od Lys a jiné skupiny. Podle jednoho výhodného provedení přihlášky vynálezu je Lys řetězce A derivatizovaný za účelem přípravy kovalentní vazby mezi ϵ -amino skupinou a Lys a jinou skupinou. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je Lys řetězce B je derivatizovaný za účelem přípravy kovalentní vazby mezi ϵ -amino skupinou Lys

a jinou skupinou. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu jsou oba Lys řetězce A a řetězce B derivatizované za účelem přípravy kovalentní vazby mezi ϵ -amino skupinou každého z Lys a jiné skupiny.

V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je kovalentní vazba je vytvořena acylací s kladně nabitou aminokyselinou. V tomto provedení je kovalentní vazba vytvořena mezi ϵ -amino skupinou Lys a uhlíkem v α -karboxylové skupině aminokyseliny, když atom vodíku z ϵ -amino skupiny Lys a hydroxylová část α -karboxylové skupiny aminokyseliny vytvoří vodu při kovalentní vazbě aminokyseliny k Lys za účelem přípravy kovalentní vazby.

Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je kovalentní vazba vytvořena mezi ϵ -amino skupinou Lys a uhlíkem v α -karboxylové skupině Arg, za tvorby "Lys-N^e-Arg" derivátu. Lys-N^e-Arg derivát je znázorněn v Obecném vzorci 1. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je Lys-N^e-Arg inzulinový derivát vytvořen z Lys v poloze B28 obecného vzorce II. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je Lys-N^e-Arg inzulinový derivát vytvořen z Lys v poloze B29 obecného vzorce II, který odpovídá Lys v poloze 29 Sekv. ID č. 4.

Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je kovalentní vazba vytvořena mezi ϵ -amino skupinou Lys a uhlíkem v α -karboxylové skupině Lys, za tvorby "Lys-N-Lys"

derivátu. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je Lys-N^ε-Lys inzulínový derivát je vytvořen z Lys v poloze B28 obecného vzorce II. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je Lys-N^ε-Lys inzulínový derivát vytvořen z Lys v poloze B29 obecného vzorce II, který odpovídá Lys v poloze 29 Sekv. ID č. 4.

"Proinzulínový derivát" ve zde uvedeném významu představuje proinzulínovou sloučeninu, kde je Lys derivatizovaný za účelem přípravy kovalentní vazby mezi ε-amino skupinou Lys a jinou skupinou. V jednom výhodném provedení přihlášky vynálezu se kovalentní vazba vytvoří acylací s kladně nabitou aminokyselinou. V tomto provedení přihlášky vynálezu je kovalentní vazba vytvořena mezi ε-amino skupinou Lys a uhlíkem v α-karboxylové skupině kladně nabitě aminokyseliny, za tvorby "Lys-N-aminokyselinového" derivátu. Podle jednoho výhodného provedení přihlášky vynálezu je kovalentní vazba vytvořena mezi ε-amino skupinou Lys a uhlíkem v α-karboxylové skupině Arg, za tvorby "Lys-N^ε-Arg" derivátu. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je Lys-N^ε-Arg inzulínový derivát vytvořen z Lys v poloze B28 obecného vzorce II. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je Lys-N^ε-Arg inzulínový derivát vytvořen z Lys v poloze B29 obecného vzorce II, který odpovídá Lys v poloze 29 Sekv. ID č. 4. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je kovalentní vazba vytvořena mezi ε-amino skupinou Lys a uhlíkem v α-karboxylové skupině Lys, za tvorby "Lys-N^ε-Lys"

derivátu. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je Lys-N^ε-Lys inzulínový derivát vytvořen z Lys v poloze B28 obecného vzorce II. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je Lys-N^ε-Lys inzulínový derivát vytvořen z Lys v poloze B29 obecného vzorce II, který odpovídá Lys v poloze 29 Sekv. ID č. 4.

"Inzulínový analog" ve zde uvedeném významu má jiný význam než "inzulínový derivát" ve zde uvedeném významu.

"Inzulínový derivát" je inzulínová sloučenina, kde je Lys derivatizovaný za účelem přípravy kovalentní vazby mezi ε-amino skupinou Lys a jinou skupinou. Na rozdíl od výrazu "inzulínový derivát" výraz "inzulínový analog" představuje inzulínovou sloučeninu, která je modifikována tak, aby se lišila od inzulínu divokého typu, ale Lys není

derivatizovaný za účelem přípravy kovalentní vazby mezi ε-amino skupina Lys a jiné poloviny. Inzulínový analog může takto mít řetězec A a/nebo B, které mají v zásadě stejné aminokyselinové sekvence jako řetězec A a řetězec B lidského inzulínu, s ohledem na pořadí, ale liší se od řetězce A a řetězce B lidského inzulínu přítomností jedné nebo více aminokyselinových delecí v řetězcích A a/nebo B a/nebo jedním nebo více aminokyselinovými náhradami v řetězcích A a/nebo B, a/nebo jednou nebo více aminokyselinami, které jsou kovalentně vázané k N- a/nebo C-koncům řetězců A a/nebo B.

Například A0^{Arg}B29^{Lys-N^ε-Arg}-inzulín a A0^{Lys-N^ε-Arg}--inzulín a A0^{Lys-N^ε-Arg}-B29^{Lys-N^ε-Arg}--inzulín jsou takto inzulínové

deriváty, protože u každé z těchto inzulínových sloučenin je Lys derivatizovaný za účelem přípravy kovalentní vazby mezi ϵ -amino skupinou Lys a jinou skupinou (Arg). Naproti tomu vzhledem k inzulínovým derivátům je $A0^{Arg}$ -inzulín inzulínový analog, protože v $A0^{Arg}$ -inzulínu není Lys derivatizovaný za účelem přípravy kovalentní vazby mezi ϵ -amino skupinou Lys a jiné skupinou.

"Proinzulínový analog" ve zde uvedeném významu se liší od "proinzulínového derivátu" ve zde uvedeném významu.

"Proinzulínový derivát" je proinzulínová sloučenina, kde je Lys derivatizovaný za účelem přípravy kovalentní vazby mezi ϵ -amino skupinou Lys a jinou skupinou. Ve srovnání s výrazem "proinzulínový derivát" představuje výraz "proinzulínový analog" proinzulínovou sloučeninu, která je modifikována, aby se lišila od proinzulínu divokého typu, ale Lys není derivatizovaný za účelem přípravy kovalentní vazby mezi ϵ -amino skupina Lys a jiné poloviny.

Analog proinzulínu může takto mít řetězec A, řetězec B a/nebo C-peptid, které mají v zásadě stejné aminokyselinové sekvence jako řetězce A, řetězce B a -peptidu lidského proinzulínu, s ohledem na pořadí, ale liší se od řetězce A, řetězce B a C-peptidu lidského proinzulínu přítomností jedné nebo více aminokyselinových delecí v řetězci A, řetězci B nebo C-peptidu, a/nebo jedním nebo více aminokyselinovými nahrazeními v řetězci A, řetězci B nebo C-peptidu, a/nebo jednou nebo více kovalentně vázanou aminokyselinou k N- a/nebo C-koncům řetězce A, řetězce B

nebo C-peptidu. Například, A0^{Arg}B29^{Lys-N^ε-Arg}--proinzulínu je inzulínový derivát, ale B28^{Lys}B29^{Pro}-proinzulín je proinzulínový analog.

Aminokyselina na Xaa v poloze A-1 obecného vzorce I může být přítomná nebo nepřítomná.

Pokud je přítomná, je s výhodou Arg, derivatizovaným Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl arginin.

Aminokyselina na Xaa v poloze A0 musí být přítomná. Ve výhodném provedení, Xaa v poloze A0 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl arginin. Ve výhodném provedení přihlášky vynálezu je Xaa v poloze A0 je Lys derivatizovaný s kladně nabitou aminokyselinou. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je Xaa v poloze A0 je Lys-N^ε-Arg. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je Xaa v poloze A0 je Lys-N^ε-Lys.

Aminokyselina na Xaa v poloze A21 je geneticky kódovatelná aminokyselina zvolená ze souboru, zahrnujícího alanin (Ala), arginin (Arg), asparagin (Asn), kyselinu asparagovou (Asp), cystin (Cys), kyselinu glutamovou (Glu), glutamin (Gln), glycin (Gly), histidin (His), isoleucin (Ile), leucin (Leu), lysin (Lys), methionin (Met), fenylalanin

(Phe), prolin (Pro), serin (Ser), threonin (Thr), tryptofan (Trp), tyrosin (Tyr) a valin (Val). Podle jednoho výhodného provedení přihlášky vynálezu je aminokyselina na Xaa v poloze A21 glycin. V jiném výhodném provedení je aminokyselinou na Xaa v poloze A21 serin. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je aminokyselinou na Xaa v poloze A21 threonin. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je aminokyselinou na Xaa v poloze A21 alanin.

Aminokyselina na Xaa v poloze B-1 obecného vzorce II může být přítomná nebo nepřítomná.

Pokud je přítomná, je výhodně Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl arginin. Aminokyselina na Xaa v poloze B0 může být přítomná nebo nepřítomná. Pokud je přítomná, je výhodně Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl arginin. Pokud aminokyselina na Xaa v poloze B0 je nepřítomná, potom je take aminokyselina na Xaa v poloze B-1 nepřítomná.

Aminokyselina na Xaa v poloze B28 je Lys nebo Pro.

Aminokyselina na Xaa v poloze B29 je Lys nebo Pro.

Aminokyselina na Xaa v poloze B30 je Thr, Ala nebo je nepřítomná.

Podle jednoho výhodného provedení přihlášky vynálezu je buď Xaa v poloze B28 nebo Xaa v poloze B29 je Lys, ale Xaa v poloze B28 a Xaa v poloze B29 nejsou oba Lys a ϵ -amino skupina Lys v poloze B28 nebo B29 je kovalentně vázaná k ϵ -karboxylové skupině kladně nabitě aminokyseliny za účelem přípravy Lys-N^ε-aminokyselinového derivátu. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je ϵ -amino skupina Lys v poloze B28 nebo B29 je kovalentně vázaná k ϵ -karboxylové skupině Arg za účelem přípravy derivátu Lys-N^ε-Arg. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je ϵ -amino skupina Lys v poloze B28 nebo B29 kovalentně vázaná k ϵ -karboxylové skupině Lys za účelem přípravy derivátu Lys-N^ε-Lys.

Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je aminokyselina v inzulínové sloučenině dále derivatizovaná. Podle jednoho výhodného provedení přihlášky vynálezu je aminokyselina derivatizována acylací.

Výhodněji je Lys v poloze B29 obecného vzorce II acylován aminokyselinou.

Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je aminokyselina derivatizována karbamylací.

Výhodně je Lys derivatizovaný za účelem přípravy homoargininu. Výhodněji je homoarginin vytvořen z Lys v poloze B29 obecného vzorce II.

"Polypeptidový řetězec" představuje dvě nebo více aminokyseliny, které jsou spojené dohromady prostřednictvím peptidových vazeb.

Ve výhodném provedení přihlášky vynálezu je řetězec A inzulinové sloučeniny podle předloženého vynálezu skříženě vázán k řetězci B prostřednictvím dvou disulfidových vazeb a řetězec obsahuje vnitrořetězcové disulfidové vazebné skřížené vázání. Více specificky, "náležitě vázaný" představuje (1) disulfidovou vazbu mezi Cys v poloze A6 obecného vzorce I a Cys v poloze A1 1, (2) disulfidovou vazbu mezi Cys v poloze A7 obecného vzorce I a Cys v poloze B7 obecného vzorce II a (3) disulfidovou vazbu mezi Cys v poloze A20 obecného vzorce I a Cys v poloze B 19 obecného vzorce II.

Za účelem znázornění inzulinu a proinzulinové sloučeniny je zde použito jednoduchého zapsání zkrácenou notací a se znázorněním v referenci k řetězci A obecného vzorce I (Sekv. ID č. 1) a k řetězci B obecného vzorce II (Sekv. ID č. 2). V tomto zápisu, pokud je aminokyselina na Xaa v poloze A-1, B-1 nebo B0 není uvedena ve zkráceném zápisu inzulinové sloučeniny, potom je Xaa v této pozici nepřítomný. Pokud aminokyselina na Xaa v poloze A21 není uvedena ve zkráceném zápisu inzulinové sloučeniny, potom je aminokyselinou Asn, který je aminokyselinou v poloze A21 v

inzulínu divokého typu řetězce A (Sekv. ID č. 3). Pokud není aminokyselina na Xaa v poloze B28 uvedena ve zkráceném zápisu inzulínové sloučeniny, potom je aminokyselinou Pro, který je aminokyselinou v poloze B28 v inzulínu divokého typu řetězce B (Sekv. ID č. 4). Pokud aminokyselina na Xaa v poloze B29 není uvedena ve zkráceném zápisu inzulínové sloučeniny, potom je aminokyselinou Lys, který je aminokyselinou v poloze B29 v inzulínu divokého typu řetězce B. Pokud aminokyselina na Xaa v poloze B30 není uvedena ve zkráceném zápisu inzulínové sloučeniny, potom je aminokyselinou Thr, který je aminokyselinou v poloze B30 v inzulínu divokého typu řetězce B. "des (B30)" znamená, že Xaa v poloze B30 je nepřítomný. Pokud aminokyselina v proinzulínu není uvedena ve zkráceném zápisu proinzulínové sloučeniny, je aminokyselina v této pozici aminokyselinou v této pozici divokého typu lidské proinzulínové sloučeniny.

Neomezujícím příkladem ve zkráceném zápisu je

"A0^{Arg}A21^{Xaa}B0^{Arg}B29^{Lys-N^e-Arg}-inzulín," který znázorňuje, že Xaa v poloze A-1 obecného vzorce I je nepřítomný, Xaa v poloze A0 představuje Arg, Xaa v poloze A21 je geneticky kódovatelná aminokyselina, Xaa v poloze B-1 obecného vzorce II je nepřítomný, Xaa v poloze B0 představuje Arg, Xaa v poloze B28 je Pro, Xaa v poloze B29 je Lys-N^e-Arg a Xaa v poloze B30 je Thr.

V jiném neomezujícím příkladu zkráceného zápisu znázorňuje zkrácený zápis "A0^{Lys-N^e-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-N^e-Arg}-inzulín", že Xaa v poloze A-1 obecného vzorce I je nepřítomný, Xaa v poloze

A0 je Lys-N^e-Arg, Xaa v poloze A21 je Gly, Xaa v poloze B-1 obecného vzorce II je nepřítomný, Xaa v poloze B0 je nepřítomný, Xaa v poloze B28 je Pro, Xaa v poloze B29 je Lys-N^e-Arg a Xaa v poloze B30 je Thr

V jiném neomezujícím příkladu zkráceného zápisu znázorňuje zkrácený zápis pro "A²¹-inzulín", že Xaa v poloze A-1 obecného vzorce I je nepřítomný, Xaa v pozicích A0 je nepřítomný, Xaa v poloze A21 je geneticky kódovatelná aminokyselina, Xaa v poloze B-1 obecného vzorce II je nepřítomný, Xaa v poloze B0 je nepřítomný, Xaa v poloze B28 je Pro, Xaa v poloze B29 je Lys a Xaa v poloze B30 je Thr

"A21^{Gly}-inzulín" je stejný jako A21^{Xaa}-inzulín, kromě toho, že Xaa v poloze A21 je Gly.

"A21^{Ser}-inzulín" je stejný jako A21^{Xaa}-inzulín, kromě toho, že Xaa v poloze A21 je Ser.

V jiném neomezujícím příkladu zkráceného zápisu znázorňuje zkrácený zápis pro "B28^{Lys} B29^{Pro}-inzulín", že Xaa v poloze A-1 obecného vzorce I je nepřítomný, Xaa v pozicích A0 je nepřítomný, Xaa v poloze A21 je geneticky kódovatelná aminokyselina, Xaa v poloze B-1 obecného vzorce II je nepřítomný, Xaa v poloze B0 je nepřítomný, Xaa v poloze B28 je Lys, Xaa v poloze B29 je Pro a Xaa v poloze B30 je Thr.

V jiném neomezujícím příkladu zkráceného zápisu znázorňuje zkrácený zápis "A0^{Arg}-inzulín, že Xaa v poloze A-1 obecného

vzorce I je nepřítomný, Xaa v poloze A0 představuje Arg, Xaa v poloze A21 je Asn, Xaa v poloze B-1 obecného vzorce II je nepřítomný, Xaa v poloze B0 je nepřítomný, Xaa v poloze B28 je Pro, Xaa v poloze B29 je Lys a Xaa v poloze B30 je Thr. Viz U.S. 5,506,202 a U.S. 5,430,016.

"gHR" představuje alfa-guanidyl homoarginin.

Ve výhodném provedení přihlášky vynálezu je inzulínová sloučenina podle předloženého vynálezu zvolena ze souboru, zahrnujícího:

A0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;

A-1^{Arg}A0^{Lys}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A-1^{Arg}A0^{Lys}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A-1^{Arg}A0^{Lys}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A-1^{Arg}A0^{Lys}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A-1^{Arg}A0^{Lys}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A-1^{Arg}A0^{Lys}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A-1^{Lys}A0^{Lys}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A-1^{Lys}A0^{Lys}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A-1^{Lys}A0^{Lys}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A-1^{Lys}A0^{Lys}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A-1^{Lys}A0^{Lys}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A-1^{Lys}A0^{Lys}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A-1^{Arg}A0^{Arg}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A-1^{Arg}A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A-1^{Arg}A0^{Arg}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A-1^{Arg}A0^{Arg}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A-1^{Arg}A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A-1^{Arg}A0^{Arg}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys-Nε-Arg}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys-Nε-Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys-Nε-Arg}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys-Nε-Arg}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys-Nε-Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys-Nε-Arg}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys-Nε-Lys}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys-Nε-Lys}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;

A0^{Lys-Nε-Lys}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys-Nε-Lys}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys-Nε-Lys}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys-Nε-Lys}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Xaa}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Gly}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Ser}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Xaa}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Gly}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Ser}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Xaa}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Gly}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Ser}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Xaa}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Gly}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Ser}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
A0^{Arg}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Xaa}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Gly}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Arg}A21^{Ser}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
A0^{Lys}A21^{Xaa}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;

A0^{Lys}A21^{Gly}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Ser}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
 A0^{Lys}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Xaa}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Gly}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Ser}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{Arg}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Xaa}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Gly}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Ser}B0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{gHR}B0^{gHR}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
 A0^{gHR}A21^{Xaa}B0^{gHR}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
 A0^{gHR}A21^{Gly}B0^{gHR}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
 A0^{gHR}A21^{Ser}B0^{gHR}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín;
 A0^{gHR}B0^{gHR}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{gHR}A21^{Xaa}B0^{gHR}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{gHR}A21^{Gly}B0^{gHR}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{gHR}A21^{Ser}B0^{gHR}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Xaa}B0^{Arg}B28^{Lys-Nε-Arg}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Xaa}B0^{Lys}B28^{Lys-Nε-Arg}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Xaa}B0^{Arg}B28^{Lys-Nε-Arg}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Xaa}B0^{Lys}B28^{Lys-Nε-Arg}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Xaa}B28^{Lys-Nε-Arg}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Gly}B28^{Lys-Nε-Arg}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Ser}B28^{Lys-Nε-Arg}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Xaa}B28^{Lys-Nε-Lys}B29^{Pro}-inzulín;

A0^{Arg}A21^{Gly}B28^{Lys-Nε-Lys}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Ser}B28^{Lys-Nε-Lys}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Xaa}B28^{Lys-Nε-Arg}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Gly}B28^{Lys-Nε-Arg}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Ser}B28^{Lys-Nε-Arg}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Xaa}B28^{Lys-Nε-Lys}B29^{Pro}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Gly}B28^{Lys-Nε-Lys}B29^{Pro}-inzulín; a
 A0^{Lys}A21^{Ser}B28^{Lys-Nε-Lys}B29^{Pro}-inzulín.
 A0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}B31^{Arg}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}B31^{Arg}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}B31^{Arg}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Arg}B31^{Arg}-inzulín;
 A0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Lys}B31^{Arg}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Lys}B31^{Arg}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Lys}B31^{Arg}-inzulín;
 A0^{Arg}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Lys}B31^{Arg}-inzulín;

 A0^{Lys}B29^{Lys-Nε-Arg}B31^{Lys}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}B31^{Lys}-inzulín;
 A0^{Lys}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}B31^{Lys}-inzulín; a
 A0^{Lys}A21^{Ser}B29^{Lys-Nε-Arg}B31^{Lys}-inzulín.

V jiném výhodném provedení se inzulínová sloučenina podle předloženého vynálezu zahrnuje modifikaci N-terminálního konce řetězce A a N-terminální konec řetězce B. Takovou inzulínovou sloučeninu je taková, kde byl kovalentně vázán Arg k N-terminálnímu konci inzulínového řetězce A a byl

kovalentně vázán Arg k inzulin řetězce B. V jednom výhodný provedení se předložený vynález týká inzulinové sloučeniny, kde

(a) řetězec A obecného vzorce I,

A-1 A0 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13

Xaa-Xaa-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-

A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21

Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa,

kde aminokyselinová sekvence obecného vzorce I je znázorněna v Sekv. ID č. 1, a

(b) řetězec B obecného vzorce II,

B-1 B0 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12

Xaa-Xaa-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-

B13 B14 B15 B16 B17 B18 B19 B20 B21 B22 B23 B24 B25 B26 B27

Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-

B28 B29 B30

Xaa-Xaa-Xaa,

kde aminokyselinová sekvence obecného vzorce II je znázorněna v Sekv. ID č. 2, kde

Xaa v poloze A-1 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze A0 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl arginin;

Xaa v poloze A21 je geneticky kódovatelná aminokyselina;

Xaa v poloze B-1 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze B0 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl arginin;

Xaa v poloze B28 je Lys nebo Pro;

Xaa v poloze B29 je Lys nebo Pro;

Xaa v poloze B30 je Thr, Ala nebo je nepřítomný; jeden z Xaa v poloze B28 nebo Xaa v poloze B29 je Lys; a

Xaa v poloze B28 a Xaa v poloze B29 nejsou oba Lys.

Také je poskytnut způsob pro přípravu mikrokryystalu zahrnujícího tento inzulinový analog a zinek. Ve výhodném

provedení přihlášky vynálezu mikrokrystal zahrnuje inzulínový analog, zinek a protamin.

Také je poskytnut způsob pro přípravu mikrokrystalu, zahrnující uvedení do kontaktu složek zahrnujících inzulínovou sloučeninu a divalentní kovový kationt ve vodném rozpouštědle při hodnotě pH, která umožňuje tvorbu hexamerů inzulínové sloučeniny. "Uvedení do kontaktu" v širokém významu odpovídá umístění složek do roztoku. V méně širokém významu znamená uvedení do kontaktu se týká otáčení, víření, protřepávání nebo vibrace roztoku složek. Více specificky se uvedení do kontaktu týká míchání složek.

