



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(21), (22) Заявка: 98112109/14, 18.06.1998

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.06.1998

(30) Конвенционный приоритет:
20.06.1997 DE 19726167.1

(43) Дата публикации заявки: 20.06.2000

(45) Опубликовано: 10.07.2003

Опубликовано на CD-ROM:
MIMOSA RFD 2003/007 MRFD2003007

(15) Информация о коррекции:
Версия коррекции № 1 (W1 C2)

(48) Коррекция опубликована:
20.12.2007 Бюл. № 35/2007

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: EP 0375437 A2, 27.06.1990. WO 9007522
A1, 26.06.1990. US 3758683 A, 09.11.1973.

Адрес для переписки:
103064, Москва, ул. Казакова, 16, НИИР
Канцелярия "Патентные поверенные Квашнин,
Сапельников и партнеры", пат.пов. В.П.
Квашнину, рег.№ 0004

(72) Автор(ы):

ЭРТЛЬ Йоханн (DE),
ХАБЕРМАНН Пауль (DE),
ГАЙЗЕН Карл (DE),
ЗАЙПКЕ Герхард (DE)

(73) Патентообладатель(и):

АВЕНТИС ФАРМА ДОЙЧЛАНД ГМБХ (DE)

(54) ПРОИЗВОДНОЕ ИНСУЛИНА ИЛИ ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ПРИЕМЛЕМАЯ СОЛЬ, ПРЕДШЕСТВЕННИК ПРОИЗВОДНОГО ИНСУЛИНА, ДНК-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ, КОДИРУЮЩАЯ ПРЕДШЕСТВЕННИК, ВЕКТОР ЭКСПРЕССИИ, СОДЕРЖАЩИЙ УПОМЯНУТУЮ ДНК-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ, СУБСТРАТ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫЙ УПОМЯНУТЫМ ВЕКТОРОМ ЭКСПРЕССИИ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ С ПОНИЖАЮЩЕЙ, СООТВЕТСТВЕННО РЕГУЛИРУЮЩЕЙ УРОВЕНЬ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ

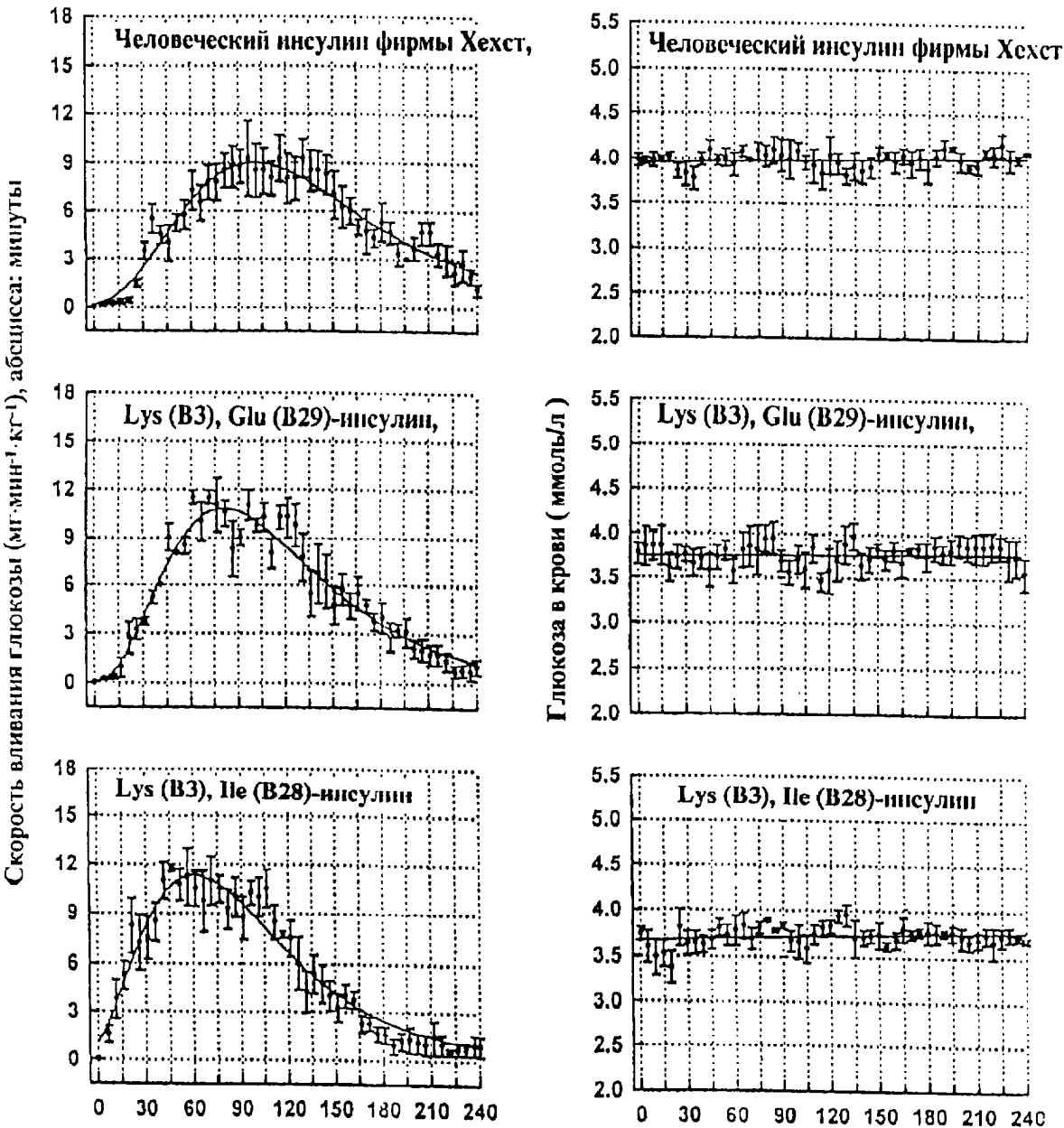
(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинской промышленности и касается производного инсулина или его физиологически приемлемой соли с ускоренным по сравнению с человеческим инсулином наступлением действия, в котором аспарагин (Asn) в положении В3 цепи В заменен на природный основной аминокислотный остаток и по меньшей мере один аминокислотный остаток в положениях В27, В28 или В29 цепи В замещен на другой природный нейтральный или кислый аминокислотный остаток, причем аспарагин (Asn) в