V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je inzulínový analog je zvolen ze souboru, zahrnujícího:

$A0^{Arg}B0^{Arg}$ -inzulín;
 $A0^{Arg}A21^{Xaa}B0^{Arg}$ -inzulín;
 $A0^{Arg}A21^{Gly}B0^{Arg}$ -inzulín;
 $A0^{Arg}A21^{Ser}B0^{Arg}$ -inzulín;
 $A0^{Lys}B0^{Lys}$ -inzulín;
 $A0^{Lys}A21^{Xaa}B0^{Lys}$ -inzulín;
 $A0^{Lys}A21^{Gly}B0^{Lys}$ -inzulín;
 $A0^{Lys}A21^{Ser}B0^{Lys}$ -inzulín;
 $A0^{Arg}B0^{Lys}$ -inzulín;
 $A0^{Arg}A21^{Xaa}B0^{Lys}$ -inzulín;
 $A0^{Arg}A21^{Gly}B0^{Lys}$ -inzulín;
 $A0^{Arg}A21^{Ser}B0^{Lys}$ -inzulín;
 $A0^{Lys}B0^{Arg}$ -inzulín;
 $A0^{Lys}A21^{Xaa}B0^{Arg}$ -inzulín;

A0^{Lys}A21^{Gly}B0^{Arg}-inzulín; a

A0^{Lys}A21^{Ser}B0^{Arg}-inzulín.

"Inzulínový templát" představuje inzulínovou sloučeninu, která je modifikována za účelem přípravy inzulínového analogu nebo derivátu předloženého vynálezu. Inzulínové sloučeniny, které mohou být použity jako templáty pro následnou chemickou modifikaci, zahrnují, ale neomezují se pouze na, jakýkoli z přirozeně se vyskytujících inzulínů a výhodně lidský inzulín; analog lidského inzulínu; B28^{Lys}, B29^{Pro}-inzulín; A0^{Arg}-inzulín; A21^{Xaa}-inzulín; A0^{Arg}A21a^{Xaa}-inzulín, B0^{Arg}-inzulín; B28^{Asp}-inzulín; B3^{Lys}B29^{Glu}-inzulín a inzulínovou sloučeninu, kde jedna nebo dvě volné aminové skupiny byly předtím derivatizovány s ochrannou skupinou výhodně terc.-butyloxykarbonylu (Boc) za účelem zvýšení reakční specifity následného acylačního kroku. Výhodně je templátem inzulínu rekombinantní inzulín. Výhodněji je templátem inzulínu je rekombinantní lidský inzulín nebo jeho analog. Nejvýhodněji je templátem inzulínu rekombinantní lidský inzulín.

A21^{Xaa}-inzulín může být použit jako templát inzulínu, pokud je požadováno nahradit Asparagin v poloze 21 divokého typu obecného vzorce I (odpovídající pozici 23 Sekv. m č. 2) jinou aminokyselinou, za účelem snížení nebo za účelem zabránění deamidace inzulínové sloučeniny, a/nebo prodloužení účinku inzulínové sloučeniny. Podle jednoho výhodného provedení přihlášky vynálezu je A21^{Asn} nahrazen A21^{Gly} za účelem přípravy A21^{Gly}-inzulínu. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je A21^{Asn} je nahrazen

A21^{Thr} za účelem přípravy A21^{Thr}-inzulínu. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je A21^{Asn} je nahrazen A21^{Ala} za účelem přípravy A21^{Ala}-inzulínu. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je A21^{Asn} je nahrazen A21^{Ser} za účelem přípravy A21^{Ser}-inzulínu.

“Rekombinantní protein” představuje protein, který je exprimován v eukaryotické nebo prokaryotické buňce z vektoru exprese obsahujícího polynukleotidovou sekvenci, která kóduje protein. Výhodně je rekombinantní protein rekombinantní inzulinovou sloučeninu.

“Rekombinantní inzulinová sloučenina” je inzulinová sloučenina, která je exprimována v eukaryotické nebo prokaryotické buňce z vektoru exprese obsahujícího polynukleotidovou sekvenci, která kóduje řetězec A a řetězec B inzulinové sloučeniny a popřípadě C-peptid proinzulinové sloučeniny. V jednom výhodném provedení přihlášky vynálezu je rekombinantní proteinem rekombinantní inzulin nebo proinzulinový derivát. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je rekombinantním proteinem rekombinantní inzulin nebo proinzulinový analog.

“Rekombinantní lidský inzulin” představuje rekombinantní inzulin mající řetězec A inzulinu divokého typu (Sekv. ID č. 3) a řetězce B (Sekv. ID č. 4) aminokyseliných sekvencí.

“Geneticky kódovaná aminokyselina” představuje aminokyselinu, která je kódovaná genetickým kodónem, který je skupinou tří bazí deoxyribonukleové kyseliny. Viz

Biochemistry, L. Stryer, Ed., Third Edition, W. H. Freeman a Co., New York, p. 99-107 (1988). Geneticky kódované aminokyseliny zahrnují alanin (Ala), arginin (Arg), asparagin (Asn), kyselinu asparagovou (Asp), cystin (Cys), kyselinu glutamovou (Glu), glutamin (Gln), glycin (Gly), histidin (His), isoleucin (Ile), leucin (Leu), lysin (Lys), methionin (Met), fenylalanin (Phe), prolin (Pro), serin (Ser), threonin (Thr), tryptofan (Trp), tyrosin (Tyr) a valin (Val).

Klinicky normální hladina plazmatické glukózy na lačno je 70-110 mg/dl. Klinicky normální hladina plazmatické glukózy po jídle je méně než 140 mg/dl. "Dostatečný pro regulaci krevní glukózy u subjektu" znamená, že podávání inzulínové sloučeniny vede ke klinicky normální hladině plazmatické glukózy na lačno.

Znalci v oboru dobře známý účinek inzulínu může být kvantifikován za použití techniky "glucose clamp", kde množství exogenní glukózy, které je v průběhu doby potřeba za účelem udržení předem určené hladiny plazmatické glukózy je použito jako měřítko rozsahu a trvání účinku inzulínu způsobeného inzulínovou sloučeninou. Například, viz Burke a kol., Diabetes Research, 4: 163-167 (1987). Typicky je při tomto zkoumání glukóza podána v nitrožilní infuzi. Pokud inzulínová sloučenina způsobuje snížení hladiny plazmatické glukózy, je zvýšena míra infuze glukózy tak, že je udržována předem určená hladina plazmatické glukózy. Když poklesne účinek inzulínové sloučeniny je míra infuze

glukózy snížena tak, že je udržována předem určená hladina plazmatické glukózy.

"Účinek inzulínu" znamená, že zkoumání "glucose clamp" vyžaduje podávání inzulínové sloučeniny, aby byla míra intravenózního podání glukózy do krve zvýšena za účelem udržení předem určené hladiny plazmatické glukózy u subjektu po dobu trvání pokusu. V jednom výhodném provedení přihlášky vynálezu je předem určenou hladinou glukózy hladina plazmatické glukózy na lačno. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je předem určenou hladinou glukózy hladina plazmatické glukózy po jídle.

Inzulínová sloučenina má "protrahovanou dobu účinku", pokud inzulínová sloučenina vede k účinku inzulínu u hyperglykemických, například, diabetických, pacientů, který trvá déle než účinek lidského inzulínu. Výhodně inzulínová sloučenina vede k účinku inzulínu, který trvá od přibližně 8 hodin do přibližně 24 hodin po jednom podávání inzulínové sloučeniny. Výhodněji účinek inzulínu trvá od přibližně 10 hodin do přibližně 24 hodin. Ještě výhodněji účinek trvá od přibližně 12 hodin do přibližně 24 hodin. Dále ještě výhodněji účinek trvá od přibližně 16 hodin do přibližně 24 hodin. Nejvýhodněji účinek trvá od přibližně 20 hodin do přibližně 24 hodin.

Inzulínová sloučenina má "bazální účinek inzulínu", pokud inzulínová sloučenina vede ke glukózu snižujícímu účinku u subjektů, který trvá přibližně 24 hodin po jednom podávání inzulínové sloučeniny.

"Izolovaný protein" ve zde uvedeném významu znamená, že protein se odstraní z prostředí, ve kterém je připraven. Přirozeně se vyskytující protein je izolovaný, když se odstraní z buněčného prostředí, kde protein existuje. Rekombinantní protein je izolovaný, když se odstraní z buněčného prostředí, kde protein je exprimován. Chemicky modifikovaný protein, buď přirozeně se vyskytující nebo rekombinantní, je izolovaný, když se odstraní z reakční směsi, kde je protein chemicky modifikovaný. Výhodně se izolovaný protein odstraní od jiných proteinů, polypeptidů nebo peptidů. Postupy pro izolaci proteinu zahrnují centrifugaci, chromatografii, lyofilizaci nebo elektroforézu. Takové a jiné způsoby proteinové izolace jsou dobře známé odborníkovi v oboru. Výhodně se inzulínová sloučenina podle předloženého vynálezu izoluje.

"Modifikace" proteinu se týká adice aminokyseliny nebo derivatizované aminokyseliny, k substituci jedné aminokyseliny za jinou nebo k delecí aminokyseliny. Modifikace může být uskutečněna prostřednictvím rekombinantní DNA metodiky. Například viz U.S. patent č. 5,506,202, 5,430,016 a 5,656,782. Alternativně, modifikaci může být uskutečněna prostřednictvím chemické modifikace templátu inzulínu, jako je přidání jedné nebo více chemických skupin k templátu inzulínu nebo odstranění jedné nebo více chemických skupin z templátu inzulínu. Chemické modifikace na templátu inzulínu aminokyselinové postranní skupiny zahrnují karbamylaci, amidaci, guanidinylation, sulfonylaci, acylaci jedné nebo více α -amino skupin,

acylaci ϵ -amino skupiny (například, lysinové ϵ -amino skupiny), N-alkylaci argininu, histidinu nebo lysinu, alkylaci glutamátových nebo aspartátových skupin karboxylových kyselin a deamidace glutaminu nebo asparaginu. Modifikace terminální amino skupiny (například, α -amino skupiny) zahrnují, bez omezení, modifikace ve smyslu des-amino, N-nižší alkyl, N-di-nižší alkyl a N-acyl. Modifikace konečné karboxy skupiny zahrnují, bez omezení, modifikace ve smyslu amid, nižší alkyl amid, dialkyl amid a nižší alkyl ester modifikaci. Navíc může jedna nebo více postranních skupin nebo terminálních skupin být chráněna ochrannými skupinami, které jsou známy odborníkovi v oboru.

Aminokyseliny použité za účelem vytvoření inzulinového analoga nebo inzulinového derivátu podle předloženého vynálezu mohou být buď v D-nebo L-formě a mohou být buď přirozeně se vyskytující aminokyselinami nebo umělé aminokyseliny.

"Odvozený Arg" představuje Arginin, který byl modifikován prostřednictvím chemické syntézy. Výhodné Arg deriváty jsou ty, který se získají prostřednictvím acylace a/nebo karbamylace. Ve výhodném provedení je Arg derivatizovaný od kladně nabitě aminokyseliny. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je Arg derivatizovaný od Arg na epsilon ($-\text{N}\epsilon$) amino skupině za účelem přípravy Arg- N^ϵ -Arg. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je Arg derivatizovaný od Lys na $-\text{N}\epsilon$ amino skupině za účelem

přípravy Arg-N^ε-Lys. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je derivatizovaný Arg dArginin (dArg nebo dR), což je Arg s obrácenou stereochemickou konfigurací na alfa uhlíku.

"Odvozený Lys" představuje Lysin, který byl modifikován prostřednictvím chemické syntézy. Výhodné Lys deriváty jsou ty, které se získají prostřednictvím acylace a/nebo karbamylace. Ve výhodném provedení je Lys je derivatizovaný od kladně nabitě aminokyseliny. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je Lys derivatizovaný od Arg na epsilon (-N^ε) amino skupině za účelem přípravy Lys-N^ε-Arg. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je Lys derivatizovaný od Lys na epsilon amino skupině za účelem přípravy Lys-N^ε-Lys. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je derivatizovaný Lys homoargininem (homoArg nebo hR). V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je derivatizovaný Lys dLysinem (dLys nebo dL), což je Lys s obrácenou stereochemickou konfigurací na alfa karbon. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je derivatizovaný Lys je alfa guanidino homoarginin (gHR).

Lidský inzulin obsahuje tři volné amino skupiny: N-terminální α-amino skupinu řetězce A, N-terminální α-amino skupinu řetězce B a ε-amino skupinu lysinu řetězce B postranního řetězce. Obecně mohou být α- a/nebo ε-amino skupiny proteinů acylované aktivovanými karboxylovými kyselinami. V tomto kontextu se acylace týká tvorby amidové vazby mezi aminem a karboxylovou kyselinou.

"Acylovaný Arg" znamená acylovou skupinu, která je kovalentně vázaná k Arg prostřednictvím kovalentní vazby vytvořené mezi kyselou skupinou acyl-obsahující sloučeniny a ϵ -amino skupinou Arg.

"Acylované Lys" znamená acylovou skupinu, která je kovalentně vázaná k Lys prostřednictvím kovalentní vazby vytvořené mezi kyselou skupinou acyl-obsahující sloučeniny a Lys.

"Karbamylovaný inzulín" představuje karbamylovou skupinu, která je kovalentně vázaná k inzulínu prostřednictvím kovalentní vazby vytvořené mezi karbonylovým uhlíkem karbamylové skupiny a karbamylo-obsahující sloučenina a amino skupiny inzulinu.

"Karbamylovaný Arg" znamená karbamylovou skupinu, která je kovalentně vázaná k Arg prostřednictvím kovalentní vazby vytvořené mezi karbonylovým uhlíkem karbamylové skupiny a karbamylo-obsahující sloučeninou a alfa-amino skupinou Arg.

"Karbamylovaný Lys" znamená karbamylovou skupinu, která je kovalentně vázaná k Lys prostřednictvím kovalentní vazby vytvořené mezi karbonylovým uhlíkem karbamylové skupiny karbamyl-obsahující sloučeniny a Lys.

"Farmaceuticky přijatelný" představuje klinicky vhodný pro podání člověku. Farmaceuticky přijatelný přípravek neobsahuje toxické prvky, nežádoucí znečištění a podobně a neinterferuje s účinkem aktivních sloučenin.

"Farmaceutická kompozice" představuje kompozici, která je klinicky přijatelná po podání lidskému subjektu. Inzulínová sloučenina podle předloženého vynálezu může být formulována ve farmaceutické kompozici tak, že protein interaguje s jednou nebo více anorganickými bázemi a anorganickými a organickými kyselinami, za účelem přípravy sole. Kyseliny, které se běžně používají za účelem přípravy adičních solí kyselin jsou anorganické kyseliny jako je jsou kyselina chlorovodíková, kyselina bromovodíková, kyselina jodovodíková, kyselina sírová, kyselina fosforečná a podobně a organické kyseliny jako jsou kyselina p-toluensulfonová, kyselina methansulfonová, kyselina šťavelová, kyselina p-bromofenyl-sulfonová, kyselina uhličitá, kyselina jantarová, kyselina citronová, kyselina benzoová, octová kyselina, trifluoroctová kyselina a podobně. Příklady takových solí zahrnují sulfát, pyrosulfát, bisulfát, sulfit, bisulfit, fosforečnan, hydrogenfosforečnan, dihydrogenfosforečnan, metafosforečnan, pyrofosforečnan, chlorid, bromid, jodid, octan, propionát, dekanoát, kaprylát, akrylát, formát,

isobutykrát, kaproát, heptanoát, propiolát, oxalát, malonát, sukcinát, suberát, sebacát, fumarát, maleát, butyn-1,4-dioát, hexyn-1,6-dioát, benzoát, chlorbenzoát, methylbenzoát, dinitrobenzoát, hydroxybenzoát, methoxybenzoát, ftalát, sulfonát, xylensulfonát, fenyloctan, fenylpropionát, fenylbutyrát, citrát, laktát, gama-hydroxybutyrát, glykolat, tartrát, methansulfonát, propansulfonát, naftalen-1-sulfonát, naftalen-2-sulfonát, mandelát a podobně.

Baze adičních solí zahrnují ty, které jsou deriváty anorganických bazí, jako je amoniak nebo alkalie nebo hydroxidy kovů alkalických zemin, uhličitany, hydrogenuhličitany a podobně. Ty báze, které jsou užitečné pro přípravu solí takto podle předloženého vynálezu zahrnují hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid amonný, uhličitán draselný a podobně.

"Mikrokrystal" představuje pevnou látku, která zahrnuje primárně v krystalickém stavu a s mikroskopickou velikostí, typicky s nejdelším rozměrem v rozmezí od 1 mikronu do 100 mikronů. "Mikrokrystalický" znamená stav mikrokrystalu.

"Amorfní precipitát" znamená nerozpustný materiál, který není krystalické struktury. Znalec v oboru je schopný rozeznat krystaly od amorfních precipitátů.

"Suspenze" představuje směs tekuté fáze a fáze pevné látky, která sestává z nerozpustných nebo málo rozpustných částic, které jsou delší než by odpovídalo velikosti koloidní

částice. Například směsi NPH mikrokryсталů a vodného rozpouštědla tvoří suspenze.

"Suspenzní přípravek" představuje farmaceutickou kompozici, kde aktivní činidlo přítomné ve fázi pevné látky, například mikrokryсталická pevná látka, amorfni precipitát nebo oboje, která je jemně dispergována do vodného rozpouštědla. Jemně dispergovaná pevná látka je taková, že může být suspendovaná celkem jednotným způsobem ve vodném rozpouštědle účinkem mírného míchání směsi, což takto vede k rozumě jednotné suspenzní formě, ze které se může extrahovat dávkovací objem. Příklady komerčně dostupných inzulinových suspenzních formulací zahrnují například NPH, PZI a Ultralente. Malá část pevné látkové hmoty v mikrokryсталické suspenzní formulaci může být amorfni. Výhodně, je podíl amorfniho materiálu menší než 10 % a nejvýhodněji menší než 1 % pevné látkové hmoty v mikrokryсталické suspenzi. Podobně může být malá část pevné látkové hmoty v suspenzi amorfniho precipitátu mikrokryсталická.

"Protamin" představuje směs silně bazických proteinů, která se získá z rybího sperma. Průměrná molekulová hmotnost proteinů v protaminu je přibližně 4200 (Hoffmann, J. A. a kol., Protein Expression and Purification, 1: 127-133 (1990)]. "Protamin" se může týkat přípravků proteinů, které jsou relativně bez obsahu sole, často nazývané "protaminová báze".

Protamin se také týká přípravků složených ze solí proteinů, například, protamin sulfátu. Komerční přípravky se široce liší svým obsahem solí.

"Vodné rozpouštědlo" představuje tekuté rozpouštědlo, které obsahuje vodu. Systém vodného rozpouštědla se může skládat výhradně z vody, může se skládat z vody spolu s jedním nebo více mísitelnými rozpouštědly nebo může obsahovat rozpouštědla. Běžně užívaná mísitelná rozpouštědla jsou organické alkoholy s krátkým řetězcem jako jsou methanol, ethanol, propanol; ketony s krátkým řetězcem jako je aceton; a polyakoholy jako je glycerol.

"Činidlo isotonicity" představuje sloučeninu, která je fyziologicky tolerovaná a dodává vhodnou tonicitu přípravku za účelem zabránění toku vody přes buněčné membrány, které jsou ve styku s podávaným přípravkem. Glycerol, který je také známý jako glycerin, a manitol, jsou běžně používaná činidla isotonicity. Jiná činidla isotonicity zahrnují sole, například, chlorid sodný a monosacharidy, například dextrózu a laktózu. Výhodně je činidlem isotonicity glycerol.

"Hexamer-stabilizující sloučenina" představuje sloučeninu neproteinového charakteru, sloučeninu s malou molekulovou hmotností, která stabilizuje inzulínovou sloučeninu podle předloženého vynálezu ve stavu hexamerické asociace.

Fenolové sloučeniny, obzvláště fenolová konzervační činidla, jsou nejlepšími známými stabilizujícími sloučeninami pro inzulínové sloučeniny. Výhodně se vybere

hexamer-stabilizující sloučenina ze skupiny zahrnující fenol, m-kresol, o-kresol, p-kresol, chlorkresol, methylparaben nebo směsi dvou nebo více těchto sloučenin. Výhodněji je hexamer-stabilizující sloučenina fenol nebo m-kresol nebo jejich směs.

"Konzervační činidlo" představuje sloučeninu, která se přidá k farmaceutické formulaci, aby účinkovala jako anti-mikrobiální činidlo. Konzervační činidlo, která jsou používaná ve formulacích podle předloženého vynálezu může být fenolové konzervační činidlo a může být stejné jako hexamer-stabilizující sloučenina nebo jiné než hexamer-stabilizující sloučenina. Parenterální přípravek musí splňovat nároky pro účinnost konzervačního činidla, aby z něj mohl být komerčně dostupný produkt pro četné použití. Mezi konzervační činidla, která jsou známá v oboru a jsou účinná a přijatelná pro parenterální přípravek jsou benzalkonium chlorid, benzethonium, chlorhexidin, fenol, m-kresol, benzyl alkohol, methylparaben, chlorbutanol, o-kresol, p-kresol, chlorkresol, dusičnan fenylrtuti, thimerosal, benzoová kyselina, butyl paraben, ethyl paraben, fenoxý ethanol a fenyl ethylalkohol, propyl paraben, benzylchlorkresol, chlorkresol a různé jejich směsi.

"Fenolové konzervační činidlo" zahrnuje sloučeniny, které se vyberou ze skupiny zahrnující fenol, m-kresol, o-kresol, p-kresol, chlorkresol, methylparaben a jejich směsi. Některá fenolové konzervační činidla, jako jsou fenol a m-kresol, jsou známá tím, že se vážou k inzulinu

podobným molekulám a touto cestou vedou ke změnám v konformaci, která zvýší buď fyzikální nebo chemickou stabilitu nebo obojí. Výhodně je fenolovým konzervačním činidlem m-kresol nebo fenol. "Pufr" nebo "farmaceuticky přijatelný pufr" představuje sloučeninu, která je bezpečná pro použití v inzulínových přípravcích a která má pH kontrolující účinek přípravku při hodnotě pH požadované pro formulaci. Hodnota pH krystalického přípravku podle předloženého vynálezu je od přibližně 6,0 do přibližně 8,0. Hodnota pH roztoku přípravku podle předloženého vynálezu je od přibližně 3,5 do přibližně 6,0.

Farmaceuticky přijatelné pufrы pro kontrolu hodnoty pH při mírně kyselých hodnotách pH na mírně bazické hodnoty pH zahrnují takové sloučeniny jako je laktát; tartrát; fosforečnan a obzvláště fosforečnan sodný ; octan a obzvláště octan sodný ; citrát a obzvláště citrát sodný ; arginin; TRIS; a histidin. "TRIS" znamená 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3,-propandiol a k jakoukoli jeho farmakologicky přijatelnou sůl. Volná báze a hydrochloridová forma jsou dvě běžné formy TRIS. TRIS je také známý v oboru jako trimethylol aminomethan, tromethamin a tris (hydroxy-methyl) aminomethan. Jiné farmaceuticky přijatelné pufrы, které jsou vhodné pro kontrolu hodnoty pH na požadovanou hodnotu jsou známy odborníkovi v oboru.

"Rychle účinkující inzulínový analog" vykazuje hypoglykemizující účinek, který (a) začíná dříve po podkožním podání než lidský inzulín, a/nebo (b) vykazuje

kratší dobu trvání účinku než lidský inzulín po podkožním podání. B28^{Lys}B29^{Pro}-inzulín (take nazývaný "lispro" inzulín) je rychle účinkující inzulínový analog, kde se zamění Pro v poloze 28 inzulínu divokého typu řetězce B (Sekv. ID č. 4) a Lys v poloze 29 inzulínu divokého typu řetězce B (Sekv. ID č. 4). Viz například U.S. patent č. 5,504,188 a 5,700,662. Jiný rychle účinkující inzulínový analog je B28^{Asp}-inzulín, kde se Pro v poloze 28 řetězce B divokého typu nahradí Asp. Viz U.S. patent č. 6, 221, 633. Jiný rychle účinkující inzulínový analog je B3^{Lys}B29^{Glu}-inzulín. Viz U.S. patent č. US 6,221,633.

Také je zde poskytnut způsob pro přípravu mikrokryystalu zahrnujícího inzulínovou sloučeninu podle předloženého vynálezu. V jednom provedení neobsahuje mikrokrystal protamin. V jiném provedení předloženého vynálezu mikrokrystal neobsahuje protamin a neobsahuje divalentní kationt, například, zinek. Takový krystal je obzvláště vhodný pro přípravu krystalů z roztoku nebo v bezvodé formě pro následné formulace.

V jiném provedení obsahuje mikrokrystal protamin.

V jiném provedení obsahuje mikrokrystal jak inzulínovou sloučeninu podle předloženého vynálezu, tak i lidský inzulín. V jednom výhodném provedení přihlášky vynálezu se mikrokrystal použije za účelem vytvoření roztoku přípravku. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu se mikrokrystal použije za účelem vytvoření suspenze přípravku.

Také je poskytnut způsob pro přípravu suspenze přípravku zahrnující inzulínovou sloučeninu podle předloženého vynálezu. Také je poskytnut způsob pro přípravu kompozice zahrnující přípravek v suspenzi. V jednom provedení obsahuje přípravek v suspenzi nerozpustnou fázi a fázi roztoku, nerozpustnou fázi zahrnující mikrokrystal podle předloženého vynálezu a fázi roztoku zahrnující vodu. Pokud je požadováno, obsahuje fáze roztoku lidský inzulín nebo rychle účinkující inzulínový analog, jako jsou B28^{Lys}B29^{Pro}-inzulín, B28^{Asp}-inzulín nebo B3^{Lys}B29^{Glu}.

Formulace v suspenzi může být použita za účelem přípravy léku pro léčbu diabetu mellitu. Formulace v suspenzi může také být použita za účelem léčby diabetu mellitu, v způsobu zahrnujícím podání přípravku v suspenzi subjektu v množství, které je dostatečné pro regulaci koncentrace krevní hladiny glukózy u subjektu.

Inzulínová sloučenina podle předloženého vynálezu může být v komplexu s vhodným divalentním kovovým kationtem.

"Divalentní kovový kationt" představuje iont nebo ionty, které se podílejí na tvorbě komplexu s množstvím molekul proteinů. Přechodné kovy, alkalické kovy a kovy alkalických zemin jsou příklady kovů, které jsou známy za účelem přípravy komplexů s inzulínem. Přechodné kovy jsou výhodné. Výhodně je divalentní kovový kationt jedním nebo více kationty, které se zvolí ze souboru, zahrnujícího zinek, měď, kobalt, hořčík, vápník, kadmium, nikl a železo. Výhodněji je divalentním kovovým kationtem zinek. Výhodně

je zinek poskytnut ve formě sole, jako jsou síran zinečnatý, chlorid zinečnatý, oxid zinečnatý nebo octan zinečnatý. Divalentní kovové komplexy inzulinové sloučeniny jsou obecně nerozpustné ve vodném roztok v oblasti hodnot fyziologického pH. Tyto komplexy takto mohou být podávány podkožně jako suspenze a vykazují sníženou míru uvolňování in vivo, čímž se prodlužuje doba účinku sloučeniny.

Za účelem získání komplexů mezi inzulinovou sloučeninu podle předloženého vynálezu a divalentním kovovým kationtem se protein rozpustí ve vhodném pufru a za přítomnosti soli kovu. Směs se nechá inkubovat při teplotě okolí, čímž se umožní precipitace komplexu. Vhodnými pufrů jsou ty, které udržují směs při hodnotě pH v oblasti od přibližně 3,0 do přibližně 9,0 a neinterferují s reakcí tvorby komplexů. Příklady zahrnují fosforečnanové pufrů, octanové pufrů, citrátové pufrů a Goodeovy pufrů, například HEPES, Tris a Tris acetát. Vhodné kovové sole jsou ty, kde je kov dostupný pro tvorbu komplexů. Příklady vhodných solí zinku zahrnují chlorid zinečnatý, octan zinečnatý, oxid zinečnatý a síran zinečnatý.

"Chráněná aminokyselina" je aminokyselina, která má všechny z reaktivních funkčních skupin až na jednu reversibilně derivatizované tak, že pouze jedna funkční skupina je reaktivní. Například v případě chráněné aktivované karboxylové kyseliny je alfa karboxylátová skupina reaktivní, ale všechny jiné funkční skupiny na aktivované karboxylové kyselině jsou nereaktivní. Chráněná aminokyselina je "nechráněná", když se odstraní funkční

skupina. Výhodně je chráněnou aminokyselinou chráněný arginin.

"Konzervativní substituce" je nahrazení aminokyseliny jinou aminokyselinou, která má stejný celkový elektrický náboj a přibližně stejnou velikost a stejný tvar. Aminokyseliny s alifatickým nebo substituovaným alifatickým aminokyselinovými postranními řetězci mají přibližně stejnou velikost, když se celkový počet uhlíků a heteroatomů na jejich postranních řetězcích liší o ne více než přibližně čtyři. Mají přibližně stejný tvar, když se počet větví na jejich postranních řetězcích liší o ne více než jedna. Aminokyseliny s fenylou nebo substituovanou fenylou skupinou na jejich postranních řetězcích se berou, že mají přibližně stejnou velikost a tvar. Níže je uvedeno pět skupin aminokyselin. Náhrada aminokyseliny inzulínu jinou aminokyselinou ze stejné skupiny vede ke konzervativní substituci:

Skupina I: glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin, cystin a v přírodě se nevyskytující aminokyseliny s C_1 - C_4 alifatickým nebo C_1 - C_4 hydroxyl substituovaný alifatickými postranními řetězci (přímý řetězec nebo s jedním větvením).

Skupina II: kyselina glutamová, kyselina asparagová a v přírodě se nevyskytující aminokyseliny s karboxylovou kyselinou substituovanou C_1 - C_4 alifatickými postranními řetězci (bez větvení nebo jeden větvicí bod).

Skupina III: lysin, ornithin, arginin, homoarginin a v přírodě se nevyskytující aminokyseliny s amin nebo guanidino substituovaný C_1 - C_4 alifatickými postranními řetězci (bez větvení nebo jeden větvicí bod).

Skupina IV: glutamin, asparagin a v přírodě se nevyskytující aminokyseliny s amidově substituovanými C_1 - C_4 alifatickými postranními řetězci (bez větvení nebo jeden větvicí bod).

Skupina V: fenylalanin, fenylglycin, tyrosin a tryptofan.

Konzervativní substituce jsou výhodně provedeny přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami, kromě zde jinak specificky uvedených.

"Vysoce konzervativní substituce" je nahrazení aminokyseliny jinou aminokyselinou, která má stejnou funkční skupinu na postranním řetězci a skoro stejnou velikost a tvar. Aminokyseliny s alifatickým nebo substituovanými alifatickými aminokyselinovými postranními řetězci mají skoro stejnou velikost, když se celkový počet uhlíků a heteroatomů na jejich postranních řetězcích liší ne více než dva. Mají skoro stejný tvar, když mají stejný počet větví v jejich postranních řetězcích. Příklady vysoce konzervativních substitucí zahrnují valin za leucin, threonin za serin, kyselinu asparagovou za kyselinu glutamovou a fenylglycin pro fenylalanin. Příklady substitucí, který nejsou vysoce konzervativní zahrnují

alanin za valin, alanin za serin a kyselinu asparagovou za serin.

V inzulínové sloučenině podle předloženého vynálezu může mít řetězec A dodatečné 1-3 aminokyseliny na řetězci A C-terminálního konce, což by byly pozice A22, A23 a A24 obecného vzorce I. Výhodně je aminokyselina na každé z pozici A22, A23 a A24 Xaa, kde Xaa je geneticky kódovatelná aminokyselina.

Řetězec B může mít dodatečné 1-6 aminokyseliny na řetězci B C-terminálního konce, což by byly pozice B31, B32, B33, B34, B35 a B36 obecného vzorce II. V jednom výhodném provedení přihlášky vynálezu řetězec B zahrnuje Ala v poloze B31, Arg v poloze B32 a Arg v pozicích B33. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu řetězec B zahrnuje Ala v poloze B31, Ala v poloze B32, Ala v poloze B33, Ala v poloze B34, Arg v poloze B35 a Arg v poloze B35.

"Účinné množství" inzulínové sloučeniny, mikrokrystalu, suspenze, roztoku amorfního precipitátu nebo kompozic podle předloženého vynálezu je množství, které vede k požadovanému účinku inzulínu bez zapříčinění nepříjemných vedlejších účinků při podání subjektu, který potřebuje inzulínovou terapii. "Účinné množství" inzulínové sloučeniny podle předloženého vynálezu podávané subjektu také záleží na typu a závažnosti nemoci a na charakteristikách subjektu, jako jsou celkový zdravotní stav, věk, pohlaví, tělesná hmotnost a tolerance léků. Znalec v oboru je schopný určit přibližné dávkování v

závislosti na těchto a jiných faktorech. Typicky může být terapeuticky účinné množství inzulinové sloučeniny podle předloženého vynálezu v rozmezí od přibližně 0,01 mg za den do přibližně 1000 mg za den na dospělé osobu. Výhodně se dávkování nachází v rozmezí od přibližně 0,1 mg za den do přibližně 100 mg za den, výhodněji od přibližně 1,0 mg denně do přibližně 10 mg denně.

"Požadovaný terapeutický účinek" zahrnuje jedno nebo více ze následujícího: 1) zlepšení symptomu(ů) spojených s diabetem mellitem, 2) opoždění nástupu symptomů spojených s diabetem mellitem, 3) prodloužení délky života ve srovnání s nepřítomností léčení a 4) větší kvalita života v porovnání s nepřítomností léčení. "Účinné množství" inzulinové sloučeniny podle předloženého vynálezu pro léčbu diabetu je například množství, které by vedlo k větší kontrole koncentrace krevní glukózy než v nepřítomnosti léčení, čímž se dosáhne opoždění v začátku diabetických komplikací jako jsou diabetická retinopatie, diabetická neuropatie nebo nemoci ledvin.

Dávka, cesta podávání a počet dávek za den, určí lékař, který bere na zřetel takové faktory jako jsou terapeutické cíle, charakter a příčina pacientovi nemoci, pohlaví a tělesná hmotnost, fyzická zdatnost, jídelní návyky, způsob podávání a jiné faktory, které jsou známé lékaři znalému dané problematiky. V širokém rozmezí by denní dávka byla v rozmezí od přibližně 1 nmol/kg tělesné hmotnosti do přibližně 6 nmol/kg tělesné hmotnosti (6 nmol je považuje za ekvivalent přibližně 1 jednotky účinku inzulinu). Dávka

mezi přibližně 2 a přibližně 3 nmol/kg je typicky přítomná u inzulínové terapie.

Lékař, který se vyzná v léčbě diabetu je schopný vybrat terapeuticky nejvýhodnější prostředky pro podání přípravku podle předloženého vynálezu. Parenterální cesty podávání jsou výhodné. Typické cesty parenterálního podávání roztoku a suspenze formulací inzulínu jsou podání do podkožní a podání do svalu. Kompozice a přípravek podle předloženého vynálezu mohou také být podávány nosní cestou, přes sliznici dutiny ústní, plicní cestou nebo očním podáním.

Inzulínová sloučenina podle předloženého vynálezu a její kompozice se mohou podávat parenterálně. Parenterální podání může zahrnovat například systémové podání, jako jsou intramuskulární, intravenózní, podkožní nebo intraperitoneální injekce. Výhodně je cesta podání podkožní cesta.

Inzulínová sloučenina podle předloženého vynálezu a její kompozice se mohou podávat subjektu ve spojení s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými excipienty, nosiči nebo ředidly jako část farmaceutické kompozice pro léčbu hyperglykemie.

Inzulínová sloučenina podle předloženého vynálezu a její kompozice, může být a roztok. Alternativně může být inzulínová sloučenina podle předloženého vynálezu a její kompozice suspenzí inzulínové sloučeniny podle předloženého

vynálezu nebo suspenze proteinu sloučeniny v komplexu s divalentním kovovým kationtem.

Také je zde poskytnut způsob pro přípravu kompozice zahrnující inzulinovou sloučeninu podle předloženého vynálezu a alespoň jednu složku zvolenou ze souboru, zahrnujícího činidlo isotonicity, divalentní kationt, hexamer-stabilizující sloučeninu, konzervační činidlo a pufr.

Vhodné farmaceutické nosiče mohou obsahovat inertní složky, které neinteragují s inzulinovou sloučeninu podle předloženého vynálezu. Mohou být použity standardní farmaceutické techniky formulace, jak je popsáno v Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Vhodné farmaceutické nosiče pro parenterální podání zahrnují například destilovanou vodu, fyziologický roztok, bakteriostatický solný roztok (solný roztok obsahující přibližně 0,9 % mg/ml benzyl alkoholu), fosforečnanem-pufrovaný solný roztok. Hankův roztok, Ringer-laktát a podobně. Některé příklady vhodných excipientů zahrnují glycerol, laktózu, dextrózu, sacharózu, trehalózu, sorbitol a manitol.

"Subjektem" je savec, výhodně člověk, ale může jím také být zvíře, například domácí zvířata (například psi, kočky a podobně), hospodářská zvířata (například kráva, ovce, prase, kůň a podobně) a laboratorní zvířata (například krysa, myš, křeček a podobně).

Templát inzulinu a analog inzulinu se mohou získat za použití metod rekombinace. Například se může použít rekombinantní proinzulín nebo analog proinzulinu. Alternativně mohou být rekombinantní inzulinové A- a B-řetězce exprimovány v hostitelských buňkách a potom rekombinovány. Alternativně se může použít inzulinový prekurzor. Každá z těchto metodologií je dobře známá odborníkovi v oboru. Například, viz U.S. patent č. 4,421,685, U.S. patent č. 4 569,791, U.S. patent č. 4,569,792, U.S. patent č. 4,581,165, U.S. patent č. 4,654,324, U.S. patent č. 5,304,473, U.S. patent č. 5,457,066, U.S. patent č. 5,559,094 Evropský patent předložené přihlášky vynálezu EP 741188 A1. Viz také Chance a kol., Diabetes Care 16 (Suppl 3): 133-142 (1993); Chance a kol., "Peptides: Synthesis-Structure-Function," in: Proceedings of the 7th American Peptide Symposium, Rich, D. H. a kol., eds., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, pp. 721-738 (1981); a Frank a kol., Munch. med. Wsch. 125 (Suppl. 1): S14-20 (1983).

Podle jednoho výhodného provedení přihlášky vynálezu se $A0^{Lys-N\epsilon-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-N\epsilon-Arg}$ -inzulín selektivně připraví acylací ϵ -amino skupiny $A0^{Lys}A21^{Gly}B29^{Lys}$ -inzulinu. Selektivní acylace ϵ -amino skupiny může být uskutečněna znalcem v oboru. Například viz U.S. patent č. 5,646,242. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu je $A0^{Lys-N\epsilon-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-N\epsilon-Arg}$ -inzulín se selektivně připraví acylací ϵ -amino skupiny $A21^{Gly}C64^{Arg}C65^{Lys}$ -lidský proinzulinu a natrávením acylovaného proinzulinového derivátu s

proteázami za účelem odstranění nechtěných aminokyselin, za současném ponechání intaktního C65^{Lys-N6-Arg} a B29^{Lys-N6-Arg} za účelem přípravy A0^{Lys-N6-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-N6-Arg}-inzulínového derivátu.

Rekombinantní inzulínové sloučeniny se mohou připravit způsobem, který sestává z kultivace hostitelské buňky obsahující DNA sekvenci kódující inzulínovou sloučeninu nebo její prekursor a schopný exprese polypeptidu ve vhodném živném médiu za podmínek, umožňující expresi peptidu, což je následováno získáním výsledného peptidu z hostitelských buněk a/nebo z média kultury.

Médium, které se použije za účelem kultury buněk může být jakékoli konveční médium vhodné pro růst hostitelských buněk, jako jsou minimální nebo komplexní média, které je vhodně obohaceno. Vhodná média jsou dostupná od komerčních dodavatelů nebo se mohou připravit na základě způsobů, které se získají z publikací (například v katalozích American Typ Culture Collection). Peptid vytvořený buňkami se potom získá z média kultury konvečními způsoby, které zahrnují oddělení hostitelských buněk od média centrifugací nebo filtrací, precipitací složek proteinového charakteru supernatantu nebo filtrací za použití sole, například síranu amonného, purifikací množstvím chromatografických způsobů, například iontoměničovou chromatografií, gelovou filtrační chromatografií, afinitní chromatografií a podobně, v závislosti na daném peptidu.

V souladu s tím je zde uveden způsob exprese inzulinové sloučeniny podle předloženého vynálezu, zahrnující kultivaci hostitelské buňky obsahující inzulinovou sloučeninu za podmínek vhodných pro propagaci hostitelské buňky a pro expresi inzulinové sloučeniny. Podle jednoho výhodného provedení přihlášky vynálezu způsob dále zahrnuje čištění inzulinové sloučeniny z hostitelské buňky. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu způsob dále zahrnuje čištění inzulinové sloučeniny z média kultury. V dosud jiném výhodném provedení způsob dále zahrnuje čištění inzulinové sloučeniny jak z hostitelské buňky a tak z média kultury.

Ve výhodném provedení přihlášky vynálezu je hostitelská buňka je eukaryotickou buňkou. Výhodně je eukaryotickou buňkou je buňka houby, buňka kvasinky, buňka savce nebo nesmrtné savčí buněčné linie. V jiném výhodném provedení přihlášky vynálezu je hostitelská buňka prokaryotickou buňkou. Výhodně je prokaryotickou buňkou bakteriální buňka a výhodněji je jí buňka E. coli.

Sekvence nukleové kyseliny kódující inzulinovou sloučeninu nebo její prekurzor se může vložit do jakéhokoli vektoru, který se může pohodlně podrobit způsobům rekombinantní DNA a výběr vektoru často záleží na hostitelské buňce do které se vnese. Vektor takto může být autonomě se replikující vektorem, například vektorem, který existuje jako extrachromozomální entita, jejíž replikace je nezávislá na chromozomální replikací, například plazmid. Alternativně může být vektorem ten, který se po vnesení do hostitelské

buňky integruje do genomu hostitelské buňky a replikuje se společně s chromozomem nebo chromozomy, do kterých se integruje.

Vektor je výhodně vektorem exprese, kde se DNA sekvence kódující peptid operabilně váže na dodatečné segmenty, které jsou potřeba pro transkripci DNA, jako je promotor. Promotor může být jakákoli DNA sekvence, který vykazuje transkripční aktivitu ve vybrané hostitelské buňce a může být derivatizována od genů kódujících proteiny, které jsou buď homologní nebo heterologní s hostitelskou buňkou. Příklady vhodných promotorů pro vedení transkripce DNA kódující peptid podle předloženého vynálezu v množství hostitelských buněk jsou dobře známé v oboru.

DNA sekvence kódující peptid se může také, pokud je to třeba, operabilně spojit s vhodným terminátorem, polyadenylačními signály, sekvencemi, které zesilují transkripci a sekvencemi, které zesilují translaci. Rekombinantní vektor podle předloženého vynálezu může dále obsahovat DNA sekvence, které umožňují vektoru replikaci v dané hostitelské buňce.

Vektor může také obsahovat marker selekce, například gen produktu, který nahrazuje v hostitelské buňce defekt nebo gen, který buňku vybaví rezistencí vůči léku, například ampicilinu, kanamycinu, tetracyklinu, chloramfenikolu, neomycinu, hygromycinu nebo methotrexátu.

Sekreční signální sekvence (také známá jako vedoucí sekvence, prepro sekvence nebo pre sekvence) může být vnesena v rekombinantním vektoru, za účelem nasměrování peptidu podle předloženého vynálezu na sekreční cestu hostitelských buněk. Sekreční signální sekvence se spojí s DNA sekvencí kódující peptid ve správném čtecím rámci. Sekreční signální sekvence jsou běžně umístěny na 5' konci vzhledem k DNA sekvenci kódující peptid. Sekreční signální sekvence může být normálně spojená s peptidem nebo může být ve formě genu, který kóduje jiný secernovaný protein.

Inzulínová sloučenina podle předloženého vynálezu se může připravit za použití standardních způsobů techniky syntézy peptidů v pevné fázi. Syntetizátory peptidů jsou komerčně dostupné u například Applied Biosystems v Foster City CA. Reakční činidla pro syntézu peptidů fáze pevné látky jsou komerčně dostupné například od Midwest Biotech (Fishers, IN). Syntetizátory peptidů fáze pevné látky se mohou použít v souladu s instrukcemi od výrobce pro blokování interferujících skupin, ochranu aminokyseliny, která má reagovat, kopulaci, dekopulaci a opatření nezreagovaných aminokyselin uzávěrem.

Typicky se α -N-karbamylem chráněná aminokyselina a N-terminální aminokyselina růstoucího peptidového řetězce na pryskyřici kopuluje při teplotě okolí v inertním rozpouštědle jako je dimethylformamid, N-methylpyrolidon nebo methylchlorid za přítomnosti kopulačních činidel jako jsou dicyklohexylkarbodiimid a 1-hydroxybenzotriazol a

baze jako je diisopropylethylamin. α -N-karbamylová ochranná skupina se odstraní z výsledné peptidové pryskyřice za použití reakčního činidla jako jsou kyselina trifluoroctová (TFA) nebo piperidin a kopulační reakce se opakuje s další požadovanou N-chráněnou aminokyselinou, která se přidá k peptidovému řetězci. Vhodné aminové ochranné skupiny jsou dobře známé v oboru a jsou například popsány v Green a Wuts, "Protecting groups in Organic Synthesis", John Wiley a Sons, 1991, která je zahrnuta jako reference. Příklady zahrnují t-butyloxykarbonyl (tBoc) a fluorenylmethoxy-karbonyl (Fmoc).