положении А21 цепи А может быть заменен на Asp, Gly, Ser, Thr или Ala, а фенилаланин (Phe) в положении В1 цепи В и аминокислотный остаток в положении В30 цепи В могут отсутствовать. Описываются также ДНК-последовательности, кодирующие предшественник производного инсулина, вектор экспрессии, содержащие эту ДНК, а также штаммы, экспрессирующие предшественник инсулина, и фармацевтическая композиция с понижающей, соответственно регулирующей уровень глюкозы в крови эффективностью. Преимущество изобретения

Клампы глюкозы при введении собаке пашонок быстродействующих вариантов
инсулина

Доза: 1 х 0,3 м.е./кг подкожно при t_0
(среднее $\pm$ стандартная погрешность, n = 4)



RU 2 2 0 7 8 7 4 C 9

RU 2 2 0 7 8 7 4 C 9



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 38/28 (2006.01)**C07K 14/62** (2006.01)**C12N 15/17** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

Note: Bibliography reflects the latest situation

(21), (22) Application: **98112109/14, 18.06.1998**(24) Effective date for property rights: **18.06.1998**(30) Priority:
20.06.1997 DE 19726167.1(43) Application published: **20.06.2000**(45) Date of publication: **10.07.2003**Published on CD-ROM:
MIMOSA RFD 2003/007 MRFD2003007(15) Correction information:
Corrected version no 1 (W1 C2)(48) Corrigendum issued on:
20.12.2007 Bull. 35/2007Mail address:
**103064, Moskva, ul. Kazakova, 16, NIIR
Kantsel'jarija "Patentnye poverennye Kvashnin,
Sapel'nikov i partnery", pat.pov. V.P.
Kvashninu, reg.№ 0004**

(72) Inventor(s):

**EhRTL' Jokhann (DE),
KhABERMANN Paul' (DE),
GAJZEN Karl (DE),
ZAJPKE Gerkhard (DE)**

(73) Proprietor(s):

AVENTIS FARMA DOJChLAND GMBKh (DE)

(54) DERIVATIVE OF INSULIN OR ITS PHYSIOLOGICALLY ACCEPTABLE SALT, PRECURSOR OF INSULIN DERIVATIVE, DNA SEQUENCE ENCODING PRECURSOR, EXPRESSION VECTOR COMPRISING MENTIONED DNA SEQUENCE, SUBSTRATE TRANSFORMED WITH MENTIONED EXPRESSION VECTOR, PHARMACEUTICAL COMPOSITION WITH REDUCING AND REGULATING BLOOD GLUCOSE LEVEL EFFECTIVENESS, RESPECTIVELY

(57) Abstract:

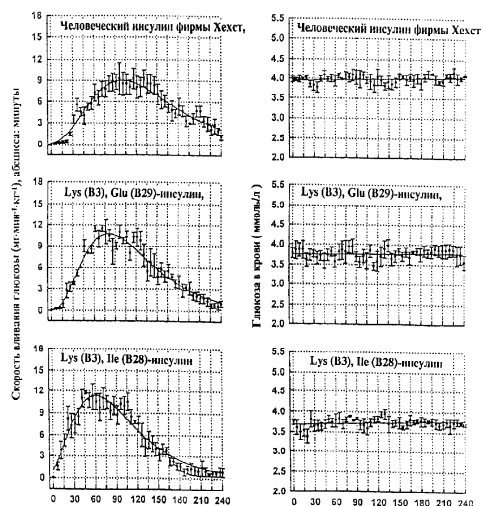
FIELD: medicine, endocrinology, molecular biology, genetic engineering, medicinal industry. SUBSTANCE: invention relates to derivative of insulin or its physiologically acceptable salt with accelerated onset effect as compared with human insulin. In this insulin derivative asparagines (Asn) in position B3 of chain B is replaced for natural basic amino acid residue, and at least one amino acid residue in positions B27, B28 or B29 of chain B is replaced for another natural neutral or acid amino acid residue being asparagines (Asn) in position A21

of chain A can be replaced for Asp, Gly, Ser, Thr or Ala and phenylalanine (Phe) in position B1 of chain B and amino acid residue in position B30 of chain B can absent. Invention describes also DNA sequences encoding precursor of insulin derivative, expression vector comprising this DNA and also strains expressing insulin precursor and pharmaceutical composition with reducing and regulating blood glucose level effectiveness, respectively. The advantage of invention involves the development of preparation with accelerated onset of effect. EFFECT: valuable properties of composition. 23 cl, 6 tbl, 1 dwg, 8 ex