Peptidy se mohou syntetizovat za použití standardních protokolů automatizované syntézy v pevné fázi za použití t-butoxykarbonyl- nebo fluorenylmethoxykarbonyl-alfa-aminokyseliny s patřičnou ochranou postranního řetězce. Po ukončení syntézy se peptidy oddělí od pevného nosiče se současným zbavením ochrany postranních řetězců za použití standardního fluorovodíkového nebo TFA způsobů. Surové peptidy jsou potom dále čištěny za použití chromatografie s obrácenými fázemi na kolonách Vydac C 18 za použití lineárních gradientů voda-acetonitril, kde všechny rozpouštědla obsahují 0,1 % TFA. Za účelem odstranění acetonitrilu a vody se peptidy lyofilizují z roztoku obsahujícího 0,1 % TFA, acetonitril a vodu. Čistota se může zkontrolovat analytickou chromatografií s obrácenými fázemi. Totožnost peptidů se může zkontrolovat hmotnostní spektrometrií. Peptidy se mohou rozpustit ve vodných pufrech při neutrální hodnotě pH.

Inzulínová sloučenina podle předloženého vynálezu se může připravit chemickou modifikací rekombinantního templátu inzulínu. V jednom provedení se rekombinantní templát inzulínu acyluje s jednou nebo více chráněnými aminokyselinami za použití aktivované skupina karboxylové kyseliny. Výhodně se použije aktivovaný ester nebo amid. Výhodněji se použije aktivovaný ester. Ještě výhodněji se použije N-hydroxysukcinimid (NHS) ester.

V způsobu podle předloženého vynálezu se inzulínová sloučenina připraví chemickou modifikací templátu inzulínu tak, že se templát inzulínu acyluje chráněnou aminokyselinou za použití aktivované skupina karboxylové kyseliny. Výhodně se použije aktivovaný ester nebo amid. Výhodněji se použije aktivovaný ester. Ještě výhodněji se použije N-hydroxysukcinimid (NHS) ester. Techniky acylace N-terminálního konce řetězce A a/nebo Lys řetězce B inzulínu jsou dobře známé odborníkovi v oboru.

Podle jednoho výhodného provedení přihlášky vynálezu se takto rekombinantní A21^{Xaa}-inzulín acyluje v polohách A1 a B29, za účelem přípravy A0^{Arg}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínu. Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu se A21^{Gly}-inzulín acyluje v poloháchh A1 a B29, za účelem přípravy A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínu.

Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu se rekombinantní A0^{Arg}A21^{Xaa}-inzulín acyluje v poloze B29, za účelem přípravy A0^{Arg}A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Lys}-inzulínu. Podle jiného

výhodného provedení přihlášky vynálezu se A0^{Arg}A21^{Gly}-inzulín acyluje v poloze B29, za účelem přípravy A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε}-Lys-inzulínu.

Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu se rekombinantní A0^{Lys}A21^{Xaa}-inzulín acyluje v polohách A0 a B29 za účelem přípravy A0^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínu. Výhodně se A0^{Lys}A21^{Gly}-inzulín acyluje v polohách A0 a B29 za účelem přípravy A0^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínu.

Podle jiného výhodného provedení přihlášky vynálezu se použije analog proinzulínu, za účelem vytvoření inzulinové sloučeniny podle předloženého vynálezu. V lidském proinzulínu divokého typu je Lys aminokyselina v poloze 64 a Arg je aminokyselina v poloze 65. Může se použít analog proinzulínu, který má Arg v poloze 64 a Lys v poloze 65, za účelem vytvoření A0^{Lys}A21^{Xaa}-inzulínu, který se potom acyluje v pozicích A0 a B29, za účelem přípravy A0^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Xaa}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínu. Výhodně se A0^{Lys}A21^{Gly}-inzulín acyluje v poloze B29, za účelem přípravy A0^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínu.

Reakce proteinové acylace se výhodně provedou ve směsích vody a organických rozpouštědel, ale mohou se také provést v čistě organických nebo čistě vodných podmínkách, v závislosti na rozpustnosti reakčních činidel. V následujících příkladech se reakce provedou ve směsích obsahujících mezi 40 a 60 % organické složky s MeOH, DMF nebo CH₃CN jako organickými látkami. Aktivované skupiny

karboxylové kyseliny zahrnují aminokyseliny, dipeptidy nebo krátké polypeptidy, kde ϵ -amino skupina a všechny postranní řetězce funkčních skupin se odvodí od vhodných ochranných skupin, který se výhodně odstraní po ukončení kroku derivatizace proteinu. Výhodně je karboxylát aktivační skupina N-hydroxy-sukcinimid (NHS), díky své příhodné rozpustnosti ve vodných směsích a reaktivitě výsledných NHS-esterů s proteinovými amino skupinami. Poměr NHS-esteru k templátu inzulinu se může měnit mezi 2 a 20, ale výhodně je mezi 3 a 5. Poměr se upraví v závislosti na požadovaném množství mono-, di- a tri-acylovaného produkt(ů) stejně tak jako na relativní reaktivitě vstupujícího NHS-ester reakčního činidla.

Reakce se provedou při teplotě okolí (20-25 stupňů C), obecně při míchání magnetickým tyčkovitým míchátkem nebo mícháním na grilu. Reakce se výhodně nechají způsobovat po dobu 1/2 hodiny do 6 hodin.

Reakce se zastaví po dosažení požadovaného stupně acylace (jak se určí za pomoci LC-MS monitorace) okyselením kyselinou octovou nebo kyselinou trifluoroctovou. Dále analýza/čištění se může provést (1) přímým čištěním reakční směsi za pomoci HPLC s obrácenými fázemi, což je následováno odstraněním ochranné skupiny a opětovným čištěním výsledného izolovaného nechráněného produkt(ů) za pomoci HPLC s obrácenými fázemi nebo (2) ředěním reakční směse vodou na organický obsah pod 25 % a lyofilizací, což je následováno odstraněním ochranné skupiny, čištěním kationtoměničovou chromatografií a konečným čištěním/

zbavením solí HPLC s obrácenými fázemi nebo gelovou filtrací.

Ochranné skupiny mohou zahrnovat skupiny, pro které se zbavení ochrany může provést za podmínek, které jsou srovnatelné s proteiny a peptidy (například podmínek, které nejsou tak hrubé, aby narušily protein/peptid). Za účelem ochrany amino funkčních skupin se například mohou použít terc.-butyloxykarbonylové (Boc) nebo trifluoracetylové (tfa) skupiny. Ochranné skupiny se mohou odstranit například kyselinou trifluoroctovou (TFA) a vodným hydroxidem amonným (NH_4OH). Ochrana guanidinové skupiny se provede prostřednictvím Boc, Pmc (2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl) nebo Pbf (2,2,4,6,7-Pentamethylbenzofuran-5-sulfonyl) skupin. Pmc a Pbf skupiny se také odstraní za pomoci TFA, ale za přítomnosti vychytávačů, jak je popsáno dále v příkladech.

Protože amino skupiny musí být v neutrální (deprotonované) formě, aby zjevně reagovaly v acylaci, hodnota pH, při kterém se reakce provádí, výrazně ovlivňuje míru reakce. Obecně je ve vodných směsích míra reakce dané amino skupiny nepřímo úměrná své hodnotě pK_a , kromě velmi vysokých hodnot pH. Míra reakce může také být ovlivněna sterickým účinkem a účinkem dvou zbytků, které jsou blízko vedle sebe a stupněm dostupnosti postranního řetězce k rozpouštědлу. V případě inzulinu mají tři aminy charakteristické hodnoty pK_a a různý účinek okolního prostředí na reaktivitu, který umožňuje dosažení určité specifické (viz Lindsey a kol., v Biochem. J. 121: 737-745 (1971)). Zvláště ϵ -amino skupina

B29: lysinu postranního řetězce dominuje acylační reakci při hodnotě pH, která je vyšší než 10 (viz Baker a kol. U.S. patent 5,646,242).

Příklady provedení vynálezu

Reakce následujících příkladů byly provedeny při hodnotách pH, které jsou od přibližně 6 do 11, což umožní jemné vytvoření reakční specifity, v závislosti na daném produktu, který je požadován.

V následujících příkladech je totožnost konečných produktů ověřena kombinací technik, který zahrnují LC-MS (ověření molekulové hmotnosti), N-terminální sekvenování proteinu a LC-MS analýza S.aureus V8 proteázovým natrávením, který vede k charakteristickým inzulinovým fragmentům díky specifickému štěpení tímto enzymem peptidových vazeb na karboxylové straně Glu zbytku (viz Nakagawa, S. H. & Tager, H. S. v J. Biol. Chem. 266: 11502-11509 (1991)).

Příklad 1

Acylace B28^{Lys}B29^{Pro}-inzulínu s Boc-Arg(Boc)₂-NHS esterem ve vodě/CH₃CN za účelem přípravy A0^{Arg}B0^{Arg}B28^{Lys-N6-Arg}B29^{Pro} inzulínu

Krystaly B28^{Lys}B29^{Pro}-inzulín-Zn (320 mg; 0,055 mmol) se rozpustí v 30 ml 1: 1 CH₃CN: PBS-pufu. Za účelem rozpustění krystalů při hodnotě pH rovné 10 se přidá (50

μL) 5 M roztoku KOH. Hodnota pH se potom upraví na přibližně 7,5 za použití 5 M kyseliny fosforečné. Boc-Arg(Boc)₂-NHS ester se připraví z 1 mmol každého z Boc-Arg(Boc)₂-OH, NHS a dicyklohexylkarbo-diimidu (DCC) spolu smíchaných v dichlormethanu po dobu 30 minut. Směs se potom filtruje a koncentruje se až do sucha na rotační odparce. Boc-Arg(Boc)₂-NHS ester se potom rozpustí v 4 ml MeOH. 2 ml roztok Boc-Arg(Boc)₂-NHS esteru se přidá k roztoku inzulinu a roztok se míchá při teplotě okolí po dobu 2 hodin. Hodnota pH v tuto chvíli klesne na hodnotu pH, která je přibližně rovná 6,4. Přidání 40 μL roztoku 5 M KOH zvýšilo hodnotu pH zpět na hodnotu, která se rovná 7,1. Zbývající Boc-Arg(Boc)₂-NHS ester se přidá ke směsi inzulinu a v reakci se pokračuje po dobu dodatečných 2,5 hodin. Směs se potom okyselí s 100 μL kyseliny trifluoroctové (TFA), ředěné s 30 ml vody a lyofilizuje se přes noc. Za účelem získání nechráněného produktu se lyofilizovaný celkový materiál o hmotnosti přibližně 900 mg, díky přítomnosti přebytku acylačního reakčního činidla a sole z PBS pufru, rozpustí v 20 ml TFA a nechá se sednout při teplotě okolí po dobu 1 hodiny. Směs se potom odpaří skoro do sucha na rotační odparce a znovu se rozpustí v 20 ml 1: 9 CH₃CN: voda.

Vzorek se analyzuje analytickou HPLC s obrácenými fázemi na Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 mm i. d. x 15 cm kolona s lineárním acidobazickým gradientem, který jde od 10 do 100 % B po dobu 15 minut, kde A = 0,05 % TFA/H₂O a B = 0,05 % TFA v 60: 40 CH₃CN:H₂O a míra toku byla 1 ml/minutu. Za

těchto podmínek vzorek vykázal hlavní maximum, který se ověřilo za pomoci LC-MS s tím, že odpovídá molekulové hmotnosti tri-acylovaného inzulínu, s menším množstvím tetra-acylovaného a di-acylovaného inzulínu vymytého krátce před a krátce po hlavním maximu. Relativní množství produktů nelze určit jelikož se úplně nerozpustí za těchto chromatografických podmínek, ale přibližně 70 % materiálu se zdá být tri-acylované druhy.

Polovina surového acylovaného materiálu se čistí kationtoměničovou chromatografií na skle 2 cm i. d. x 30 cm kolona naplněná SP-Sepharose materiálem. Lineární AB gradient o velikosti 0 až 40 % baze vytvořil za dobu 100 minut tok, která se rovná 3 ml/minutu. Složky rozpouštědla jsou A: 70 mmol octan sodný v H₂O: CH₃CN 70: 30, pH 4,0 a B: 70 mmol octan sodný, 1 M chlorid sodný v H₂O: CH₃CN 70: 30, pH 4,0. Frakce obsahující produkt tri-acylovaného inzulínu se dají dohromady a roztok se koncentruje z přibližně 96 ml na 75 ml, ředí se zpět na 100 ml za pomoci H₂O a naloží se na Vydac C18 2,0 cm i. d. x 25 cm přípravné kolony při 20 ml/minutu. Vzorek se vymyje průtokem, který se rovná 10 ml/min za použití dvoustupňového lineárního AB gradientu o velikosti 0 až 15 % B po dobu 15 minut, což je následováno 15 do 65 % B po dobu 100 min, kde A=0,05 % TFA/H₂O a B = 0,05 % TFA/CH₃CN. Kombinovaný čištěný materiál se lyofilizuje za účelem získání 52 mg, což odpovídá celkovému výtěžku, který se rovná přibližně 34 %.

Příklad 2

Acylace A0^{Arg}-inzulínu Boc-Arg(Boc)₂-NHS esterem ve vodě/CH₃CN za účelem přípravy A0^{Arg}B29^{Lys-N6-Arg}-inzulínu

Boc-Arg(Boc)₂-NHS ester (0,5 mmol) se připraví a rozpustí se v 5 ml MeOH. 104 mg A0^{Arg}-inzulínu (0,017 mmol) se rozpustí v 10 ml 1: 1 PBS pufr/CH₃CN, pH bylo upraveno na hodnotu 11 za pomoci 5 M roztoku KOH, roztok 0,52 ml Boc-Arg(Boc)₂-NHS esteru (0,052 mmol) se přidá k roztoku inzulínu. Hhodnota pH klesne přibližně na 9 a ihned se upraví zpět na hodnotu 11 za pomoci 5 M roztoku KOH.

Reakce se nechá způsobovat po dobu 30 minut při teplotě okolí s následným okyselením za pomoci 200 µL kyseliny octové. Hlavní vrchol je přítomný na analitické HPLC (provedeno jako v příkladu 1, který je uveden výše) se správnou molekulovou hmotností pro mono-acylovaný produkt, jak se určí za pomoci LC-MS. Vzorek se čistí přímo za pomoci HPLC s obrácenými fázemi na Vydac C₁₈ prep. koloně, jak je popsáno výše dvoustupňovým lineárním AB gradientem o velikosti 0 až 18 % B po dobu 15 minut, což je následováno 18 do 100 % B po dobu 160 minut. Sjednocené frakce obsahující produkt se lyofilizují a vznikne celek o hmotnosti přibližně 61 mg. Lyofilizovaný vzorek se rozpustí v 10 ml TFA a nechá se sednout po dobu 30 minut, potom se koncentruje skoro do sucha a znovu se rozpustí v 20 ml 10: 90 CH₃CN:H₂O. Vzorek byl potom podrobí konečnému čištění reverzní fází, jak je popsáno v příkladu 1, který je uveden výše. Konečná lyofilizovaná masa váží 31 mg s celkovým výtěžkem, který se rovná přibližně 30 %.

Příklad 3

Acylace rekombinantního lidského inzulinu Boc-Arg(Pbf)Arg(Pbf)-NHS esterem ve vodě/DMF za účelem přípravy A-1^{Arg}A0^{Arg}-inzulinu

Boc-Arg(Pbf)Arg(Pbf)-NHS ester (0,2 mmol) se připraví z 0,2 mmol každého z Boc-Arg(Pbf)Arg(Pbf)-OH, NHS a dicyklohexylkarbodiimid (DCC) smícháno v dichlormethanu po dobu 60 minut. Vzorek se potom filtruje, odpaří až do sucha a znovu se rozpustí v 4 ml DMF. Rekombinantní krystaly lidského inzulinu-Zn (320 mg; 0,055 mmol) se rozpustí v 20 ml 1: 1 DMF: PBS-pufr. Přidá se 5 M roztok KOH (50 µL za účelem rozpustění krystalů při hodnotě pH 10. Hodnota pH se upraví na 8,2 za pomoci 5 M kyseliny fosforečné a přidá se 3 ml roztoku Boc-Arg(Pbf)Arg(Pbf)-NHS esteru (0,15 mmol).

Po míchání po dobu přibližně 1 hodiny ukázala analytická HPLC (provedena jako v příkladu 1, který je uveden výše) dvě maxima díky monoacylovaným produktům, což se ověří za pomoci LC-MS. Maxima jsou přítomna v přibližně 70: 30 poměru.

Následná LC-MS analýza natrávenin proteázy S.aurea dokázala že větší maximum odpovídalo acylaci N terminálního konce řetězce A a menší maximum odpovídalo směsi druhů, které byly acylované buď na N terminálním konci řetězce B nebo na postranním řetězcí aminu B29: Lys. Čištění na Vydac C₁₈ koloně jako v příkladu 1 vede k 49 mg acylovaného

produktu s chráněným řetězcem A. Tento materiál byl zbaven ochrany směsí 10 ml 94: 2: 2: 2 TFA: anisol: MeOH: triisopropylsilan (TIPS) po dobu 1 hodin při teplotě okolí.

Směs se potom koncentruje skoro do sucha a znovu se rozpustí v 6 ml 20: 80 CH₃CN: H₂O, který se dvakrát extrahuje 10 ml diethyletheru. Konečné čištění HPLC s obrácenými fázemi (jako v příkladu 1) vede k 34 mg produktu A-1^{Arg}A0^{Arg}-inzulínu s celkovým výtěžkem, který se rovná přibližně 10 %.

Příklad 4

Acylace rekombinantního lidského inzulinu s Boc-Arg(Pbf)Arg(Pbf)-NHS esterem ve vodě/DMF za účelem přípravy B-1^{Arg}B0^{Arg}-inzulinu

Díky společnému vymytí monoacylovaných produktů buď na N terminálním konci řetězce B nebo postranním řetězci aminu B29^{Lys} (viz příklad 3 výše), se nejdříve rekombinantní lidský inzulin chrání za pomoci terc.-butyloxykarbonylových (Boc) skupin na N terminálním konci řetězce A a B29^{Lys} aminu postranního řetězce. Rekombinantní lidský inzulin (320 mg) se rozpustí v 20 ml 1: 1 CH₃CN: PBS pufru a upraví se hodnota pH na 10,6. Přidá se di-terc.-butyl dihydrogeuhličitan (2,5 ekvivalentů) ((Boc)₂O) (55 mg v 270 μ L CH₃CN). Po uplynutí 30 minut hodnota pH klesne přibližně na 8,7. Hodnota pH se upraví zpět na přibližně 11 za pomoci 5 M KOH a reakce byl potom nechá probíhat po dobu dodatečných 2,5 hodin. V této chvíli LC-MS analýza prokáže

přítomnost tří hlavních produktů s hmotností mono-, di- a tri-Boc derivatizovaných druhů.

Udávané plochy HPLC maxim udávají, že mono-, di-a tri-Boc deriváty byly přítomné v přibližně 15: 60: 25 relativní poměrech. Čištění materiálu se provede na C₁₈ g preparativní koloně jako v příkladu 1 za pomoci třístupňového lineárního AB gradientu o velikosti: (1) 0 až 20 % B po dobu s časovým rozsahem jdoucím od 0 do 20 minut; (2) 20 do 25 % B po dobu s časovým rozsahem jdoucím od 20 do 30 minut; a (3) 25 do 75 % B po dobu s časovým rozsahem jdoucím od 30 do 230 minut. Di-Boc derivatizovaný produkt (Boc₂-inzulín) se získá po lyofilizaci s výtěžkem o velikosti 82 mg. LC-MS analýza natrávení proteázou V8 S.aurea vedlo k závěru, že, produkt obsahoval Boc skupiny na řetězci A N terminálního konce a B29: Lys postranním řetězcí.

82 mg Boc₂-inzulínu (0,014 mmol) se rozpustí v 10 ml 1: 1 DMF: PBS pufru a hodnota pH se upraví na přibližně 8. Boc-Arg(Pbf)Arg(Pbf)-NHS ester se připraví jako v příkladu 3, který je uveden výše a rozpustí se na koncentraci o velikosti 0,05 mmol/ml v DMF. 1,4 ml roztoku NHS esteru (0,07 mmol) se přidá k Boc₂-inzulínu a nechá se reagovat po dobu 1 hodiny. Přidá se dodatečných 0,6 ml Boc-Arg (roztok PbArg (Pb-NHS esteru (0,03 mmol) a v reakci se pokračuje po dobu další hodiny. Produkt se analyzuje analytickou HPLC jako v příkladu 1, ale za použití lineárního AB gradientu o velikosti 25 do 100 % B po dobu 25 minut, kde A = 0,05 % TFA/H₂O a B = 0,05 % TFA/CH₃CN a míra toku byla 1 ml/min.

Bylo shledáno, že se objevilo jedno maximum se správnou molekulovou hmotností odpovídající Boc-Arg(Pbf)Arg(Pbf)-Boc₂-inzulínovému produktu.

Čištění se provede za pomoci kolony jako v příkladu 1 s třístupňovým lineárním AB gradientem o velikosti: (1) 0 až 25 % B po dobu s časovým rozsahem jdoucím od 0 až 20 minut; (2) 25 do 40 % B po dobu s časovým rozsahem jdoucím od 20 do 40 minut; a (3) 40 do 100 % B po dobu s časovým rozsahem jdoucím od 40 do 100 minut. Čištěný plně chráněný produkt vede po lyofilizaci k 36 mg. Na materiál se působí po dobu 1 hodiny při teplotě okolí za pomoci 10 ml 94: 2: 2: 2 TFA: anisol: MeOH: TIPS za účelem získání plně nechráněného produktu. Směs se potom koncentruje skoro do sucha a znovu se rozpustí v 10 ml 10: 90 CH₃CN: H₂O, což se dvakrát extrahuje 15 ml diethyl etheru. Konečné čištění HPLC s obrácenými fázemi (jako v příkladu 1) vede k 24 mg konečného B-1^{Arg}B0^{Arg}-inzulínového produktu s celkovým výtěžkem, který se rovná přibližně 8 %.

Příklad 5

Acylace A0^{Arg}-inzulínu Boc-Arg(Pbf)Arg(Pbf)-NHS esterem v H₂O/CH₃CN za účelem přípravy A0^{Arg}B-1^{Arg}B0^{Arg}-inzulínu

Boc-Arg(Pbf)Arg(Pbf)-NHS ester (0,5 mmol) se připraví jako v příkladu 3 a rozpustí se v 4 ml MeOH. A0^{Arg}-inzulín (320 mg, 0,054 mmol) se rozpustí v 40 ml 1: 1 CH₃CN: PBS pufru při hodnotě pH 10. Hodnota pH se sníží na přibližně 7. Roztok začíná být kalný díky proteinu, jež začíná být

blízko svého pI o velikosti přibližně 6,3. Přidá se polovina roztoku Boc-Arg(Pbf)Arg(Pbf)-NHS esteru (0,25 mmol; přibližně 4,7 ekvival.) a roztok byl sonikován po dobu 15 minut potom se míchá na grilu po dobu 75 minut. HPLC analýza prokázala dvě maxima, která se se ukázala jako LC-MS monoacylované produkty, přítomné v poměru o velikosti přibližně 85: 15. Vzorek se okyselí za pomoci 100 L TFA potom se ředí 20 ml H₂O. Provede se čištění s obrácenými fázemi jako v příkladu 2 a vede po lyofilizaci k 55 mg hlavního mono-acylovaného produktu. Peptid se zbaví ochrany 20 ml TFA koktejlem popsáným v příkladu 3 po dobu 2 hodin, odpaří skoro do sucha, znovu se rozpustí v 20 ml 10: 90 CH₃CN: H₂O a extrahuje se s 20 ml hexanu. Konečné čištění HPLC s obrácenými fázemi jako v příkladu 1 vede k 38 mg produktu (výtěžek o velikosti 12 %). Tento materiál se následně potvrdí jako požadovaný A0^{Arg}B-1^{Arg}B0^{Arg}-inzulín.

Příklad 6

Acylace rekombinantního lidského inzulinu s Boc-Arg(Boc)₂-NHS esterem ve vodě/CH₃CN za účelem přípravy A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys}-NE-Arg-inzulínu

Krystaly rekombinantního lidského inzulinu-zinku (307 mg; 0,053 mmol) se rozpustí v 30 ml 1: 1 CH₃CN: PBS-pufu. Přidá se 5 M roztok KOH (50 µL) za účelem rozpustění krystalů při hodnotě pH 10. Hodnota pH byl potom snížena na přibližně 7,5 za použití 5 M kyseliny fosforečné. Boc-Arg(Boc)₂-NHS ester (1 mmol) se připraví jako v příkladu 1

a rozpustí se v 4 ml MeOH. Roztok 2 ml Boc-Arg(Boc)₂-NHS esteru (0,5 mmol) se přidá k roztoku inzulínu a výsledná směs se míchá při teplotě okolí po dobu 2 hodin. Hodnota pH v tuto chvíli klesne na přibližně 6,6. Přidání 50 µL roztoku 5 M KOH zvýší hodnotu pH zpět na hodnotu, která se rovná do 7,2.

Potom se zbývajících Boc-Arg(Boc)₂-NHS ester přidá ke směsi inzulínu a v reakci se pokračuje po dobu dodatečných 3 hodin. Směs se potom okyselí s 100, µL TFA, ředí se s 30 ml vody a lyofilizuje se přes noc. Lyofilizovaný celkový materiál vážící přibližně 1,07 g díky přítomnosti přebytku acylačního reakčního činidla a sole z PBS pufru se rozpustí v 20 ml TFA a nechá se sednout při teplotě okolí po dobu 1,5 hodin za účelem získání nechráněného produktu. Směs se potom odpaří skoro do sucha na rotační odparce a znovu se rozpustí v 20 ml 1: 9 CH₃CN: H₂O.

Vzorek se analyzuje analytickou HPLC s obrácenými fázemi jako v příkladu 1 a vykáže podobný chromatografický profil hlavního maxima díky tri-acylovanému produktu a menší množství tetra-acylovaného a di-acylovaného inzulínu vymytého krátce před a krátce po hlavním maximu. Relativní množství produktů nelze určit, jelikož se úplně nerozpustí za těchto podmínek, ale přibližně 70 % materiálu se zdají být tri-acylované druhy (jak již bylo pozorováno v příkladu 1).

Surový acylovaný materiál se čistí kationtoměničovou chromatografií jako v příkladu 1. Kombinovaný čištěný tri-acylovaný inzulin se koncentruje z přibližně 96 ml na 75 ml, ředí se zpět na 100 ml s H₂O a naloží se na Vydac C₁₈ přípravnou kolonu a čistí se jako v příkladu 1. Kombinovaný čištěný materiál se lyofilizuje za účelem získání 96 mg (celkový výtěžek byl přibližně 31 %).

Příklad 7

Acylace A21^{Gly}-inzulinu s Boc-Arg(Boc)₂-NHS esterem v H₂O/CH₃CN za účelem přípravy A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Gly}-inzulinu

Lyofilizovaný A21^{Gly}-inzulin (65 mg; 0,011 mmol) se rozpustí v 8 ml 1: 1 CH₃CN: PBS-pufr. Hodnota pH se upraví na 7,5 za pomoci 5 M roztoku KOH. Boc-Arg(Boc)₂-NHS ester (0,4 mmol) se připraví jako v příkladu 1 a rozpustí se v roztok 2 ml MeOH. Boc-Arg(Boc)₂-NHS esteru (1 ml, 0,2 mmol; 17 ekvivalentů) se přidá k roztok A21^{Gly}-inzulinu a výsledná směs se míchá při teplotě okolí po dobu 3 hodin, hodnota pH v tuto chvíli klesne na přibližně 6,4. Přidáním 20 µL roztoku 5 M KOH se zvýší hodnota pH zpět na hodnotu, která se rovná 7,5. Potom se zbývající 0,2 mmol Boc-Arg(Boc)₂-NHS ester přidá ke směsi inzulinu a v reakci se pokračuje po dobu dodatečných 3 hodin. Směs se potom okyselí 50 µL TFA, ředí se 10 ml vody a lyofilizuje se přes noc. Lyofilizovaný materiál obsahující peptid, přebytek acylačního reakčního činidla a sole z PBS pufru se rozpustí v 20 ml TFA a nechá

se sednout při teplotě okolí po dobu 1 hodiny za účelem získání nechráněného produktu. Směs se odpaří skoro do sucha na rotační odparce a znovu se rozpustí v 20 ml 1: 9 CH_3CN : H_2O , potom se extrahuje 20 ml hexanu. Vzorek se analyzuje analytickou HPLC s obrácenými fázemi jako v příkladu 1 a vykáže podobný chromatografický profil hlavního vrcholu díky tri-acylovanému produktu a menšímu množství tetra-acylovaného a di-acylovaného inzulinu vymytého krátce před a krátce po hlavním maximu. Relativní množství produktů se neurčuje, jelikož se úplně nerozpustí za těchto chromatografických podmínek, ale přibližně 60-70 % materiálu se zdá být požadovými tri-acylovanými druhy.

Surový acylovaný materiál se čistí kationtoměničovou chromatografií jako v příkladu 1. Kombinovaný čištěný tri-acylovaný inzulin se koncentruje z přibližně 96 ml do 75 ml, ředí se zpět na 100 ml s H_2O a naloží se na Vydac C18 polo-přípravnu kolonu (10 mm i. d. x 250 mm). Vzorek se vymyje průtokem, který se rovná 4 ml/min za použití dvoustupňového lineárního AB gradientu o velikosti 0 až 25 % B po dobu 15 minut, což je následováno 25 do 75 % B po dobu 100 minut, kde A = 0,05 % TFA/ H_2O a B = 0,05 % TFA/ CH_3CN . Ččištěný materiál se lyofilizuje za účelem získání 21 mg (celkový výtěžek byl přibližně 32 %).

Příklad 8

Acylace inzulinu Boc-Lys (Boc)-NHS esteruem ve vodě/ CH_3CN za účelem přípravy $\text{A0}^{\text{Lys}}\text{B0}^{\text{Lys}}\text{B29}^{\text{Lys-N}^{\text{B}}\text{-Lys}}$ -inzulinu, a

Guanidylace N,N'-bis-Boc-1-guanylpirazolem (Boc₂-guanylpirazol) na A0^{gHR}B0^{gHR}B29^{lys}-N^ε-gHR-inzulín

"gHR" představuje alfa-guanidinylní homoarginin.
 Rekombinantní krystaly lidského inzulínu-Zn (300 mg, 0,052 mmol) se rozpustí v 20 ml CH₃CN: PBS pufr 1: 1 při hodnotě pH 10 a hodnota pH se potom upraví na přibližně 7. Přidá se deset ekvivalentů Boc-Lys(Boc)-NHS ester (230 mg v 2 ml CH₃CN) a roztok se míchá při teplotě okolí po dobu 2 hodin. V tuto chvíli se přidá dodatečných 230 mg Boc-Lys (Boc)-NHS esteru a v reakci se pokračuje po dobu 2,5 hodin. LC-MS analýza prokázala velké množství přítomných tri-acylovaných druhů a menší množství di-acylovaných druhů. Směs se ředí na 50 ml s H₂O a lyofilizuje se. Zbavení ochrany v 20 ml TFA po dobu 1 hodiny, následované LC-MS ukazuje, že zde bylo opět přibližně 70 % inzulínu v tri-acylované formě, spolu s přibližně 10 % tetra-acylovaného produktu vymytého o něco dříve a 20 % di-acylovaného produktu vymytého o něco později než je hlavní produkt. Vzorek se odpaří skoro do sucha, znovu se rozpustí v 30 ml 30: 70 CH₃CN: H₂O, rozdělí se na dvě stejné části a lyofilizuje se. Jedna z lyofilizovaných částí (0,026 mmol) se rozpustí v 10 ml MeOH: H₂O 9: 1 a přidá se 0,5 ml triethylaminu. Hodnota pH je 9,3. Boc₂-guanylpirazol (160 mg, 0,52 mmol) se přidá a reakce se nechá probíhat po dobu 1 hodiny. Dodatečných 160 mg Boc₂-guanylpirazolu se přidá a v reakci se pokračuje po dobu další hodiny. V tuto chvíli LC-MS analýza prokázala přítomnost produktů s jednou až čtyřmi přidanými Boc₂-guanylovými skupinami.

Dodatečných 800 mg Boc₂-guanylpirazolu (2,6 mmol) se přidá a v reakci se pokračuje po dobu dalších 4 hodin. Celkové množství přidanych 3,6 mmol Boc₂-guanylpirazolu, minus množství, u kterého se očekává reakce s amino skupinami přebytku lysinu, který se přidá v úvodním kroku acylace (1 mmol) vede k 2,6 mmol, jež jsou dostupné pro reakci s triLys-inzulínem (přebytek přibližně 15 ekviv. reakčního činidla na amino skupinu).

Na konci 6 hodinové reakční periody se vzorek koncentruje na rotační odparce skoro do sucha, znovu se rozpustí v 10 ml CH₃CN: H₂O 60: 40 a lyofilizuje se. Na lyofilizovaný vzorek se působí s 20 ml TFA po dobu 2 hodin za účelem získání nechráněného produktu, koncentruje se až do sucha a znovu se rozpustí v 20 ml 15: 85 CH₃CN: H₂O. LC-MS analýza v tuto chvíli ukazuje hlavní vrchol (přibližně 60 % materiálu) s očekávanou hmotou hexa-guanidylovaného produktu a také menší množství spolu vymytého penta-guanidylovaného produktu.

Čištění kationtoměničovou chromatografií se provede jako v příkladu 1, ale za použití jiného lineárního AB gradientu o velikosti 25 do 70 % B po dobu 100 minut průtokem, který se rovná 4 ml/min a 8 ml frakcemi. Spojené frakce (88 ml celkový objem) se koncentrují na rotační odparce na objem přibližně 65 ml, potom se ředí zpět na 90 ml s H₂O. Vzorek se podrobí konečnému RP-HPLC čištění jako v příkladu 1, s výtěžkem 43 mg konečného produktu (celkový výtěžek přibližně 29 %).

Příklad 9

Acylace rekombinantního lidského inzulínu Boc-Lys (tfa)-NHS esterem ve vodě/CH₃CN za účelem přípravy A0^{Lys}B0^{Lys}B29^{Lys}-Nε-Lys-inzulínu

Rekombinantní krystaly lidského inzulínu-Zn (200 mg, 0,034 mmol) se rozpustí v 10 ml 1: 1 CH₃CN: H₂O při hodnotě pH 10, potom se hodnota pH upraví na hodnotu přibližně 7 s 6 moly kyseliny fosforečné. Boc-Lys (tfa)-NHS ester (1 mmol) se připraví z Boc-Lys (tfa)-OH, NHS a DCC jako v příkladu 1 a rozpustí se v 10 ml MeOH. K roztoku inzulínu se přidá 1,7 ml roztoku Boc-Lys (tfa)-NHS esteru (0,17 mmol; 5 ekvivalentů). Směs se nechá reagovat po dobu 75 minut, potom se okyselí s 0,5 ml TFA a ředí se na objem 30 ml. Analytická HPLC a LC-MS potvrdí přítomnosti tří monoacylovaných vrcholů, dvou diacylovaných produktů a jednoho triacylovaného produktu.

Čištění HPLC s obrácenými fázemi jako v příkladu 2, které je následováno lyofilizací oddělených druhů, vede k následujícím chráněným produktům: 33 mg A0^{Lys}B0^{Lys}B29^{Lys}--inzulín; 36 mg A0^{Lys}B0^{Lys}-inzulín; 23 mg B0^{Lys}B29^{Lys}-Nε-Lys-inzulín; 12 mg A0^{Lys}-inzulín; a 31 mg B0^{Lys}-inzulín.

Zbavení ochrany se provede ve dvou krocích. Prvním je odstranění Boc skupiny z Lysinu alfa-amino skupiny, kterého se dosáhne působením na každý z pěti vzorků s 5 ml TFA po dobu 30 minut. Roztok se potom odpaří skoro do sucha a

zbylý TFA se odstraní foukáním dusíku na zkumavku vzorku. Potom se TFA skupiny odstraní z amino skupin lysinu přidáním 6 ml 15 % $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (objemově) a vzorek se nechá stát při teplotě okolí po dobu 3-4 hodin. Vzorky se potom ředí na objem 40 ml s H_2O a okyselí se kyselinou octovou (1,5 ml) na hodnotu pH 4. Vzorky se podrobí konečnému čištění jako v příkladu 1, což vede k následujícím konečným množstvím: 14 mg $\text{A0}^{\text{Lys}}\text{B0}^{\text{Lys}}\text{B29}^{\text{Lys-N6-Lys}}$ -inzulín; 17 mg $\text{A0}^{\text{Lys}}\text{B0}^{\text{Lys}}$ -inzulín; 8 mg $\text{B0}^{\text{Lys}}\text{B29}^{\text{Lys-N6-Lys}}$ -inzulín; 5 mg A0^{Lys} -inzulín; a 16 mg B0^{Lys} -inzulín.

Příklad 10

Acylace A21^{Gly} -inzulínu Boc-Arg(Pbf)-NHS esterem ve vodě/ CH_3CN za účelem přípravy $\text{A0}^{\text{Arg}}\text{A21}^{\text{Gly}}\text{B29}^{\text{Lys-N6-Arg}}$ -inzulínu

A21^{Gly} -inzulín (230 mg; 0,040 mmol) se rozpustí v 24 ml 1: 1 CH_3CN : voda. Přidá se 200 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Roztok 5 M KOH se přidá (přibližně 50 L) za účelem upravení hodnoty pH na 10,5. Připraví se Boc-Arg(Pbf)-NHS esteru z 0,4 mmol každého z Boc-Arg(Pbf)-OH, N-hydroxysukcinimid (NHS) a dicyklohexylkarbodiimid (DCC) spolu smíchaných v dichlormethanu (DCM) po dobu 30 minut. Směs se potom filtruje a koncentruje se až do sucha na rotační odparce. Výsledných 0,4 mmol Boc-Arg(Pbf)-NHS esteru se rozpustí v 4 ml MeOH. Roztok 1 ml Boc-Arg(Pbf)-NHS esteru (0,1 mmol; 2,5 ekvivalentů) se přidá k roztoku inzulínu a směs se míchá při teplotě okolí po dobu 1 hodiny, hodnota pH v tuto chvíli klesne na přibližně 9,8. Hodnota pH se dále sníží na

9,0 s 6 M H_3PO_4 . Přidá se další 1 ml roztoku Boc-Arg(Pbf)-NHS esteru (0,1 mmol; 2,5 ekvivalentů) k roztoku inzulinu a směs se míchá při teplotě okolí po dobu další 1 hodiny. V tuto chvíli směs ukáže za pomoci HPLC s obrácenými fázemi (provedeno na Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 mm i. d. x 15 cm kolona s lineárním acidobazickým gradientem o 10 do 100 % B po dobu 15 minut, kde A = 0,05 % TFA/ H_2O a B = 0,05 % TFA v 60: 40 CH_3CN : H_2O s míra toku o velikosti 1 ml/min), že zahrnuje primárně monoacylovaný a diacylovaný produkt v přibližně 57: 43 poměru. Přidá se dalších 0,5 ml roztoku Boc-Arg(Pbf)-NHS esteru (0,05 mmol; 1,25 ekvivalentů) k roztoku inzulinu a směs se míchá po dobu 5 minut. Proveďte se druhé přidání 0,5 ml roztoku Boc-Arg(Pbf)-NHS esteru a směs se míchá po dobu 10 minut, potom se okyselí kyselinou trifluorooctovou (TFA) na hodnotu pH 3. Roztok byl ředí s 20 ml 50: 50 CH_3CN : vody a filtruje se. Konečná reakční směs obsahuje hlavní monoacylované a diacylované produkty v 30: 70 poměru, jak HPLC určí plochu maxima UV detekcí při vlnové délce 220 nm.

Surový acylovaný materiál se čistí za pomoci HPLC s obrácenými fázemi na Vydac C18 2,2 cm i. d. x 25 cm přípravné kolony. Vzorek se vymyje průtokem, který se rovná 12 ml/min za použití dvoustupňového lineárního AB gradientu o velikosti: (a) 0 až 18 % B po dobu 15 minut, což je následováno (b) 18 do 68 % B po dobu 100 minut, kde A = 0,05 % TFA/ H_2O a B = 0,05 % TFA/ CH_3CN . Frakce obsahující diacylovaný inzulin se dají dohromady a lyofilizují se s výtěžkem 134 mg chráněného produktu. Tento materiál zbaví ochrany směs 20 ml 91: 3: 3: 3 TFA: anisol: MeOH:

triisopropylsilan (TIPS) po dobu 1,5 hodiny při teplotě okolí, potom se koncentruje skoro do sucha na rotační odparce a znovu se rozpustí v 25 ml 10: 90 CH₃CN: H₂O, dvakrát se extrahuje 20 ml diethyl etherem. Konečné čištění HPLC s obrácenými fázemi se provede na stejné Vydac C₁₈ koloně, jako je popsáno výše při 12 ml/min s dvoustupňovým lineárním AB gradientem o velikosti: (a) 0 až 15 % B po dobu 15 minut, což je následováno (b) 15 do 55 % B po dobu 100 minut, kde A = 0,05 % TFA/H₂O a B=0,05 % TFA/CH₃CN. Toto vede k 77 mg A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínového produktu s celkovým výtěžkem, který se rovná přibližně 33 %.

Příklad 11

Acylace A21^{Gly}-inzulínu (1) Boc-Arg(Pbf)-NHS esterem a (2) Boc-Lys (Boc-Arg(Pbf))-NHS esterem ve vodě/CH₃CN za účelem přípravy A0^{Lys-Nε-Arg}-B29^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Gly}-inzulínu

Boc-Lys (Boc-Arg(Pbf))-OH se syntetizuje na Cl-(2'-chlor) trityl polystyren polymeru. Polymer se nanese v dvojnásobném přebytku Boc-Lys (Fmoc)-OH ve směsi 90: 10 dimethylformamid (DMF): diisopropylethylamin (DIEA). Fmoc skupina se následně odstraní ε-amino skupiny Lysinu 20 % roztokem piperidinu v DMF. α-karboxyát Fmoc-Arg(Pbf)-OH (čtyř-násobný přebytek) se potom kopuluje s volnou amino skupinou prostřednictvím aktivace s O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluor-fosforečnanem (HBTU) a DIEA v poměru aminokyselina: HBTU: DIEA o velikosti 1: 0,95: 3 v DMF roztoku. Fmoc skupina se

odstraní z ϵ -amino skupiny Arg 20 % roztokem piperidinu v DMF, což je následováno opatřením uzávěrem volného aminu pěti-násobným nadbytkem Di-terc.-butyl-diuhličitanu (Boc-anhydrid) a DIEA v poměr o velikosti 1: 2 v DMF roztoku. Sloučenina se oddělí od polymeru dvojnásobným působením 30 ml 1: 2 hexafluorisopropanol (HFIP): dichlormethanu (DCM) po dobu 40 minu každý. Kombinovaný roztok se filtruje a odpaří se na rotační odparce. Boc-Arg(Pbf)-NHS ester a Boc-Lys (Boc-Arg(Pbf))-NHS ester se připraví jak je popsáno v příkladu 1, míchání stejných dílů NHS a DCC s odpovídající kyselinou v DCM.

A21^{Gly}-inzulín (230 mg; 0,040 mmol) se rozpustí v 24 ml 1: 1 CH₃CN: voda. Přidá se 200 mg NaH₂PO₄ H₂O. Přidá se 5 M KOH roztok (přibližně 50 μ L) za účelem upravení hodnota pH na 10,5. Boc-Arg(Pbf)-NHS ester (0,4 mmol) se rozpustí v 4 ml MeOH. 1 ml Roztok Boc-Arg (Pb)-NHS esteru (0,1 mmol; 2,5 ekvivalentů) se přidá k roztoku inzulinu a směs se míchá při teplotě okolí po dobu 40 minut. V tuto chvíli směs za pomoci HPLC s obrácenými fázemi ukáže (provedeno na Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 mm i. d. x 15 cm kolona s lineárním acidobazickým gradientem o velikosti 10 do 100 % B po dobu 15 minut, kde A = 0,05 % TFA/H₂O a B = 0,05 % TFA v 60: 40 CH₃CN: H₂O míra toku o velikosti 1 ml/min), že ukazuje primárně úvodní materiál a monoacylovaný produkt v 40: 60 poměru. Dalších 0,6 ml roztoku Boc-Arg(Pbf)-NHS esteru (0,06 mmol; 1,5 ekvivalentů) se přidá k roztoku inzulinu a směs se míchá při teplotě okolí po dobu dalších 15 minut, v tuto chvíli se inzulín primárně přemění na monoacylované

druhy. Hodnota pH se v tuto chvíli sníží za 10,2 na 9,0 přidání 6 M H_3PO_4 . Boc-Lys (Boc-Arg(Pbf))-NHS ester (0,12 mmol) rozpustí v 2 ml MeOH a přidá se k roztoku inzulínu. Směs se míchá při teplotě okolí po dobu 30 minut, potom se ředí 20 ml 50: 50 CH_3CN : voda a okyselí se 300 μL TFA a filtruje se. Hlavní maximum, které se pozoruje za pomoci HPLC s obrácenými fázemi odpovídá produktu, který se odvodí od jednoho z Boc-Arg(Pbf) a Boc-Lys (Boc-Arg(Pbf)), jak se ověří za pomoci HPLC-hmotnostní spektrální analýzy.

Surový acylovaný materiál se čistí za pomoci HPLC s obrácenými fázemi na Vydac C18 2,2 cm i. d. x 25 cm přípravné koloně. Vzorek se vymyje průtokem, který se rovná 13 ml/min za použití dvoustupňového lineární AB gradientu o velikosti: (a) 0 až 30 % B po dobu 20 minut, což je následováno (b) 30 do 80 % B po dobu 100 minut, kde A = 0,05 % TFA/ H_2O a B = 0,05 % TFA/ CH_3CN . Frakce obsahující diacylovaný inzulín se dají dohromady a lyofilizují se s výtěžkem o velikosti 105 mg chráněného produktu. Tento materiál se zbaví ochrany směsí 20 ml 91: 3: 3: 3 TFA: anisol: MeOH: triisopropylsilan (TIPS) po dobu 2 hodin při teplotě okolí, potom se koncentruje skoro do sucha a znovu se rozpustí v 25 ml 10: 90 CH_3CN : H_2O , extrahuje se třikrát s 20 ml diethyletherem. Konečné čištění HPLC s obrácenými fázemi se provede na stejné Vydac C18 koloně, která je popsána výše při 12 ml/min s dvoustupňovým lineárním AB gradientem o velikosti: (a) 0 až 15 % B po dobu 15 minut, což je následováno (b) 15 do 55 % B po dobu 100 minut, kde A = 0,05 % TFA/ H_2O a B = 0,05 % TFA/ CH_3CN . Toto vede k 60

mg A0^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínému produktu s celkovým výtěžkem, který se rovná přibližně 25 %.