Классы глюкозы при введении собаке натощак быстродействующих вариантов
инсулина

Доза: $1 \times 0,3 \text{ м.е./кг}$ подкожно при t_0

(среднее $\pm$ стандартная погрешность, $n = 4$)



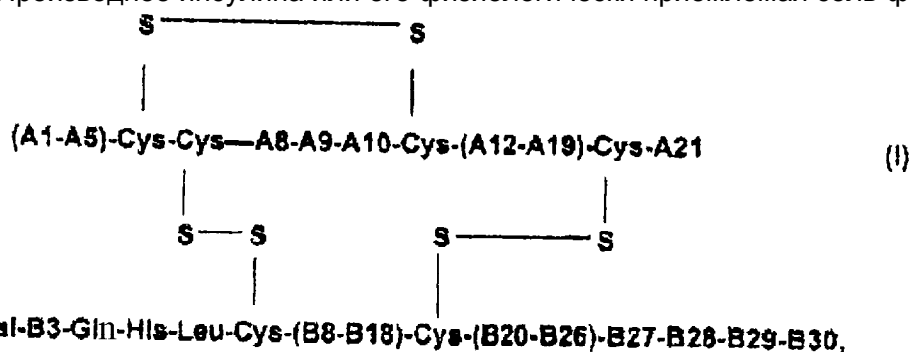
RU 2207874 C9

RU 2207874 C9

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Формула изобретения

1. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль формулы I



15 в которой (A1-A5) - аминокислотные остатки в положениях A1-A5 цепи A человеческого (ср. SEQ ID NO 1) или животного инсулина;

(A12-A19) - аминокислотные остатки в положениях A12-A19 цепи A человеческого (ср. SEQ ID NO 1) или животного инсулина;

A21 - Asn, Asp, Gly, Ser, Thr или Ala;

20 (B8-B18) - аминокислотные остатки в положениях B8-B18 цепи B человеческого (ср. SEQ ID NO 2) или животного инсулина;

(B20-B26) - аминокислотные остатки в положениях B20-B26 цепи B человеческого (ср. SEQ ID NO 2) или животного инсулина;

A8, A9, A10 - аминокислотные остатки в положениях A8, A9 и A10 цепи A человеческого (ср. SEQ ID NO 1) или животного инсулина;

25 B30 - гидроксил или аминокислотный остаток в положении B30 цепи B человеческого (ср. SEQ ID NO 2) или животного инсулина,

B1 - фенилаланиновый (Phe) остаток или атом водорода,

B3 - природный основной аминокислотный остаток,

30 B27, B28 и B29 - аминокислотные остатки в положениях B27, B28 и B29 цепи B человеческого (ср. SEQ ID NO 2) или животного инсулина или соответственно другой природный аминокислотный остаток, причем, по меньшей мере, один из аминокислотных остатков в положениях B27, B28 и B29 цепи B является природным аминокислотным остатком, выбранным из группы изолейцин (Ile), аспарагиновая кислота (Asp) и

35 глутаминовая кислота (Glu) и, по меньшей мере, один из аминокислотных остатков в положениях B27, B28 и B29 цепи B заменен на другой природный аминокислотный остаток, выбранный в отношении B29 из группы нейтральных или кислых аминокислот, и в отношении B27 и B28 из группы нейтральных аминокислот.

40 2. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль согласно п.1, в котором (которой) обозначают: A8 - аланин (Ala); A9 - серин (Ser); A10 - валин (Val) и B30 - аланин (Ala).

3. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль согласно п.1, в котором (которой) обозначают A8 - треонин (Thr); A9 - серин (Ser) и A10 - изолейцин (Ile).

4. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль согласно п.3, в котором (которой) B30 обозначает аланин (Ala) или треонин (Thr).

45 5. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль согласно п.3 с B30 = треонин (Thr), в котором (которой) обозначают: (A1-A5) - аминокислотные остатки в положениях A1-A5 цепи A человеческого инсулина; (A12-A19) - аминокислотные остатки в положениях A12-A19 цепи A человеческого инсулина; (B8-B18) - аминокислотные остатки в положениях B8-B18 цепи B человеческого инсулина, и (B20-B26) - аминокислотные остатки

50 в положениях B20-B26 цепи B человеческого инсулина.

6. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль по любому из пп.1-5, в котором (которой) аминокислотный остаток в положении B1 цепи B является

фенилаланиновым (Phe) остатком.

7. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль по любому из пп.1-6, в котором (которой) аминокислотный остаток в положении В3 цепи В является гистидиновым (His), лизиновым (Lys) или аргининовым (Arg) остатком.

5 8. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль по любому из пп.1-7, у которого (которой) цепь В имеет последовательность
Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr.

10 9. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль по любому из пп.1-7, у которого (которой) по меньшей мере один из аминокислотных остатков в положениях В27, В28 и В29 цепи В является изолейциновым (Ile) остатком.

10. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль по п.9, у которого (которой) цепь В имеет последовательность

15 **Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu**

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr.

11. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль по п.9, у которого (которой) цепь В имеет последовательность

20 **Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu**

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr.

12. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль согласно одному из пп.1-7 и 9, у которого (которой) аминокислотный остаток в положении А21 цепи А является аспарагиновым (Asp) остатком.

25 13. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль по п.12, у которого (которой) цепь А имеет последовательность

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn

Tyr Cys Asp

30 и цепь В имеет последовательность

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

Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr.

35 14. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль согласно одному из пп.1-9, у которого (которой) по меньшей мере один из аминокислотных остатков в положениях В27, В28 и В29 цепи В является природным аминокислотным остатком, выбранным из группы кислых аминокислот.