Příklad 12

Příprava A0^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínu

Plazmid obsahující sekvenci kódující lidský analog proinzulínu A21^{Gly}C64^{Arg}C65^{Lys}-lidský proinzulín se exprimuje v *E. coli*. Analog proinzulínu se čistí a složí se a potom se následujícím způsobem acyluje. Boc-Arg(Boc)₂-NHS ester se připraví z 0,4 mmol každého z Boc-Arg(Boc)₂-OH, N-hydroxysukcinimid (NHS) a dicyklohexylkarbodiimid (DCC) spolu smíchaných v 3 ml dichlormethanu (DCM) po dobu 40 minut. Směs se potom filtruje a koncentruje se až do sucha na rotační odparce. Výsledných 0,4 mmol Boc-Arg(Boc)₂-NUS esteru se potom rozpustí v 4 ml MeOH.

Přibližně 108 mg A21^{Gly}C64^{Arg}C65^{Lys}-lidského proinzulínu v 180 ml 10 mmol HCl roztoku se rozdělí na dvě stejné dávky a lyofilizuje se. Jedna z proinzulínových porcí se znovu rozpustí s 12 ml 50/50 voda/CH₃CN. Přidá se NaH₂PO₄ (80 mg) za účelem získání PO₄ koncentrace rovné přibližně 50 mmol. Hodnota pH se upraví na 8,2 za pomoci 5 M roztoku KOH. Přidá se jeden ml Boc-Arg(Boc)₂-NHS ester (0,1 mmol; přibližně 20 ekvivalentů) a směs se míchá při teplotě okolí po dobu 2,5 hodin, po tomto čase hodnota pH klesne na 7,4. Hodnota pH se upraví nazpět na 8,2 a přidá se další roztoku 1 ml Boc-Arg(Boc)₂-NHS esteru. Roztok se míchá po dobu

dodatečných 3 hodin, potom se ředí na 50 ml vodou, okyselí se 200 μ L kyseliny trifluoroctové (TFA) a lyofilizuje se. Lyofilizovaná reakční směs se znovu rozpustí v 20 ml 95: 5 TFA: voda a nechá se při teplotě okolí po dobu 1,5 hodin. TFA směs se odpaří skoro do sucha na rotační odparce, potom se ředí s 25 ml 10 % CH_3CN /voda a extrahuje se dvakrát s 20 ml diethyl etherem. Nechráněná směs se analyzuje za pomoci HPLC s obrácenými fázemi na Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 mm i. d. x 15 cm kolonou s lineárním acidobazickým gradientem o velikosti 10 do 100 % B po dobu 15 minut, kde A = 0,05 % TFA/ H_2O a B = 0,05 % TFA v 60: 40 CH_3CN : H_2O s mírou toku o velikosti 0,9 ml/min a hmotnostně specifickou detekcí a ukáže, že obsahuje malé množství "přeacylovaného" produktu, kde jsou vázány více než tři očekávané dodatečné Arg zbytky (každý na N terminálním aminu a aminech postranního řetězce Lysinu B29: Lys a C65: Lys). Toto je pravděpodobně díky vazbě zbytku Arg postranní řetězec fenolové skupiny Tyr, imidazolové skupiny His postranního řetězce nebo jiných reaktivních postranních skupin řetěců. Hodnota pH roztoku proinzulínu se zvýší na pH 10,5 po dobu 30 minut se záměrem snížit množství přeacylace produktů těchto vazeb hydrolýzou katalyzovanou bází. Množství přeacylovaných druhů se v zásadě sníží tímto způsobem změny hodnoty. Po 30 minutách působení vysokým pH se hodnota pH sníží zpět na hodnotu přibližně 3 s TFA a roztok se uchovává při teplotě -20°C .

Chemická modifikace, zbavení ochrany a způsob změny hodnoty pH se opakuje pro druhou dávku $\text{A21}^{\text{Gly}}\text{C64}^{\text{Arg}}\text{C65}^{\text{Lys}}$ -lidského proinzulínu. Výsledné roztoky $\text{A21}^{\text{Gly}}\text{B29}^{\text{Lys-N\epsilon-Arg}}\text{-C64}^{\text{Arg}}\text{C65}^{\text{Lys}}$ -

N⁶-Arg-lidského derivátu proinzulínu se kombinují a lyofilizují. Čistota surového nechráněného materiálu je přibližně 65 %, jak se určí za pomoci plochy maxima určené díky HPLC s obrácenými fázemi.

Acylovaný proinzulínový derivát se natráví trypsinem a karboxypeptidázou B za účelem odstranění vedoucí sekvence a "C peptidu" ze zbytku C31 Arg až C64^{Arg} za současného ponechání intaktních polovin C65^{Lys-N⁶-Arg} a B29^{Lys-N⁶-Arg}, za účelem přípravy A0^{Lys-N⁶-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-N⁶-Arg}-inzulínového derivátu. Tvorba Des-30 inzulínového produktu se účinně blokuje modifikací na B29^{Lys}. Čištěný A0^{Lys-N⁶-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-N⁶-Arg}-inzulín se použije v in vitro a in vivo pokusech, jak je následovně uvedeno.

Příklad 13

In vitro receptorová afinita

Afinita inzulínové sloučeniny pro receptor lidského inzulínu (IR) se měří pokusem kompetitivní vazby za použití radioaktivně označeného ligandu, [¹²⁵I] inzulínu. Membrány receptoru lidského inzulínu se připraví jako P1 membránový přípravek stabilně transfekovaných 293EBNA buněk exprimujících receptor ve zvýšené míře. Pokus byl vyvinut a potvrdil jak filtrací a tak SPA (scintillation proximity assay) způsobem porovnatelnými výsledky, ale provede se SAP způsobem za použití PVT PEI, na který se působí kuličkami SPA, kopulovanými s aglutinem z pšeničných klíčků, kuličky

Typ A (WGA PVT PEI SPA) od firmy Amersham Pharmacia Biotech.

Radioaktivně označený ligand ($[^{125}\text{I}]$ rekombinantní lidský inzulin) se připraví v laboratoři nebo se zakoupí od firmy Amersham Pharmacia Biotech, se specifickou aktivitou 2000 Ci/mmol v den referenčního data. SPA pokusným pufrům je 50 mmol Tris-HCl, pH 7,8, 150 mmol NaCl, 0,1 % BSA. Pokus byl navržen pro vysoký výkon v 96-jamkových mikrodestičkách (Costar, #3632) a automatizován s radioligandem, membrány a SPA kuličky se přidávají za pomoci Titertec/Plus (ICN Pharmaceuticals).

Reakční činidla se přidávají do jamek destičky v následujícím pořadí:

Reakční činidlo	Konečná koncentrace
Kontrola nebo ředění inzulinové sloučeniny	Min signál (BHI) = 0,1 μmol , všechny jiné sloučeniny [Hi] = 0,1 μmol
$[^{125}\text{I}]$ rekombinantní lidský inzulin	50 pmol
HIR membrány	1,25 μg
WGA PVT PEI SPA kuličky	0,25 mg/jamka

Destičky byly zakryjí adhezivním uzávěrem destiček a třepou se po dobu 1 minuty na LabLine Instruments třepačce řady destiček. Destičky byly inkubovány při teplotě okolí (22

°C) po dobu 12 hodin jejich umístěním do Wallac Mikrobeta scintilačního počítadla a nastavením časového zařízení po dobu 12 hodin. Počítá se po dobu 1 minuty na jamku za použití normalizovaného protokolu pro [^{125}I].

IC_{50} pro každou inzulinovou sloučeninu se určí za pomoci 4-parametrové logistické nelineární regresní analýzy. Data se uvedou jako průměr $\pm$ střední odchylka. Relativní afinita se určí srovnáním každé inzulinové sloučeniny s kontrolou tvořenou rekombinantním lidským inzulinem v každém pokus a potom se provede průměrná relativní afinita počtu pokusů. Proto srovnání průměrné hodnoty IC_{50} pro inzulinovou sloučeninu s průměrem IC_{50} pro inzulin negeneruje stejné hodnoty.

Afinita každé inzulinové sloučeniny a rekombinantního lidského inzulinu pro receptor inzulinového růstového faktoru (IGF1-R) se měří v pokusu kompetitivní vazby za použití [^{125}I] IGF-1 radioaktivně označeného ligandu. Membrány lidského IGF-1 receptoru se připraví jako membránový přípravek P1 stabilně transfekovaných buněk 293EBNA exprimujících receptor ve zvýšené míře. Pokus byl vyvinut a potvrzen v módu filtrace a SPA (pokusu proximitní scintilace) s porovnatelnými výsledky, ale byl běžně prováděn v SAP módu za použití SPA kuliček kopulovaných s aglutinem z pšeničných klíčků ošetřených pomocí PVT PEI, Typ A (WGA PVT PEI SPA) od společnosti Amersham Pharmacia Biotech. [^{125}I] IGF-1 radioaktivně označený ligand se připraví v laboratoři nebo se zakoupí od Amersham Pharmacia Biotech, se specifickou aktivitou 2000 Ci/mmol v referenční

den. SPA testový pufr byl 50 mmol Tris-HCl, pH 7,8, 150 mmol NaCl, 0,1 % BSA. Pokus byl navržen pro vysoký výkon v 96-jamkových mikrodestičkách (Costar, #3632) a automatizován s radioligandem, membránami a SPA kuličkami přidávanými za pomoci Titertec/Plus (ICN Pharmaceuticals).

Reakční činidla byla přidána do jamek destičky v následujícím pořadí.

Reakční činidlo	Konečná koncentrace
Ředění kontroly nebo inzulinové sloučeniny	Min signál (IGF-1) = 1 μ M, všechny další jiné sloučeniny [Hi]=10 μ M
[¹²⁵ I] IGF-1	50 pM
IGF-1 R membrány	1,25 μ g
WGA PVT PEI SPA kuličky	0,25 mg/jamka

Destičky byly zakryty adhesivním krytem destičky a třepány pro 1 minutu na třepačce LabLine Instruments řady destiček. Destičky byly inkubovány při teplotě okolí (22 °C) po 12 hodin jejich umístěním v scintilačním počítači Wallac Mikrobeta a nastavením časového zařízení na 12 hodin. Počítání byl prováděno po 1 min na jamku za použití normalizovaného protokolu pro [¹²⁵I].

IC₅₀ pro každou inzulinovou sloučeninu se určí za pomoci 4-parametrové logistické nelineární regresní analýzy. Data se uvedou jako průměr $\pm$ SEM. Relativní afinita se určí

srovnáním každé inzulinové sloučeniny s kontrolou rekombinantního inzulinu v každém pokusu a potom se provede průměrná relativní afinita počtu pokusů. Proto nevede srovnání průměrné hodnoty IC_{50} pro každou inzulinovou sloučeninu s průměrem IC_{50} pro inzulin ke stejné hodnotě.

Index selektivity se vypočítá jako poměr IR relativní afinity k IGF-1 R relativní afinitě. Index selektivity > 1 ukazuje větší relativní selektivitu pro HIR. Index selektivity < 1 ukazuje větší relativní selektivitu pro IGF-1R.

Tabulka 1 znázorňuje afinitu k inzulinovému receptoru (IR), receptorovou afinitu k inzulinu podobnému růstovému faktoru 1 (IGF1-R) a index receptorové selektivity (IR/IGF1-R) pro každou inzulinovou sloučeninu a rekombinantní lidský inzulin.

TABULKA 1							
Inzulinová sloučenina	Relativní IR Afinita			Relativní IGF1-R Afinita			Index
	Střed	SEM	n	Střed	SEM	n	
rekombinantní lidský inzulin	1,00	0,00	63	1,00	0,00	63	1,00
A0 ^{Arg} B0 ^{Arg} B29 ^{Lys} - Nε-Arg-inzulin	0,60	0,06	10	0,84	0,03	9	0,71
A0 ^{Arg} A21 ^{Gly} B29 ^{Lys} - Nε-Arg-inzulin	0,34	0,02	8	0,39	0,03	8	0,87
A0 ^{Lys} -Nε-Arg-	0,41	0,04	8	0,4	0,04	8	1,01

A21 ^{Gly} B29 ^{Lys-N8-}							
Arg-inzulín							

Příklad 14

In vitro metabolický účinek

Metabolický účinek (odběr glukózy) každé inzulínové sloučeniny a rekombinantního lidského inzulínu se určí v pokusu odběru glukózy za použití diferenciovaných myších 3T3-L1 adipocytů. Nediferenciované myši 3T3 buňky se vysadí v hustotě 25000 buněk /jamka v 100 μ L růstového média (DMEM, vysoký obsah glukózy, bez L-glutaminu, 10 % telecího séra, 2 mmol L-glutaminu, 1 % antibiotický/antimykotický roztok).

Diferenciace začne 3 dny po vysazení přidáním diferenciačního média: DMEM, vysoká glukóza, bez L-glutaminu, 10 % FBS, 2 mmol L-Glutamin, 1 % antibiotický/antimykotický roztok, 10 mmol HEPES, 0,25 mmol dexamethazon, 0,5 mmol 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), 5 mg/ml inzulín. Po 48 hodinách (den 3), se diferenciační médium za médium s inzulínem, ale bez IBMX nebo dexamethazonu a v den 6 se buňkám změní médium na diferenciační médium neobsahující inzulín, IBMX nebo dexamethazon. Buňky se udržují v FBS médiu, s každodenní výměnou.

Experiment transportu glukózy se provede za použití Cytostar T 96 jamkových destiček. 24 hodin před pokusem se

k buňkám přidá 100 μL média bez séra obsahujícího 0,1 % BSA. V den pokusu se médium odstraní a přidá se 50 μL pokusného pufru: tak zvaný KRBH nebo Krebs-Ringerův pufr obsahující HEPES, pH 7,4 (118 mmol NaCl, 4,8 mmol KCl, 1,2 mmol $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1,3 mmol $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,2 mmol KH_2PO_4 , 15 mmol HEPES). Ředěním inzulinu se připraví v stejný pufr s 0,1 % BSA a přidá se 2X. Kontrola obsahovala KRBH, 0,1 % BSA a 20 mmol 2X 2-deoxy-D-Glukózy, 0, 2 μCi /jamka 2-deoxy-D-(U- ^{14}C) glukózy a 2×10^{-7} inzulinu. Buňky se inkubují za teploty 37 °C po dobu 1 hodiny. Po této periodě se přidá 10 μL cytochalazinu B na konečnou koncentraci o velikosti 200 μmol v KRBH a destičky se čtou na Mikrobeta čtecím zařízení destiček. Relativní afinita se určí srovnáním každé inzulinové sloučeniny vzhledem k rekombinantní lidské inzulinové kontrole v každém pokusu a potom se provede průměrná relativní afinita počtu pokusů. Proto nevede srovnání průměrné hodnoty EC_{50} pro každou inzulinovou sloučeninu s průměrem EC_{50} pro inzulin ke stejné hodnotě.

Tabulka 2 znázorňuje in vitro metabolický účinek pro každou inzulinovou sloučeninu a rekombinantní lidský inzulín.

TABULKA 2		
Inzulínová sloučenina	Metabolický účinek	
	Střed	N
rekombinantní lidský inzulín	1,00	48
A0 ^{Arg} B0 ^{Arg} B29 ^{Lys-Nε-Arg} -inzulín	0,85	4
A0 ^{Arg} A21 ^{Gly} B29 ^{Lys-Nε-Arg} -inzulín	0,48	2
A0 ^{Lys-Nε-Arg} -A21 ^{Gly} B29 ^{Lys-Nε-Arg} -inzulín	0,4	2

Příklad 15

In vitro mitogenicita

Mitogenní účinek každé inzulinové sloučeniny se určí měřením proliferace lidských epiteliálních buněk prsu (HMEC) v kultuře. HMEC se získá od firmy Clonetics Corporation (San Diego, CA) při pasáži číslo 7 a byly expandují a zamrazí se při pasáži číslo 8. Pokaždé se použije čistá ampule tak, aby se všechny pokusy provedly při stejné pasáži číslo 10 HMEC. Buňky se udržují v kultuře v souladu s Bio Whittaker instrukcemi. Za účelem udržení buněčné kultury se růstové médium mění každý den a kultury se každý den prohlížejí.

Dva produkty od firmy BioWhittaker byly použity jako růstové médium:

1. Plně obohacené MEGM (CC-3051), zahrnující: (množství ukazují konečné koncentrace, kromě BPE)
10 ng/ml hEGF (lidský rekombinantní Epidermální Růstový faktor)
5 µg/ml inzulínu
0,5 µg/ml hydrokortison
50 µg/ml Gentamicin,
50 ng/ml Amfotericin-B
13 mg/ml BPE (Hovězí extrakt z hypofýzy) 2ml (přiloženo); a
2. Bazální Médium (MEBM, CC-3151) s výše uvedeným obohacením (SingleQuots, CC-3150)
13 mg/ml BPE (Hovězí extrakt z hypofýzy (CC-4009) 2 ml
10 µg/ml hEGF (CC-4017) 0,5 ml
5 µg/ml inzulínu (CC-4031) 0,5 ml
0,5 mg/ml hydrokortisonu (CC-4031) 0,5 ml
50 mg/ml Gentamicinu,
50 mg/ml Amfotericinu-B (CC-4081) 0,5 ml.

Pro pokus růstu bylo pokusným médiem růstové médium bez 5 µg/ml inzulínu a s 0,1 % BSA. Pokus se provede v 96 jamkových Cytostart scintilačních mikrodestičkách (Amersham Pharmacia Biotech, RPNQ0162). Rekombinantní lidský inzulín a IGF-1 se použily jako kontroly v každém pokusu a rekombinantní lidský inzulín byl na každé pokusné destičce.

Pokusy se provedou v souladu s následujícím protokolem. V den jedna se HMEC vysadí v hustotě 4000 buněk/jamka v 100 µl pokusného média. Inzulín v růstovém médiu byl nahrazen stupňovanými dávkami rekombinantního lidského inzulínu nebo

jinou inzulínovou sloučeninu od 0 do 1000 nmol konečné koncentrace. Po 4 hodinové inkubaci se přidá do každé jamky 0,1 μ Ci 4C-thymidinu v 10 μ l pokusného média a destičky se čtou 48 hodin a/nebo 72 hodin na Trilux.

Typicky se nachází maximální růstová odezva mezi 3-4-násobkem stimulace vzhledem k základu. Data odezvy se normalizují na 0 až 100 % odezva rovná se $100 \times (\text{odezva při koncentraci } X - \text{odezva při koncentraci nula}) / (\text{odezva při maximální koncentraci} - \text{odezva při nulové koncentraci})$. Data koncentrace-odezva se vyhodnotí nelineární regresí za použití software JMP.

Relativní mitogenní účinek se určí srovnáním každé inzulínové sloučeniny k inzulínové kontrole v každém pokusu a potom zprůměrováním relativního účinku vzhledem k počtu provedených pokusů. Proto srovnání průměrné hodnoty nevede ke stejné hodnotě EC_{50} pro každou inzulínovou sloučeninu s průměrem EC_{50} pro inzulín.

Tabulka 3 znázorňuje in vitro mitogenicitu,, která se měří jako buněčná proliferace, pro každou inzulínovou sloučeninu. Data v Tabulce 3 ukazují, že každá z inzulínových sloučenin je méně mitogenní než rekombinantní lidský inzulín.

TABULKA 3			
Inzulínová sloučenina	Mitogenní účinek		
	Střed	SEM	N
rekombinantní lidský inzulín	1,00	0,00	250
A0 ^{Arg} B0 ^{Arg} B29 ^{Lys-Nε-Arg} -inzulín	0,76	0,10	4
A0 ^{Arg} A21 ^{Gly} B29 ^{Lys-Nε-Arg} -inzulín	0,35	0,04	7
A0 ^{Lys-Nε-Arg} -A21 ^{Gly} B29 ^{Lys-Nε-Arg} -inzulín	0,36	0,03	7

Příklad 16

Rozpustnost v solném roztoku fosforečnanového pufru

Pokus in vitro srážení ukazující náchylnost k prodlouženému účinku v čase in vivo se provede způsobem, který je uveden následovně. pH vodného roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 a obsažená farmakologická dávka (100 mezinárodních jednotek) inzulínové sloučeniny a 30 µg/ml of Zn²⁺, 2,7 mg/ml m-kresolu a 17 mg/ml glycerolu % se neutralizuje s fosforečnanovým solným roztokem pufru (PBS) na 2 mezinárodní jednotky a centrifuguje se po dobu 5 minut při zrychlení o hodnotě 14000 otáček za minutu a při teplotě okolí. Supernatant se odstraní a přibližně desetina supernatantu se injikuje do analytického Symmetry Shield RP8 RP-HPLC systému (Waters, Inc.). Plocha pod vymytým vrcholem se integruje a porovnává s plochou pod vrcholem referenčního standardu, který byl rekombinantní lidský inzulín v 0,1 M HCl. Poměr ploch se násobí 100, aby se získala hodnota % rozpustnost v PBS.

PBS rozpustnost pro přípravky rekombinantního lidského inzulínu a pro každou inzulínovou sloučeninu je ukázána v tabulce 4.

TABULKA 4	
Inzulínová sloučenina	PBS Rozpustnost
rekombinantní lidský inzulín	89,5
A0 ^{Arg} B0 ^{Arg} B29 ^{Lys-N^ε-Arg} -inzulín	22,4
A0 ^{Arg} A21 ^{Gly} B29 ^{Lys-N^ε-Arg} -inzulín	19,1
A0 ^{Lys-N^ε-Arg} -A21 ^{Gly} B29 ^{Lys-N^ε-Arg} -inzulín	12,9

Příklad 17

Isoelektrický bod

Isoelektrická fokuzace je elektroforetická technika, která odděluje proteiny na základě jejich isoelektrických bodů (pI). Hodnota pI je hodnotou pH, při které je celkový náboj proteinu roven nule a nepohybuje se v elektrickém poli. IEF gely účinně vytvářejí gradient pH, takže se proteiny separují na základě jejich jedinečné hodnoty pI. Detekce proteinových pruhů může být uskutečněna označením citlivým barvivem jako je Novex Collodial Coomassie Staining Kit. Alternativně detekce může být dosažena přenosem gelu na polyvinyliden difluoridovou (PVDF) membránu a jejím označením barvivem Ponceau Red. pI proteinu se určí jeho porovnáním s pI známého standardu. IEF proteinové standardy jsou kombinace proteinů s dobře charakterizovanými

hodnotami pI, které jsou smíchány za účelem získání stejnoměrného obarvení. Další jiný způsob určování pI je IEF kapilární elektroforézou (cIEF). pI se určí porovnáním se známými markery.