40 15. Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль по п.14, у которого (которой) аминокислотный остаток в положении А21 цепи А является аспарагиновым (Asp) остатком.

16. Предшественник производного инсулина по п.1, имеющий последовательность

45

50

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

или

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg

15 Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
 Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr
 Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly
 20 Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly

25

30

35

40

45

50

Ser Leu Gln Lys Arg

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln

5 **Leu Glu Asn Tyr Cys Asn,**
или

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

10 **Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr**

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

Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly

15 **Ser Leu Gln Lys Arg**

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn,

20 или

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr

25

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

Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly

Ser Leu Gln Lys Arg

30

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn.

35 17. ДНК-Последовательность, кодирующая предшественник производного инсулина согласно п.16.

18. Вектор экспрессии, содержащий ДНК-последовательность согласно п.17, выбранная из группы плазмид pINT 329, 332 и 333.

19. Штамм E.coli K12 W3110, трансформированный вектором экспрессии согласно п.18.

40 20. Фармацевтическая композиция с понижающей, соответственно регулирующей уровень глюкозы в крови эффективностью, содержащая производное инсулина в качестве активного вещества и физиологически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что она содержит в качестве производного инсулина по меньшей мере одно производное инсулина и/или одну его физиологически приемлемую соль согласно одному или нескольким из пп.1-15 в эффективном количестве.

45 21. Фармацевтическая композиция согласно п.20, отличающаяся тем, что она содержит производное инсулина и/или его физиологически приемлемую соль в растворенной, аморфной и/или кристаллической форме.

22. Фармацевтическая композиция согласно п.20, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит вспомогательное вещество продленного действия.

50 23. Фармацевтическая композиция согласно п.22, отличающаяся тем, что вспомогательным веществом продленного действия является протаминсульфат, причем производное инсулина и/или его физиологически приемлемая соль присутствует в форме сокристаллизата с протаминсульфатом.

Настоящее изобретение относится к лечению сахарного диабета, в частности к производному инсулина или его физиологически приемлемой соли, проявляющему (проявляющей) ускоренное в сравнении с человеческим инсулином наступление действия, предшественнику этого производного инсулина, ДНК-последовательности, кодирующей предшественник, вектору экспрессии, содержащему упомянутую ДНК-последовательность, субстрату, трансформированному упомянутым вектором экспрессии, и фармацевтической композиции с понижающей, соответственно регулирующей уровень глюкозы в крови эффективностью.

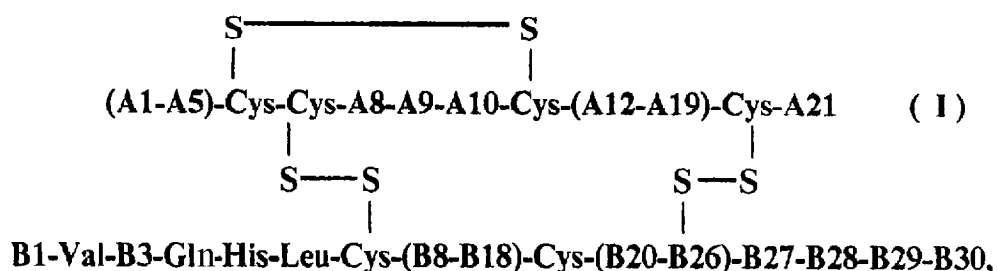
Известны производные инсулина или их физиологически приемлемые соли с ускоренным в сравнении с человеческим инсулином наступлением действия, у которых аминокислотный остаток в положении В28 цепи В заменен лизином или аргинином. Кроме того, эти производные еще и модифицированы в положениях В3 и/или А21 (ср. Европейский патент 0678522).

Задачей изобретения является расширение ассортимента производных инсулина с ускоренным в сравнении с человеческим инсулином наступлением действия.

Эта задача решается с помощью производного инсулина или его физиологически приемлемой соли, в котором (которой) аспарагин (Asn) в положении В3 цепи В заменен на природный основной аминокислотный остаток и по меньшей мере один аминокислотный остаток в положениях В27, В28 или В29 цепи В заменен на другой природный аминокислотный остаток, причем аспарагин (Asn) в положении А21 цепи А может быть заменен на Asp, Gly, Ser, Thr или Ala, а фенилаланин (Phe) в положении В1 цепи В и аминокислотный остаток в положении В30 цепи В могут отсутствовать.

Под «производным инсулина» подразумевается производное природных инсулинов, а именно человеческого инсулина (см. SEQ ID NO 1 = цепь А человеческого инсулина; см. SEQ ID NO 2 = цепь В человеческого инсулина, протокол последовательностей) или животных инсулинов, которое отличается от соответствующего, в остальном такого же, природного инсулина замещением по меньшей мере одного природного аминокислотного остатка и/или присоединением по меньшей мере одного аминокислотного и/или органического остатка.