Isoelektrický bod (pI) rekombinantního lidského inzulinu a každé inzulinové sloučeniny se určí gelovou elektroforézou s isoelektrickou fokuzací za použití gelů Novex IEF s pH 3-10, které přinášejí rozmezí pI mezi 3,5-8,5. Isoelektrické body jsou ukázány v tabulce 5.

TABULKA 5	
Inzulínová sloučenina	Isoelektrický bod
Rekombinantní lidský inzulin	5,62
A0 ^{Arg} B0 ^{Arg} B29 ^{Lys-Nε-Arg} -inzulin	7,15
A0 ^{Arg} A21 ^{Gly} B29 ^{Lys-Nε-Arg} -inzulin	6,80
A0 ^{Lys-Nε-Arg} -A21 ^{Gly} B29 ^{Lys-Nε-Arg} -inzulin	7,10

Příklad 18

In vivo studie se psy

Pokusy byly prováděny u psů a fen beagle (Marshall Farms, North Rose, NY) v bdělém stavu, kteří byli ponecháni přes noc bez potravy a byli trvale kanylováni (femorální arterie a céva). V den pokusu byly aktivovány vaskulární přístupové porty (Access Technologies, Norfolk Medical, Skokie, IL) a zvířata byla umístěna do klecí o rozměrech 3'x3'. Psi byli ponecháni alespoň 15 minut aklimatizovat se na prostředí

klece, než jim byl odebrán arteriální krevní vzorek pro určení koncentrací inzulínu a glukózy v bdělém stavu (čas = -30 minut). V tento okamžik začne kontinuální cévní infúze (0,65 µg/kg/min) cyklického somatostatinu (BACHEM, Torrence, CA) a pokračuje po dalších 24,5 hodin. Třicet minut po startu infúze (čas = 0) se odebere arteriální vzorek a injektuje se podkožní bolus solného roztoku nebo inzulínového přípravku (2 nmol/kg) do dorsální oblasti zad. Od této doby byly byly odebírány periodicky arteriální krevní vzorky pro určení koncentrací glukózy a inzulínu v plasmě.

Koncentrací glukózy v plasmě byla určena v den studie za použití způsobu oxidáza glukóza používající přístroj Beckman Glucose Analyzer II (Beckman Instruments Inc., Brea, CA). Vzorky plasmy byly uchovávány za teploty -80 °C až do okamžiku analýzy inzulínu. Koncentrace inzulínu byly určeny za použití komerčně dostupné soupravy pro radioimunologické pokusy, která byla citlivá na lidský inzulín a inzulínové sloučeniny.

$A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-N\epsilon-Arg}$ -inzulín a NPH inzulín každý vykazovaly časové působení, které bylo lepší než u kontrolního solného roztoku. $A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-N\epsilon-Arg}$ -inzulínové roztok vykazoval časové působení srovnatelné s NPH inzulínem.

$A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-N\epsilon-Arg}$ -inzulín a $A0^{Lys-N\epsilon-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-N\epsilon-Arg}$ -inzulín byly porovnány se solným roztokem a inzulínovým glarginem ($A21^{Gly}B31^{Arg}B32^{Arg}$ -inzulín). U každé z dvou studií

A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín, A0^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín a glargin vykazovaly časové působení, který bylo delší než u kontrolního solného roztoku. V první studii A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín a A0^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín vykazovaly časové působení srovnatelné s glarginem. V druhé studii A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín a A0^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín vykazovaly časové působení, které bylo kratší než u glarginu.

Příklad 19

In vivo studie u krys

Pokusy byly prováděny u trvale kanylovaných (femorální arterie a céva), samců krys Sprague Dawley po hladovění přes noc. Ráno v den pokusu byl odsát obsah katetrů; konce katetrů byly připojeny k prodlužovacím vedením; a zvířata byla umístěna do pokusných klecí o rozměrech 12"x12". Po uplynutí 30 minutové aklimatizační periody byl odebrán arteriální krevní vzorek a byl podán iv bolus vehikula (solný roztok obsahující 0,3 % krysího albuminu) nebo inzulinové sloučeniny (přípravek inzulinové sloučeniny ředěný v solný roztok obsahujícím 0,3 % krysího albuminu; 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 nebo 1,2 nmol/kg; n = 5/dávku). Krev byla odebírána 10, 20, 30, 45 a 60 minut po intravenózní injekci.

Všechny krevní vzorky byly odebírány do zkumavek obsahujících sodný EDTA a byly uloženy na ledu. Vzorky byly

centrifugovány; plasma byla odebrána; a koncentrace glukózy v plasmě byly určeny v den studie za použití přístroje Monarch Clinical Chemistry Analyzer.

Integrál křivek glukózy (0-30 minut) byl vypočten za použití lichoběžníkového pravidla. Výsledné hodnoty pro různé dávky byly graficky vyjádřeny za použití GraphPad Prism. Byla určena dávka, který odpovídala integrálu křivky glukózy o hodnotě 2,45 g.min/ μ L a hodnota byla použita pro přímé srovnání relativní síly inzulínových přípravků.

V jednom pokusu byl odhadovaný účinek pro rekombinantní lidský inzulín roven 0,160 nmol/kg a byl 0,158 nmol/kg pro A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín.

V jiném pokusu byl odhadovaný účinek pro rekombinantní lidský inzulín roven 0,162 nmol/kg a byl 0,200 nmol/kg pro A0^{Arg}A21^{Gly}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín.

V jiném pokus byl odhadovaný účinek pro rekombinantní lidský inzulín roven 0,207 nmol/kg, odhadovaný účinek pro A0^{Arg}A21^{Ser}B0^{Arg}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín byl 0,226 nmol/kg a odhadovaný účinek pro A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín byl 0,268 nmol/kg.

V jiném pokusu odhadovaný účinek pro rekombinantní lidský inzulín byl 0,317 nmol/kg a odhadovaný účinek pro A0^{Lys-Nε-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín byl 0,320 nmol/kg.

V jiném pokusu byl odhadovaný účinek pro rekombinantní lidský inzulin 0,217 nmol/kg, odhadovaný účinek pro $A0^{Lys-N\epsilon-Arg-A21^{Gly}B29^{Lys-N\epsilon-Arg}}$ -inzulin byl 0,275 nmol/kg a odhadovaný účinek pro $A0^{Arg}A21^{Gly}B29^{Lys-N\epsilon-Arg}$ -inzulin byl 0,258 nmol/kg.

Příklad 20

Krystal zinek- $A0^{Arg}B0^{Arg}$ -inzulin a zinek-protamin

Zásobní roztok A se připraví rozpuštěním 16,1 g syntetického glycerinu, 0,73 g fenolu a 1,6 ml m-kresolu v přibližně 350 ml destilované vody. Po rozpuštění se přidá destilovaná voda na konečnou hmotnost roztoku 503 g.

Zásobní roztok protamin sulfátu se připraví rozpuštěním 0,0366 g protamin sulfátu v 10 ml destilované vody. Zásobní roztok $A0^{Arg}B0^{Arg}$ -inzulinu se připraví rozpuštěním 0,0121 g $A0^{Arg}B0^{Arg}$ -inzulinu v 1,28 ml zásobního roztoku A. Zásobní roztok oxidu zinečnatého se připraví ředěním 1 ml 25 mg/ml roztoku oxidu zinečnatého konečný objem 25 ml pro dosažení konečné koncentrace oxidu zinečnatého 1 mg/ml. Zásobní roztok fosforečnanu sodného připraví rozpuštěním 0,0577 g dihydrogenfosforečnanu sodného v 15 ml destilované vody. Zásobní roztok chloridu sodného se připraví rozpuštěním 1,1607 g chloridu sodného v 10 ml destilované vody.

Pro pokus s krystaly zinek- $A0^{Arg}B0^{Arg}$ -inzulin se smíchaly $A0^{Arg}B0^{Arg}$ -inzulin, oxid zinečnatý a zásobní roztok A za kyselého pH. K některým vzorkům byl také přidán chlorid sodný. Všechny vzorky se kombinují na konečný objem 0,1 ml.

Přidá se 0,1 ml zásobního roztoku fosforečnanu sodného a vznikne precipitát. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu mezi 7,4 a 9,3. Krystal zinek-A0^{Arg}B0^{Arg}-inzulín protamin se připraví stejným způsobem, s výjimkou, že s A0^{Arg}B0^{Arg}-inzulínem, oxidem zinečnatým, chloridem sodným a zásobním roztokem A byl také zkombinován protamin sulfát.

Každý vzorek byl potom rozdělen na dvě poloviny. Jeden vzorek byl inkubován za teploty 30 °C a jiný vzorek byl ponechán při teplotě okolí. Podmínky testu jsou ukázány v tabulce 6 a krystaly byly pozorovány pro každý soubor testovaných podmínek. Všechny koncentrace jsou nominální.

Tabulka 6					
A0 ^{Arg} B0 ^{Arg} -inzulín (mg/ml)	Protamin sulfát (mg/ml)	Zinek μg/ml	NaCl (mM)	pH	Teplota
3,5	0	0,25	0	7,4	okolí
3,5	0	0,25	100	7,5	okolí
3,5	0	0,25	0	8,5	okolí
3,5	0	0,25	100	8,5	okolí
3,5	0	0,25	0	9,3	okolí
3,5	0	0,25	100	9,2	okolí
3,5	0,37	0,25	100	7,4	okolí
3,5	0,37	0,25	100	8,5	okolí
3,5	0,37	0,25	100	9,2	okolí
3,5	0	0,25	0	7,4	30 °C
3,5	0	0,25	100	7,5	30 °C
3,5	0	0,25	0	8,5	30 °C

3,5	0	0,25	100	8,5	30 °C
3,5	0	0,25	0	9,3	30 °C
3,5	0	0,25	100	9,2	30 °C
3,5	0,37	0,25	100	7,4	30 °C
3,5	0,37	0,25	100	8,5	30 °C
3,5	0,37	0,25	100	9,2	30 °C

Příklad 21

Krystaly zinek-A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-N^e-Arg}-inzulín a krystaly zinek-protamin

Zásobní roztok A a zásobní roztoky oxidu zinečnatého, fosforečnanu sodného a chloridu sodného se připraví jako v příkladu 20.

Zásobní roztok protamin sulfátu se připraví rozpuštěním 0,0332 g protamin sulfátu v 10 ml zásobního roztoku A. Zásobní roztok A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-N^e-Arg}-inzulínu se připraví rozpuštěním 0,0112 g A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Ly2-N^e-Arg}-inzulínu v 1,25 ml zásobního roztoku A.

Pro pokus s krystaly zinek-A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-N^e-Arg}-inzulín se A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-N^e-Arg}-inzulín, oxid zinečnatý a zásobní roztok A smíchají za kyselého pH. Chlorid sodný byl také přidán k některým vzorkům. Všechny vzorky se kombinují na konečný objem 0,1 ml dosažení různých podmínek. Přidá se 0,1 ml zásobního roztoku fosforečnanu sodného a vytvořil se

precipitát. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu mezi 7,4 a 9,3.

Krystaly zinek-A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-Ne-Arg}-inzulín protamin se připraví stejným způsobem, kromě toho, že s A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-Ne-Arg}-inzulínem, oxidem zinečnatým, chloride sodným a zásobním roztokem A byl také zkombinován protamin sulfát.

Každý vzorek byl potom rozdělen do dvou částí. Jeden vzorek byl inkubován za teploty 30 °C a jiný vzorek byl ponechán při teplotě okolí. Testované podmínky jsou ukázány v tabulce 7 a krystaly byly pozorovány pro každý soubor testovaných podmínek. Všechny koncentrace jsou nominální.

Dále se provedou pokusy pro optimalizaci koncentrace chloridu sodného a pH. Zásobní roztok A se připraví rozpuštěním 12,8 g syntetického glycerinu, 0,59 g fenolu a 1,28 g m-kresolu v přibližně 300 g destilované vody. Po rozpuštění se přidá destilovaná voda na konečnou celkovou hmotnost roztoku 403 g. Zásobní roztok protamin sulfátu se připraví rozpuštěním 0,033 g protamin sulfátu v 10 ml zásobního roztoku. Zásobní roztok A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-Ne-Arg}-inzulínu se připraví rozpuštěním 0,0042 g A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-Ne-Arg}-inzulín v 0,3 ml zásobního roztoku A. Zásobní roztok oxidu zinečnatého se připraví rozpuštěním 0,0308 g oxidu zinečnatého v 1 ml 5 N kyseliny chlorovodíkové a destilovaná voda se přidá na konečný objem 25 ml. Zásobní roztok fosforečnanu sodného se připraví rozpuštěním 0,1893 g of dihydrogenfosforečnanu sodného v destilované vodě na

konečný objem roztoku 50 ml. Zásobní roztok chloridu sodného se připraví rozpuštěním 1,173 g chloridu sodného v 10 ml destilované vody.

A0^{Arg}B0^{Arg}B29^{Lys-Ne-Arg}-inzulín, protamin sulfát, oxid zinečnatý, chlorid sodný a zásobní roztok A se kombinují na konečný objem 0,1 ml. 0,1 ml Přidá se zásobní roztok fosforečnanu sodného a vytvořil se precipitát. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu mezi 7,4 a 9,3.

Každý vzorek byl potom rozdělen do dvou částí. Jeden vzorek byl inkubován za teploty 30 °C a jiný vzorek byl ponechán při teplotě okolí. Testované podmínky jsou ukázány v tabulce 8 a krystaly byly pozorovány pro každý soubor testovaných podmínek. Všechny koncentrace jsou nominální.

Tabulka 7					
A0 ^{Arg} B0 ^{Arg} B29 ^{Lys-Ne-Arg} -inzulín (mg/ml)	Protamin sulfát (mg/ml)	Zinek (μg/ml)	NaCl (mM)	pH	Teplota
3,4	0	0,25	0	7,4	okolí
3,4	0	0,25	100	7,4	okolí
3,4	0	0,25	0	8,5	okolí
3,4	0	0,25	100	8,5	okolí
3,4	0	0,25	0	9,2	okolí
3,4	0	0,25	100	9,2	okolí
3,4	0,33	0,25	100	7,4	okolí
3,4	0,33	0,25	100	8,6	okolí
3,4	0,3	0,25	100	9,2	okolí

3,4	0	0,25	0	7,4	30 °C
3,4	0	0,25	100	7,4	30 °C
3,4	0	0,25	0	8,5	30 °C
3,4	0	0,25	100	8,5	30 °C
3,4	0	0,25	0	9,2	30 °C
3,4	0	0,25	100	9,2	30 °C
3,4	0,33	0,25	100	7,4	30 °C
3,4	0,33	0,25	100	8,6	30 °C
3,4	0,33	0,25	100	9,2	30 °C

Tabulka 8

A0 ^{Arg} B0 ^{Arg} B29 ^{Lys-N6-} Arg-inzulín (mg/ml)	Protamin sulfát (mg/ml)	Zinek μg/ml	NaCl (mM)	pH	Teplota
3,5	0,33	0,25	200	7,4	okolí
3,5	0,33	0,25	50	8,5	okolí
3,5	0,33	0,25	100	8,4	okolí
3,5	0,33	0,25	200	8,5	okolí
3,5	0,33	0,25	50	8,4	okolí
3,5	0,33	0,25	200	9,2	okolí
3,5	0,33	0,25	200	7,4	30 °C
3,5	0,33	0,25	50	8,5	30 °C
3,5	0,33	0,25	100	8,4	30 °C
3,5	0,33	0,25	200	8,5	30 °C
3,5	0,33	0,25	50	8,4	30 °C
3,5	0,33	0,25	200	9,2	30 °C

Příklad 22

Krystaly zinek-A0^{Lys-N6-Arg}-A21^{Gly}B29^{Lys-N6-Arg}-inzulín

Pro následující pokusy se připraví zásobní roztok A a zásobní roztoky chloridu sodného, fosforečnanu sodného, oxidu zinečnatého a citrátu sodného, jak je následovně uvedeno.

Zásobní roztok A se připraví rozpuštěním 128,2 g syntetického glycerinu, 5,9 g fenolu, 12,9 g m-kresolu a 30,3 g dihydrogenfosforečnanu sodného v přibližně 3500 ml mili-Q vody. Po rozpuštění se přidá mili-Q voda na konečnou hmotnost roztoku 4000 g.

Zásobní roztok chloridu sodného se připraví rozpuštěním 1,1614 g chloridu sodného v 10 ml destilované vody.

Zásobní roztok fosforečnanu sodného se připraví rozpuštěním 0,7538 g dihydrogenfosforečnanu sodného v 10 ml destilované vody. 0,5 ml tohoto fosforečnanového roztoku byl ředěno do 9,5 ml destilované vody.

Zásobní roztok oxidu zinečnatého se připraví rozpuštěním 0,4 ml zásobního roztoku oxidu zinečnatého o koncentraci 25 mg/ml a 9,6 ml destilované vody pro získání konečné koncentrace oxidu zinečnatého 1 mg/ml.

Zásobní roztok citrátu sodného se připraví rozpuštěním 2,9597 g citrátu sodného v 10 ml destilované vody.

V jednom pokusu se připraví zásobní roztok $A0^{Lys-N\epsilon-Arg-}$
 $A21^{GlyB29^{Lys-N\epsilon-Arg-}}$ inzulínu rozpuštěním 0,00335 g $A0^{Lys-N\epsilon-Arg-}$
 $A21^{GlyB29^{Lys-N\epsilon-Arg-}}$ inzulínu v 0,65 ml zásobního roztoku A.
Roztok byl kalný a hodnota pH byla přibližně 7,1. pH se
upraví na přibližně 3,7 pro dosažení čirého roztoku.

Krystalizace byla inicializována nejprve zkombinováním
 $A0^{Lys-N\epsilon-Arg-}$ $A21^{GlyB29^{Lys-N\epsilon-Arg-}}$ inzulínu s oxidem zinečnatým,
přidáním zásobního roztoku A a zásobního roztoku chloridu
sodného. Hodnota pH roztoku byla udržována pod 4. Potom byl
přidán zásobní roztok fosforečnanu sodného a vytvořil se
precipitát. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu mezi 6,5 a
9,5. Každý vzorek byl potom rozdělen do tří částí. Jeden
vzorek byl inkubován za teploty 5 °C, jeden za teploty 30
°C a jiný vzorek byl ponechán při teplotě okolí. Testovací
podmínky a výsledky pokusů jsou ukázány v tabulce 9.
Všechny koncentrace jsou nominální.

Tabulka 9						
$A0^{Lys-N\epsilon-Arg-}$ $A21^{GlyB29^{Lys-N\epsilon-Arg-}}$ inzulín (mg/ml)	Zinek (μ g/ml)	NaCl (mM)	Na_2PO_4 (mM)	pH	Teplota	Pozorovaný krystaly
2,6	25	0	21	6,6	5 °C	Ne
2,6	25	0	21	7,3	5 °C	Ne
2,6	25	0	21	8,0	5 °C	Ne
2,6	100	0	21	6,4	5 °C	Ne

2,6	100	0	21	7,3	5 °C	Ne
2,6	100	0	21	8,2	5 °C	Ne
2,6	25	100	21	6,5	5 °C	Ne
2,6	25	100	21	7,2	5 °C	Ne
2,6	25	100	21	8,5	5 °C	Ano
2,6	100	100	21	6,4	5 °C	Ne
2,6	100	100	21	7,2	5 °C	Ne
2,6	100	100	21	8,4	5 °C	Ano
2,6	25	0	21	6,6	okolí	Ne
2,6	25	0	21	7,3	okolí	Ne
2,6	25	0	21	8,0	okolí	Ne
2,6	100	0	21	6,4	okolí	Ne
2,6	100	0	21	7,3	okolí	Ne
2,6	100	0	21	8,2	okolí	Ne
2,6	25	100	21	6,5	okolí	Ne
2,6	25	100	21	7,2	okolí	Ano
2,6	25	100	21	8,5	okolí	Ne
2,6	100	100	21	6,4	okolí	Ne
2,6	100	100	21	7,2	okolí	Ano
2,6	100	100	21	8,4	okolí	Ano
2,6	25	0	21	6,6	30 °C	Ne
2,6	25	0	21	7,3	30 °C	Ne
2,6	25	0	21	8,0	30 °C	Ano
2,6	100	0	21	6,4	30 °C	Ne
2,6	100	0	21	7,3	30 °C	Ne
2,6	100	0	21	8,2	30 °C	Ne
2,6	25	100	21	6,5	30 °C	Ano
2,6	25	100	21	7,2	30 °C	Ano
2,6	25	100	21	8,5	30 °C	Ne

2,6	100	100	21	6,4	30 °C	Ne
2,6	100	100	21	7,2	30 °C	Ano
2,6	100	100	21	8,4	30 °C	Ano

V jiném pokusu se připraví zásobní roztok $A0^{Lys-N\epsilon-Arg-}$
 $A21^{GlyB29^{Lys-N\epsilon-Arg-}}$ inzulínu rozpuštěním 0,0032 g $A0^{Lys-N\epsilon-Arg-}$
 $A21^{GlyB29^{Lys-N\epsilon-Arg-}}$ inzulín v 0,65 ml zásobního roztoku A.
Roztok byl kalný a hodnota pH byl přibližně 7,1. pH se
upraví na přibližně 3,7 pro dosažení čirého roztoku.

Krystalizace byla inicializována nejprve zkombinováním
 $A0^{Lys-N\epsilon-Arg-}$ $A21^{GlyB29^{Lys-N\epsilon-Arg-}}$ inzulínu s oxidem zinečnatým,
přidáním zásobního roztoku A, zásobního roztoku chloridu
sodného a/nebo zásobního roztoku citrátu sodného. pH
roztoku bylo udržováno pod 4. Potom byl přidán zásobní
roztok fosforečnanu sodného a vytvořil se precipitát.
Konečné pH bylo upraveno na hodnotu mezi 6,5 a 9,5. Každý
vzorek byl potom rozdělen do tří částí. Jeden vzorek byl
inkubován za teploty 5 °C, jeden za teploty 30 °C a jiný
vzorek byl ponechán při teplotě okolí. Podmínky testů a
dosažené výsledky jsou ukázány v tabulce 10. Všechny
koncentrace jsou nominální.