Предлагаемое согласно изобретению производное инсулина или его физиологически приемлемая соль предпочтительно характеризуется формулой I



в которой обозначают:

- (A1-A5) аминокислотные остатки в положениях А1-А5 цепи А человеческого (ср. SEQ ID NO 1) или животного инсулина,
 (A12-A19) аминокислотные остатки в положениях А12-А19 цепи А человеческого (ср. SEQ ID NO 1) или животного инсулина,

- (B8-B18)** аминокислотные остатки в положениях B8-B18 цепи В человеческого (ср. SEQ ID NO 2) или животного инсулина,
- (B20-B26)** аминокислотные остатки в положениях B20-B26 цепи В человеческого (ср. SEQ ID NO 2) или животного инсулина,
- A8, A9, A10** аминокислотные остатки в положениях A8, A9 и A10 цепи А человеческого (ср. SEQ ID NO 1) или животного инсулина,
- A21** Asn, Asp, Gly, Ser, Thr или Ala,
- B30** гидроксил или аминокислотный остаток в положении B30 цепи В человеческого (ср. SEQ ID NO 2) или животного инсулина,
- B1** фенилаланиновый остаток (Phe) или атом водорода,
- B3** природный основной аминокислотный остаток,
- B27, B28 и B29** аминокислотные остатки в положениях B27, B28 и B29 цепи В человеческого (ср. SEQ ID NO 2) или животного инсулина или соответственно другой природный аминокислотный остаток, причем по меньшей мере один из аминокислотных остатков в положениях B27, B28 и B29 цепи В заменен на другой природный аминокислотный остаток.

Из двадцати встречающихся в природе генетически кодируемых аминокислот в контексте настоящего изобретения аминокислоты глицин (Gly), аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu), изолейцин (Ile), серин (Ser), треонин (Thr), цистеин (Cys), метионин (Met), аспарагин (Asn), глутамин (Gln), фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr), триптофан (Trp) и пролин (Pro) обозначаются как нейтральные аминокислоты, аргинин (Arg), лизин (Lys) и гистидин (His) как основные аминокислоты и аспарагиновая кислота (Asp) и глутаминовая кислота (Glu) как кислые аминокислоты.

Производное инсулина или его физиологически приемлемая соль согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой производное бычьего инсулина, свиного инсулина или человеческого инсулина, а именно производное инсулина или его физиологически приемлемую соль формулы I, которое (которая) отличается тем, что в нем (ней) обозначают:

- A8** аланин (Ala),

A9	серин (Ser),
A10	валин (Val) и
B30	аланин (Ala) (аминокислотные остатки A8-A10 и B30 бычьего инсулина) или
A8	треонин (Thr),
A9	серин (Ser) и
A10	изолейцин (Ile) (аминокислотные остатки A8-A10 человеческого или свиного инсулинов), причем
B30	обозначает аланин (Ala) (аминокислотный остаток B30 свиного инсулина) или
B30	обозначает треонин (Thr) (аминокислотный остаток B30 человеческого инсулина, ср. SEQ ID NO 2).

Особенно предпочтительны производное инсулина или его физиологически приемлемая соль формулы I с аминокислотными остатками A8-A10 и B30 человеческого инсулина, которое (которая) отличается тем, что в нем (ней) обозначают:

- (A1-A5)** аминокислотные остатки в положениях A1-A5 цепи A человеческого инсулина (ср. SEQ ID NO 1),
- (A12-A19)** аминокислотные остатки в положениях A12-A19 цепи A человеческого инсулина (ср. SEQ ID NO 1),
- (B8-B18)** аминокислотные остатки в положениях B8-B18 цепи B человеческого инсулина (ср. SEQ ID NO 2),
- (B20-B26)** аминокислотные остатки в положениях B20-B26 цепи B человеческого инсулина (ср. SEQ ID NO 2).

Другими предпочтительными вариантами настоящего изобретения являются:

- а) производное инсулина или его физиологически приемлемая соль, у которого (которой) аминокислотным остатком в положении B1 цепи B является фенилаланиновый остаток (Phe), или
- б) производное инсулина или его физиологически приемлемая соль,

у которого (которой) аминокислотным остатком в положении В3 цепи В является гистидиновый (His), лизиновый (Lys) или аргининовый (Arg) остаток,

- в) производное инсулина или его физиологически приемлемая соль, у которого (которой) по меньшей мере один из аминокислотных остатков в положениях В27, В28 и В29 цепи В заменен на один из природных аминокислотных остатков, выбранный из группы нейтральных или кислых аминокислот,
- г) производное инсулина или его физиологически приемлемая соль, у которого (которой) по меньшей мере один из аминокислотных остатков в положениях В27, В28 и В29 цепи В представляет собой природный аминокислотный остаток, выбранный из группы изолейцин (Ile), аспарагиновая кислота (Asp) и глутаминовая кислота (Glu),
и
- д) производное инсулина или его физиологически приемлемая соль, у которого (которой) по меньшей мере один из аминокислотных остатков в положениях В27, В28 цепи В заменен на природный аминокислотный остаток, из которых особенно предпочтителен изолейциновый остаток (Ile).

В качестве кислых аминокислот предпочтительно применяются аспарагинокислотный остаток(Asp) и глутаминокислотный остаток (Glu).

Особенно предпочтительны производное инсулина или его физиологически приемлемая соль, у которого (которой) цепь В имеет последовательность

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

(SEQ ID NO 3), например человеческий Lys (В3), Glu (В29)-инсулин, или последовательность

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

(SEQ ID NO 5), например человеческий Lys (B3), Ile (B27)-инсулин, или последовательность

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

(SEQ ID NO 4), например человеческий Lys (B3), Ile (B28)-инсулин.

Особенно предпочтительны также производное инсулина или его физиологически приемлемая соль, у которого (которой) цепь А имеет последовательность

**Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Tyr Gln Leu Glu
Asn Tyr Cys Asp (SEQ ID NO 9)**

и цепь В имеет последовательность

**Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr (SEQ ID NO 10),**

(человеческий Lys (B3), Ile (B28), Asp (A21)-инсулин.