Tabulka 10							
$A0^{Lys-N\epsilon-Arg-}$ $A21^{GlyB29^{Lys-N\epsilon-Arg-}}$ inzulín	Zinek ($\mu\text{g/ml}$)	NaCl (mM)	Na Citrát (mM)	Na_2PO_4 (mM)	pH	Teplo -ta	Pozorová -ny krystaly

(mg/ml)							
2,5	25	0	100	21	6,3	5 °C	Ne
2,5	25	0	100	21	8,2	5 °C	Ano
2,5	25	0	100	21	7,4	5 °C	Ne
2,5	100	0	100	21	6,5	5 °C	Ne
2,5	100	0	100	21	7,5	5 °C	Ano
2,5	100	0	100	21	8,5	5 °C	Ne
2,5	25	50	75	21	6,5	5 °C	Ne
2,5	25	50	75	21	7,5	5 °C	Ano
2,5	25	50	75	21	8,3	5 °C	Ano
2,5	100	50	75	21	6,5	5 °C	Ne
2,5	100	50	75	21	7,5	5 °C	Ano
2,5	100	50	75	21	8,4	5 °C	Ano
2,5	25	0	100	21	6,3	okol í	Ne
2,5	25	0	100	21	8,2	okol í	Ano
2,5	25	0	100	21	7,4	okol í	Ne
2,5	100	0	100	21	6,5	okol í	Ne
2,5	100	0	100	21	7,5	okol í	Ano
2,5	100	0	100	21	8,5	okol í	Ano
2,5	25	50	75	21	6,5	okol í	Ne
2,5	25	50	75	21	7,5	okol í	Ano

2,5	25	50	75	21	8,3	okol í	Ano
2,5	100	50	75	21	6,5	okol í	Ano
2,5	100	50	75	21	7,5	okol í	Ano
2,5	100	50	75	21	8,4	okol í	Ano
2,5	25	0	100	21	6,3	30 °C	Ne
2,5	25	0	100	21	8,2	30 °C	Ano
2,5	25	0	100	21	7,4	30 °C	Ano
2,5	100	0	100	21	6,5	30 °C	Ano
2,5	100	0	100	21	7,5	30 °C	Ano
2,5	100	0	100	21	8,5	30 °C	Ano
2,5	25	50	75	21	6,5	30 °C	Ne
2,5	25	50	75	21	7,5	30 °C	Ano
2,5	25	50	75	21	8,3	30 °C	Ano
2,5	100	50	75	21	6,5	30 °C	Ano
2,5	100	50	75	21	7,5	30	Ano

						°C	
2,5	100	50	75	21	8,4	30	Ano
						°C	

V jiném pokusu se zásobní roztok octanu sodného připraví rozpuštěním 0,8203 g octanu sodného v 10 ml destilované vody. Zásobní roztok A^{0Lys-Nε-Arg-A21GlyB29Lys-Nε-Arg}-inzulínu se připraví rozpuštěním 0,003 g A^{0Lys-Nε-Arg-A21GlyB29Lys-Nε-Arg}-inzulínu v 0,63 ml zásobním roztoku A. Roztok byl kalný a hodnota pH byla přibližně 7,1. pH se upraví na přibližně 3,7 pro dosažení čirého roztoku.

Krystalizace byla inicializována nejprve zkombinováním A^{0Lys-Nε-Arg-A21GlyB29Lys-Nε-Arg}-inzulín s oxidem zinečnatým, přidáním zásobního roztoku A, zásobního roztoku chloridu sodného a/nebo octanu sodného. pH roztoku bylo udržováno pod 4. Potom byl přidán zásobní roztok fosforečnanu sodného a vytvořil se precipitát. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu mezi 6,5 a 9,5. Každý vzorek byl potom rozdělen do tří částí. Jeden vzorek byl inkubován za teploty 5 °C, jeden za teploty 30 °C a jiný vzorek byl ponechán při teplotě okolí.

Podmínky testů a dosažené výsledky jsou ukázány v tabulce 11. Všechny koncentrace jsou nominální.

Tabulka 11							
A0 ^{Lys-Nε-} ArgA21 ^{GlyB29} Lys -NεArg-inzulín (mg/ml)	Zinek (μg/ml)	NaCl (mM)	NaOAc (mM)	Na ₂ PO ₄ (mM)	pH	Teplo- ta	Pozorová- ny krystaly
2,4	25	0	100	21	6,5	5 °C	Ne
2,4	25	0	0	21	7,5	5 °C	Ne
2,4	25	0	100	21	8,4	5 °C	Ano
2,4	100	0	100	21	6,3	5 °C	Ne
2,4	100	0	100	21	7,4	5 °C	Ne
2,4	100	0	100	21	8,6	5 °C	Ano
2,4	25	50	75	21	6,6	5 °C	Ne
2,4	25	50	75	21	7,4	5 °C	Ne
2,4	25	50	75	21	8,4	5 °C	Ano
2,4	100	50	75	21	6,5	5 °C	Ne
2,4	100	50	75	21	7,5	5 °C	Ne
2,4	100	50	75	21	8,3	5 °C	Ne
2,4	25	0	100	21	6,5	okolí	Ne
2,4	25	0	100	21	7,5	okolí	Ano
2,4	25	0	100	21	8,4	okolí	Ano
2,4	100	0	100	21	6,3	okolí	Ne
2,4	100	0	100	21	7,4	okolí	Ne
2,4	100	0	100	21	8,6	okolí	Ne
2,4	25	50	75	21	6,6	okolí	Ne
2,4	25	50	75	21	7,4	okolí	Ano
2,4	25	50	75	21	8,4	okolí	Ano

2,4	100	50	75	21	6,5	okolí	Ne
2,4	100	50	75	21	7,5	okolí	Ne
2,4	100	50	75	21	8,3	okolí	Ano
2,4	25	0	100	21	6,5	30 °C	Ne
2,4	25	0	100	21	7,5	30 °C	Ano
2,4	25	0	100	21	8,4	30 °C	Ano
2,4	100	0	100	21	6,3	30 °C	Ne
2,4	100	0	100	21	7,4	30 °C	Ano
2,4	100	0	100	21	8,6	30 °C	Ne
2,4	25	50	75	21	6,6	30 °C	Ne
2,4	25	50	75	21	7,4	30 °C	Ano
2,4	25	50	75	21	8,4	30 °C	Ne
2,4	100	50	75	21	6,5	30 °C	Ne
2,4	100	50	75	21	7,5	30 °C	Ano
2,4	100	50	75	21	8,3	30 °C	Ano

V jiném pokusu se zásobní roztok oxidu zinečnatého připraví zředěním 1,0 ml roztoku oxidu zinečnatého s koncentrací 10 mg/ml 1,0 ml destilované vody. Konečná koncentrace oxidu zinečnatého byla 5 mg/ml.

Zásobní roztok A0^{Lys-Nε-Arg-A21}GlyB29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínu se připraví rozpuštěním 0,00221 g A0^{Lys-Nε-Arg-A21}GlyB29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínu v 0,43 ml destilované vody. Roztok byl takřka čirý a hodnota pH byla určena jako přibližně 3,7. pH se upraví na přibližně 3,0 pro dosažení čirého roztoku.

Krystalizace byla inicializována nejprve zkombinováním $A0^{Lys-Ne-Arg}-A21^{GlyB29^{Lys-Ne-Arg}}$ -inzulín s oxidem zinečnatým a zásobním roztokem buď chloridu sodného nebo citrátu sodného nebo octanu sodného. pH roztoku bylo udržováno pod přibližně 3. Potom byl přidán zásobní roztok fosforečnanu sodného a vytvořil se precipitát. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu mezi 6,5 a 8,5. Každý vzorek byl ponechán při teplotě okolí. Podmínky testů a dosažené výsledky jsou ukázán v tabulce 12. Všechny koncentrace jsou nominální.

Tabulka 12						
$A0^{Lys-Ne-Arg}-A21^{GlyB29^{Lys-Ne-Arg}}$ -inzulín (mg/ml)	Zinek (μ g/ml)	NaCl (mM)	Na Citrát (mM)	NaOAc (mM)	pH	Pozorovány krystaly
2,6	300	0	0	0	6,7	Ne
2,6	300	0	0	0	8,4	Ne
2,6	300	100	0	0	8,3	Ne
2,6	300	100	0	0	6,6	Ne
2,6	300	0	100	0	6,6	Ano
2,6	300	0	100	0	8,2	Ne
2,6	300	0	0	100	6,5	Ano
2,6	300	0	0	100	8,6	Ne

Příklad 23

Krystaly zinek-A0^{Lys-Nε-Arg-A21}GlyB29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín protamin

Zásobní roztok A se připraví rozpuštěním 16,1 g syntetického glycerinu, 0,73 g fenolu a 1,6 ml m-kresolu v přibližně 350 ml destilované vody. Po rozpuštění se přidá do roztoku destilovaná voda na konečnou hmotnost roztoku 503 g. Zásobní roztok protamin sulfátu se připraví rozpuštěním 0,0366 g protamin sulfátu v 10 ml destilované vody.

Zásobní roztok A0^{Lys-Nε-Arg-A21}GlyB29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín se připraví rozpuštěním 0,0121 g A0^{Lys-Nε-Arg-A21}GlyB29^{Lys-Nε-Arg}-inzulínu v 1,28 ml zásobního roztoku A. Zásobní roztok oxidu zinečnatého se připraví ředěním 1 ml roztoku oxidu zinečnatého s koncentrací 25 mg/ml na konečný objem 25 ml, pro dosažení konečné koncentrace oxidu zinečnatého 1 mg/ml. Zásobní roztok fosforečnanu sodného se připraví rozpuštěním 0,0577 g dihydrogenfosforečnanu sodného v 15 ml destilované vody. Zásobní roztok chloridu sodného se připraví rozpuštěním 1,1607 g chloridu sodného v 10 ml destilované vody.

A0^{Lys-Nε-Arg-A21}GlyB29^{Lys-Nε-Arg}-inzulín, oxid zinečnatý, protamin sulfát, chlorid sodný a zásobní roztok A se zkombinují na konečný objem 0,1 ml pro dosažení různých podmínek. Přidá se 0,1 ml zásobního roztoku fosforečnanu sodného a vznikne precipitát. Konečné pH se upraví na hodnotu mezi 7,4 a 9,3.

Každý vzorek je potom rozdělen do dvou částí. Jeden vzorek je inkubován za teploty 30 °C a jiný vzorek je ponechán při teplotě okolí. Testované podmínky jsou ukázány v tabulce 13 jsou pozorovány krystaly.

Tabulka 13					
A0 ^{Lys-Nε-} ArgA21 ^{Gly} B29 ^{Lys} -Nε-Arg-inzulín (mg/ml)	Protamin sulfát (mg/ml)	Zinek (μg/ml)	NaCl (mM)	pH	Teplota
3,5	0	25	0	7,4	okolí
3,5	0	25	100	7,5	okolí
3,5	0	25	0	8,5	okolí
3,5	25	100	100	8,5	okolí
3,5	0	25	0	9,3	okolí
3,5	0	25	100	9,2	okolí
3,5	0,37	25	100	7,4	okolí
3,5	0,37	25	100	8,5	okolí
3,5	0,37	25	100	9,2	okolí
3,5	0	25	0	7,4	30 °C
3,5	0	25	100	7,5	30 °C
3,5	25	0	0	8,5	30 °C
3,5	25	100	100	8,5	30 °C
3,5	0	25	0	9,3	30 °C
3,5	0	25	100	9,2	30 °C
3,5	0,37	25	100	7,4	30 °C
3,5	0,37	25	100	8,5	30 °C
3,5	0,37	25	100	9,2	30 °C

Zatímco předložený vynález byl obzvláště ukázán a popsán s odvoláním na jeho výhodná provedení, odborníkovi v oboru je zřejmé, že mohou být provedeny různé změny v provedení a detailech, aniž by došlo k odchýlení od ducha a rozsahu předloženého vynálezu, jak je definován v následujících patentových nárocích. Odborníkovi v oboru jsou zřejmé nebo může zjistit rutinním experimentováním mnohá ekvivalentní specifická provedení předloženého vynálezu, který zde byl popsán.

Takové ekvivalenty jsou zamýšleny tak, že spadají do rozsahu patentových nároků.

Všechny patenty, přihlášky vynálezů, články, knihy a jiné publikace, které jsou zde citovány, jsou zahrnuty jako reference ve své celistvosti.

Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Inzulínová sloučenina, která má

(a) řetězec A obecného vzorce I,

A-1 A0 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13
Xaa-Xaa-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-

A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21
Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa,

kde aminokyselinová sekvence obecného vzorce I je
znázorněna jako Sekv. ID č. 1, a

(b) řetězec B obecného vzorce II,

B-1 B0 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12
Xaa-Xaa-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-

B13 B14 B15 B16 B17 B18 B19 B20 B21 B22 B23 B24 B25 B26 B27
Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-

B28 B29 B30
Xaa-Xaa-Xaa,

kde aminokyselinová sekvence obecného vzorce II je
znázorněna jako Sekv. ID č. 2,

kde Xaa v poloze A-1 představuje Arg, derivatizovaný Arg,
homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,
derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino
homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze A0 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl arginin;

Xaa v poloze A21 je geneticky kódovatelná aminokyselina;

Xaa v poloze B-1 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze B0 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze B28 je Lys nebo Pro;

Xaa v poloze B29 je Lys nebo Pro;

Xaa v poloze B30 je Thr, Ala nebo je nepřítomný;

jeden z Xaa v poloze B28 nebo Xaa v poloze B29 je Lys;

Xaa v poloze B28 a Xaa v poloze B29 nejsou oba Lys; a ϵ -amino skupina Lys v poloze B28 nebo B29 je kovalentně

vázaná k α -karboxylové skupině kladně nabitě aminokyseliny za účelem přípravy Lys-N^ε-aminokyselinového derivátu.

2. Inzulínová sloučenina podle nároku 1, kde ϵ -amino skupina Lys v poloze B28 nebo B29 je kovalentně vázaná k α -karboxylové skupině Arg za účelem přípravy Lys-N^ε-Arg.

3. Inzulínová sloučenina podle nároku 1, kde ϵ -amino skupina Lys v poloze B28 nebo B29 je kovalentně vázaná k α -karboxylové skupině Lys za účelem přípravy Lys-N^ε-Lys.

4. Inzulínová sloučenina podle nároku 1, kde Xaa v poloze A-1 a Xaa v poloze B-1 jsou nepřítomny.

5. Inzulínová sloučenina podle nároku 1, kde Xaa v poloze B-1 a Xaa v poloze B0 jsou nepřítomny.

6. Inzulínová sloučenina podle nároku 1, kde Xaa v poloze A-1, Xaa v poloze B-1 a Xaa v poloze B0 jsou nepřítomny.

7. Inzulínová sloučenina podle nároku 4, kde

Xaa v poloze A0 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl arginin; a

Xaa v poloze B0 představuje Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,

derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný.

8. Inzulínová sloučenina podle nároku 7, kde

Xaa v poloze A0 je Arg; a

Xaa v poloze B0 je nepřítomný.

9. Inzulínová sloučenina podle nároku 7, kde

Xaa v poloze A0 je Arg; a

Xaa v poloze B0 je Arg.

10. Použití inzulínové sloučeniny podle kteréhokoli z nároků 1-9 pro přípravu léčiva pro léčbu diabetu mellitus.

11. Kompozice vyznačující se tím, že zahrnuje inzulínovou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1-9.

12. Kompozice podle nároku 11, vyznačující se tím, že kompozice je farmaceutická kompozice.

13. Kompozice podle nároku 12, vyznačující se tím, že dále zahrnuje jeden nebo více farmaceuticky přijatelných excipientů.

14. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 11-13, vyznačující se tím, že dále zahrnuje divalentní kovový kationt.

15. Kompozice podle nároku 14, vyznačující se tím, že divalentní kovový kationt je zinek.
16. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 11-14, vyznačující se tím, že dále zahrnuje lidský inzulin.
17. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 11-14, vyznačující se tím, že zahrnuje rychle účinkující inzulinový analog.
18. Použití kompozice podle kteréhokoli z nároků 11-17 pro přípravu léčiva pro léčbu diabetu mellitus.
19. Mikrokrystal zahrnující inzulinovou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1-9 a divalentní kovový kationt, kde mikrokrystal neobsahuje protamin.
20. Mikrokrystal podle nároku 19, kde divalentní kovový kationt je zinek.
21. Mikrokrystal zahrnující inzulinovou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 4, 6, 7, 8 nebo 9, divalentní kovový kationt a protamin.
22. Mikrokrystal podle nároku 19, kde divalentní kovový kationt je zinek.
23. Způsob přípravy mikrokrystalu podle nároku 19, vyznačující se tím, že zahrnuje uvedení do kontaktu složek zahrnujících inzulinovou sloučeninu a divalentní kovový

kationt ve vodném rozpouštědle při hodnotě pH, která umožňuje tvorbu hexamerů inzulínové sloučeniny.

24. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že divalentní kovový kationt je zinek.

25. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že dále zahrnuje uvedení do kontaktu složek s hexamer-stabilizující sloučeninou, přičemž hexamer-stabilizující sloučenina je přítomna v koncentraci, která usnadňuje vytváření hexameru.

26. Použití mikrokryсталů podle nároku 19 pro přípravu léčiva pro léčbu diabetu mellitus.

27. Způsob přípravy inzulínové sloučeniny, vyznačující se tím, že zahrnuje kroky:

(a) acylace každé volné aminové skupiny templátu inzulínu chráněnou aminokyselinou nebo derivátem chráněné aminokyseliny za účelem přípravy acylované inzulínové sloučeniny;

(b) čištění acylované inzulínové sloučeniny;

(c) odstranění ochranné skupiny z každé chráněné aminokyseliny nebo derivátu chráněné aminokyseliny za účelem přípravy nechráněné acylované inzulínové sloučeniny;

a

(d) čištění nechráněné acylované inzulinové sloučeniny.

28. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že chráněná aminokyselina je aktivovaná karboxylová kyselina.

29. Způsob podle nároku 28, vyznačující se tím, že aktivovaná karboxylová kyselina je N-hydroxysukcinimid.

30. Způsob podle nároku 29, vyznačující se tím, že templátem inzulinu je rekombinantní lidský inzulin nebo jeho analog.

31. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že templátem inzulinu je A21^{Xaa}-inzulin.

32. Způsob léčby hyperglykemie, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání inzulinové sloučeniny podle kteréhokoli z nároků 1-9 subjektu v množství, které je dostatečné pro regulaci koncentrace krevní hladiny glukózy u subjektu.

33. Způsob léčby hyperglykemie, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání kompozice podle kteréhokoli z nároků 11-17 subjektu v množství, které je dostatečné pro regulaci koncentrace krevní hladiny glukózy u subjektu.

34. Způsob podle nároku 32 nebo 33, vyznačující se tím, že subjekt je léčen na diabetes mellitus.

35. Způsob léčby diabetu mellitu, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání mikrokystalu podle nároku 19 subjektu v

množství, které je dostatečné pro regulaci koncentrace krevní hladiny glukózy u subjektu.

36. Inzulínová sloučenina, která obsahuje

(a) řetězec A obecného vzorce I,

A-1 A0 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13
Xaa-Xaa-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-

A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21
Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa,

kde aminokyselinová sekvence obecného vzorce I je
znázorněna v Sekv. ID č. 1, a

(b) řetězec B obecného vzorce II,

B-1 B0 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12
Xaa-Xaa-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-

B13 B14 B15 B16 B17 B18 B19 B20 B21 B22 B23 B24 B25 B26 B27
Glu-Ala-Leu-tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-

B28 B29 B30
Xaa-Xaa-Xaa,

kde aminokyselinová sekvence obecného vzorce II je
znázorněna v Sekv. ID č. 2,

kde Xaa v poloze A-1 představuje Arg, derivatizovaný Arg,
homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,

derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino
homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze A0 představuje Arg, derivatizovaný Arg,
homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,
derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino
homoarginin, alfa methyl arginin;

Xaa v poloze A21 je geneticky kódovatelná aminokyselina;

Xaa v poloze B-1 představuje Arg, derivatizovaný Arg,
homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,
derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino
homoarginin, alfa methyl arginin nebo je nepřítomný;

Xaa v poloze B0 představuje Arg, derivatizovaný Arg,
homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys,
derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino
homoarginin, alfa methyl arginin;

Xaa v poloze B28 je Lys nebo Pro;

Xaa v poloze B29 je Lys nebo Pro;

Xaa v poloze B30 je Thr, Ala nebo je nepřítomný;

jeden z Xaa v poloze B28 nebo Xaa v poloze B29 je Lys; a

Xaa v poloze B28 a Xaa v poloze B29 nejsou oba Lys.

37. Inzulínová sloučenina podle nároku 36, kde

Xaa v poloze A-1 je nepřítomný; a

Xaa v poloze B-1 je nepřítomný.

38. Inzulínová sloučenina podle nároku 37, kde

Xaa v poloze A0 je Arg nebo Lys; a

Xaa v poloze B0 je Arg nebo Lys.

39. Inzulínová sloučenina podle nároku 38, kde

Xaa v poloze A0 je Arg; a

Xaa v poloze B0 je Arg.

40. Mikrokrystal zahrnující inzulínovou sloučeninu podle nároku 36 a divalentní kationt.

41. Mikrokrystal podle nároku 40, kde divalentní kovový kationt je zinek.

42. Mikrokrystal podle nároku 40 nebo 41, dále zahrnující protamin.

43. Kompozice vyznačující se tím, že zahrnuje inzulínovou sloučeninu podle nároku 36.

44. Kompozice podle nároku 43, vyznačující se tím, že dále zahrnuje divalentní kovový kationt.

45. Kompozice podle nároku 44, vyznačující se tím, že divalentní kovový kationt je zinek.

46. Kompozice podle nároku 44, vyznačující se tím, že kompozice je farmaceutická kompozice.

47. Kompozice podle nároku 46, vyznačující se tím, že zahrnuje farmaceuticky přijatelný nosič.

48. Použití inzulinové sloučeniny podle kteréhokoli z nároků 36-39 pro přípravu léčiva pro léčbu diabetu mellitus.

49. Použití kompozice podle kteréhokoli z nároků 43-47 pro přípravu léčiva pro léčbu diabetu mellitus.

50. Způsob léčby hyperglykemie, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání inzulinové sloučeniny podle kteréhokoli z nároků 36-39 subjektu v množství, které je dostatečné pro regulaci koncentrace krevní hladiny glukózy u subjektu.

51. Způsob léčby hyperglykemie, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání kompozice podle kteréhokoli z nároků 43-47 subjektu v množství, které je dostatečné pro regulaci koncentrace krevní hladiny glukózy u subjektu.

52. Způsob podle nároku 50 nebo 51, vyznačující se tím, že subjekt je léčen na diabetes mellitus.

53. Způsob léčby diabetu mellitu, vyznačující se tím, že zahrnující podávání mikrokrystalu podle nároku 40-42 subjektu v množství, které je dostatečné pro regulaci koncentrace krevní hladiny glukózy u subjektu.

Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík

Seznam sekvencí

<110> Eli Lilly and Company

<120> Inzulínová sloučenina s protrahovaným účinkem

<130> X-16004M

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl arginin nebo je nepřítomný

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl arginin

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa = geneticky kódovatelná aminokyselina

<400> 1

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

Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Xaa
20

<210> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa v poloze 30 je Lys nebo Xaa v poloze 31 je Lys, ale ne obojí najednou

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa v poloze 30 je Pro nebo Xaa v poloze 31 je Pro, ale ne obojí najednou

05.11.04

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa = Lys nebo Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> Xaa = Lys nebo Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> Xaa = Thr, Ala nebo je nepřítomný

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl argininnebo je nepřítomný

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Arg, derivatizovaný Arg, homoarginin, desamino homoarginin, desaminoarginin, Lys, derivatizovaný Lys, desaminolysin, alfa guanidino homoarginin nebo alfa methyl argininnebo je nepřítomný

<400> 2

Xaa Xaa Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala
1 5 10 15

Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Xaa Xaa Xaa
20 25 30

<210> 3
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

70 2004-710
05.11.04

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

Obr. 1