Предлагаемые согласно изобретению производные инсулина предпочтительно могут быть получены методами генной инженерии, например путем конструирования реплицируемого вектора экспрессии, содержащего ДНК-последовательность, кодирующую предшественник производного инсулина, в котором аминокислотный остаток в положении A1 цепи А связан с аминокислотным остатком B30 цепи В через пептидную цепь формулы II



где R^1 является пептидной цепью с n аминокислотными остатками и n обозначает целое число от 0 до 34, и цепь В в положении B1 удлинена пептидной цепью формулы III



где R^2_m является пептидной цепью с m аминокислотными остатками и m обозначает целое число от 0 до 40, предпочтительно от 0 до 9, и p обозначает 0, 1 или 2, причем при $p = 0$ пептидная цепь R^2_m предпочтительно оканчивается лизином (Lys), экспрессии в клетке-хозяине и высвобождения производного инсулина из его предшественника химическими и/или ферментативными методами.

Предпочтительно клеткой-хозяином является бактерия, особенно предпочтительно бактерия *E. Coli*. В качестве клетки-хозяина могут быть использованы также дрожжи, особенно предпочтительно дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Для получения производного инсулина с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO 9 (цепь A) и SEQ ID NO 10 (цепь B) предшественник этого производного инсулина предпочтительно имеет последовательность

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asp (SEQ ID NO 11),

Lys (B3), Ile (B28), Asp (A21)-препроинсулин.

Для получения производного инсулина с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 3 предшественник этого производного инсулина предпочтительно имеет последовательность

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

Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
 Ser Leu Gln Lys Arg
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn,
 (Lys (B3), Glu (B29)-препроинсулин)
 (SEQ ID NO 6).

Для получения производного инсулина с аминокислотной
 последовательностью SEQ ID NO 5 предшественник этого производного
 инсулина предпочтительно имеет последовательность

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
 Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
 Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr
 Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly
 Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
 Ser Leu Gln Lys Arg
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn,
 (Lys (B3), Ile (B27)-препроинсулин)
 (SEQ ID NO 8).

Для получения производного инсулина с аминокислотной
 последовательностью SEQ ID NO 4 предшественник этого производного
 инсулина предпочтительно имеет последовательность

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

(Lys (B3), Ile (B28)-препроинсулин)
(SEQ ID NO 7).

Другими предметами настоящего изобретения являются названные предшественники предпочтительных производных инсулина, а именно пептиды с номерами последовательностей SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 и SEQ ID NO 8, ДНК-последовательности, кодирующие названные предшественники, векторы экспрессии, содержащие эти ДНК-последовательности, а также субстраты, трансформированные этими векторами экспрессии.

Производные инсулина формулы I получают главным образом с помощью генной инженерии путем сайт-направленного мутагенеза стандартными методами.

С этой целью конструируют генную структуру, кодирующую заданное производное инсулина формулы I, и экспримируют в субстрате - предпочтительно в бактерии, такой как *E. Coli* или дрожжи, в частности *Saccharomyces cerevisiae*, - и, в случае если генная структура кодирует слитый белок, высвобождают из слитого белка производное инсулина формулы I.

Отщепление слитобелкового компонента может происходить химически с помощью галогенциана после растворения клетки.

При получении с помощью предшественника препроинсулина, который содержит слитобелковый компонент (первоначальная последовательность), отщепление слитобелкового компонента происходит на более поздней стадии совместно с отщеплением С-пептида.

Предшественник инсулина затем подвергают окислительному сульфитолизу по методу, описанному, например, R. C. Marshall и A. S. Inglis в: «Practical Protein Chemistry - A Handbook» (издатель A. Darbe) 1986, стр. 49 - 53, с последующим ренатурированием в присутствии тиола с образованием настоящих

дисульфидных мостиков, например, по методу, описанному G. H. Dixon и A. C. Wardlaw в »Nature» (1960), 721 - 724.

Однако предшественники инсулина могут быть уложены также и непосредственно.

С-пептид удаляют путем триптического отщепления - например, по методу, описанному Kemmler et al., в: J. В. В (1971), стр. 6786 - 6791, и производное инсулина формулы I очищают с помощью известных способов, таких как хроматография и кристаллизация.

В случае, если в формуле I $n = 0$, то триптическое отщепление служит для разрыва пептидной связи между цепями А и В.

В этих способах цепь В оканчивается на С-конце аргинином или двумя аргининовыми остатками. Последние могут быть удалены ферментативно с помощью карбоксипептидазы В.

Предлагаемые согласно изобретению производные инсулина обладают полной биологической активностью. Это было показано на примере их внутривенного введения кроликам и обусловленного этим снижения уровня глюкозы в крови (примеры 5 и 6).

Ускоренное наступление действия производного инсулина при подкожном применении было показано с помощью евгליкемического кламп-метода (euglykaemische Clamp Technik) (пример 7) после подкожного введения натошак собаке (пример 7). Были введены 0,3 м.е./кг. Препаратом сравнения был человеческий инсулин. В кламп-методе после инъекции инсулина измеряют через короткие промежутки времени содержание глюкозы в крови и вливают ровно столько глюкозы, сколько необходимо, чтобы компенсировать уменьшение ее снижения. Это имеет то преимущество, что у животных не наступает никакой встречной регуляции, как это имело бы место при сильном падении содержания глюкозы в крови после введения инсулина. Количество и временная зависимость влитой глюкозы характеризуют действие инсулина. Lys

(B3), Glu (B29)-инсулин (SEQ ID NO 3) и Lys (B3), Ile (B28)- инсулин (SEQ ID NO 4) показывают явно более быстрое наступление действия, чем человеческий инсулин. Если максимальное действие (скорость вливания глюкозы) достигается с человеческим инсулином через 100 минут, то с Lys (B3), Glu (B29)-инсулином (SEQ ID NO 3) оно достигается через 80 минут, а с Lys (B3), Ile (B28)- инсулином (SEQ ID NO 4) уже через 60 минут. По этой причине указанные аналоги, если их впрыскивать незадолго до приема пищи, должны лучше, чем человеческий инсулин, компенсировать постпрандиальный (= возникающий после приема пищи) рост содержания глюкозы в крови.

Описанные производные инсулина пригодны для лечения сахарного диабета как типа I, так и типа II, предпочтительно в сочетании с базальным инсулином.

Поэтому дополнительным предметом настоящего изобретения является также фармацевтическая композиция с понижающей, соответственно регулирующей уровень глюкозы в крови эффективностью, содержащая наряду с физиологически приемлемым носителем по меньшей мере одно предлагаемое согласно изобретению производное инсулина и/или его физиологически приемлемую соль в эффективном количестве.

В качестве физиологически приемлемого и совместимого с производным инсулина носителя пригоден стерильный водный раствор, которому с помощью добавок глицерина, поваренной соли, глюкозы придают изотоничность по отношению к крови и который содержит наряду с этим еще один из обычно применяемых консервантов, например фенол, м-крезол или эфир п-гидроксibenзойной кислоты. Носитель может дополнительно содержать буферное вещество, например ацетат натрия, цитрат натрия, фосфат натрия. Для регулирования pH применяются разбавленные кислоты (как правило, соляная кислота), соответственно растворы щелочей (как правило, раствор едкого натра). Кроме того, носитель может содержать ионы цинка.

В качестве физиологически приемлемых солей пригодны, в частности, соли щелочных металлов или аммония. Одно или несколько производных инсулина

формулы I или производное инсулина формулы I может находиться в любой пропорции в смеси с другими из этих производных инсулина независимо друг от друга соответственно в растворенной, аморфной и/или кристаллической форме.

Иногда целесообразно добавить в предлагаемую согласно изобретению композицию необходимое количество подходящего стабилизатора для предотвращения выпадения в осадок белка в результате термо-механической нагрузки при контакте с различными материалами. Такие стабилизаторы общеизвестны.

Производное инсулина и/или его физиологически приемлемая соль может находиться в предлагаемой согласно изобретению композиции в растворенной, аморфной и/или кристаллической форме.

Как уже упоминалось, производные инсулина согласно изобретению характеризуются быстрым наступления их действия. Обычно в практике инсулиновой терапии быстродействующие инсулины смешивают с препаратами, содержащими вспомогательное вещество пролонгированного действия (например, NPH-инсулин). В результате, в зависимости от состава, получаются препараты, профили действия которых соответствуют наложенным отдельным профилям, поскольку отдельные компоненты в смеси стабильны и не оказывают друг на друга никакого влияния. Однако в случае смеси производного инсулина с человеческим NPH-инсулином приходится ожидать, что, особенно при длительном хранении, произойдет обмен между растворенным производным инсулина и кристаллическим NPH-инсулином. В результате как фармакодинамика инсулина пролонгированного действия, так и фармакодинамика растворенного быстродействующего инсулина изменяется непредсказуемым образом. Для предотвращения этого целесообразно приготавливать быстродействующее производное с применением вспомогательного вещества пролонгированного действия - например, в качестве NPH-инсулина. Эта депо-форма производного инсулина может быть затем как угодно смешана с растворенной быстро действующей формой, без того чтобы

состав одной или другой формы изменялся в результате обмена во время хранения.

Хотя настоящее изобретение в сущности относится к быстродействующим производным инсулина, оно охватывает также и возможность приготовления такого рода производных с целью обеспечения смешиваемости в виде депо-формы, причем предпочтительно вспомогательным веществом продленного действия является протаминсульфат и производное инсулина и/или его физиологически приемлемая соль образуют с протаминсульфатом сокристаллизат.

Ниже настоящее изобретение подробнее поясняется на примерах его осуществления.

Пример 1: Конструирование Lys (B3)-проинсулина в качестве исходного вещества для релевантных изобретению плазмид в соответствии с примерами 2 - 4.

В патенте США 5358857 описаны вектор pINT 90d и PCR-праймеры Tir и Insu 11. Эти компоненты служат исходным материалом для конструирования плазмиды pINT 125d, кодирующей желаемый Lys (B3)-проинсулин.

Дополнительно синтезируют праймеры Insu 35 с последовательностью

5' TTT GTG AAG CAG CAC CTG 3'

и Insu 36 с последовательностью

5' CAG GTG CTG CTT CAC AAA 3'.

Проводят PCR-реакцию с праймерами Tir и Insu 36 и вторую реакцию с праймерами Insu 11 и Insu 35. Матрицей для этого служит pINT 90d-ДНК.

Продукты обеих PCR-реакций отчасти комплементарны, так что при объединении их в третьей PCR-реакции с праймерами Tir и Insu 11 получается фрагмент, который кодирует вариант проинсулина, содержащий лизин в положении 3 цепи В. Этот PCR-фрагмент осаждают для очистки в этаноле, сушат и затем переваривают согласно данным изготовителей с рестрикционными ферментами Nco I и Sal I. Реакционную смесь разделяют гель-электрофоретически и выделяют целевой Nco I/Sal I-фрагмент.

В вышеуказанном патенте США описана плазмида pINT 91d, кодирующая мини-проинсулин. Если выделить путем расщепления последовательность, кодирующую мини-проинсулин, с помощью ферментов Nco I и Sal I и выделить ДНК остаточной плазмиды, то можно эту ДНК подвергнуть взаимодействию с полученным Nco I/Sal I-PCR-фрагментом в ходе T 4-лигаза-реакции с получением плазмиды pINT 125d. Последнюю трансформируют в E. Coli K12, там размножают и снова выделяют. После того как структура плазмиды подтверждена с помощью анализа последовательности ДНК и рестрикционного анализа, pINT 125d-ДНК служит в качестве матричной ДНК для введения дальнейших мутаций в этот вариант проинсулина.

Пример 2: Конструирование Lys (B3) Glu (B29)-проинсулина

Для получения мутеина синтезируют праймеры 329 а с последовательностью

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

и 329 б с последовательностью

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

В качестве матрицы применяется ДНК плазмид pINT125d и pINT91d.

Праймер 329а подвергают взаимодействию с праймером Insu 11 на матрице pINT91d, а праймер 329б – с Tir (см. вышеприведенный пример) на матрице pINT125d в PCR-реакции. Так как оба PCR-продукта отчасти

комплементарны, то они могут быть объединены в непосредственной PCR-реакции и снова подвергнуты взаимодействию с праймерами Tir и Insu 11. Образуется фрагмент ДНК, кодирующий целевой мутеин. Этот фрагмент подвергается двойному перевариванию рестрикционными ферментами Nco I и Sal I и образовавшийся Nco I / Sal I-фрагмент вставляют в ДНК остаточной плазмиды pINT91d в ходе T 4-лигаза-реакции.

Образуется плазида pINT 329, заданную структуру которой после амплификации в E. Coli K12 подтверждают с помощью рестрикционного анализа и анализа ДНК-последовательности.

Кодируемое плазмидой производное проинсулина охарактеризовано обоими аминокислотными заменами и соединительным С-звеном, которое состоит из аминокислоты аргинин.

Пример 3: Конструирование Lys (B3) Ile (B27)-проинсулина

Конструирование производится согласно предыдущему примеру с парами праймеров:

KB3 JB 27A

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

и Insu 11,

а также

K B3 J 27B

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

и Tir.

В качестве матрицы в обеих PCR-реакциях служит ДНК плазмиды pINT125d. PCR-Продукты обеих реакций объединяют в ходе третьей реакции, как описано в примере 1, и продукт клонируют соответственно примеру.

Получают плазмиду pINT332.

Пример 4: Конструирование Lys (B3) Ile (B28)-проинсулина

Конструирование производится согласно примеру 3 с парами праймеров:

KB3 JB 28A

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

и Insu 11,

а также

KB J B28B

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

и Tir.

Получают плазмиду pINT333.

Экспрессия сконструированных вариантов инсулина.

Плазмиды pINT 329, 332 и 333 трансформируют, например, каждую в E. Coli K12 W3110. Затем рекомбинантные бактерии, содержащие плазмиды, каждая из которых кодируют соответствующий вариант, ферментируют и получают таким образом необходимое сырье для получения соответствующего варианта инсулина.

Пример 5: Конструирование Lys (B3), Ile (B28), Asp (A21)-проинсулина

Конструирование производится согласно примеру 3. Однако вместо pINT125d матрицей для PCR-реакции служит ДНК плазмиды pINT 333, которая была сконструирована в примере 4. При этом применяется следующая пара праймеров:

P-pint365

5'-TTTTTTGTCGACTATTAGTCGCAGTAGTTCTACCAGCTG-3'

и Ttg.

Получают плазмиду pINT365.

**Пример 6: Биологическая активность Lys (B3), Glu (B29)-инсулина
после внутривенного введения кроликам**

Таблица 1

Время, ч	Человеческий инсулин	Lys (B3), Glu (B29)-инсулин
0	100	100
0,25	89,17	89,47
0,5	67,56	58,32
0,75	73,24	66,59
1	73,13	68,21
1,5	78,12	71,95
2	89,47	80,88
3	107,01	94,2
4	104,55	99,78

Восемь кроликов получали внутривенно указанные инсулины (0,2 м.е./кг). В течение следующих четырех часов в указанные моменты времени определяли концентрацию глюкозы в крови и пересчитывали в проценты от исходного значения в момент времени 0. Средние значения не показывают значительной

разницы в биологической активности между человеческим инсулином и Lys (B3), Glu (B29)-инсулином.

Пример 7: Биологическая активность Lys (B3), Ile (B27)- и Lys (B3), Ile (B28)-инсулина после внутривенного введения кроликам

Шесть кроликов получали внутривенно указанные инсулины (0,2 м.е./кг). В течение следующих четырех часов в указанные моменты времени определяли концентрацию глюкозы в крови и пересчитывали в проценты от исходного значения в момент времени 0. Средние значения не показывают значительной разницы в биологической активности между человеческим инсулином, Lys (B3), Ile (B27)-инсулином и Lys (B3), Ile (B28)-инсулином.

Таблица 2

Время, ч	Человеческий инсулин	Lys (B3), Ile (B27)-инсулин	Lys (B3), Ile (B28)-инсулин
0	100	100	100
0,33	67,8	62,6	63,3
0,66	54,9	60,6	55,8
1	55,2	66,8	59,3
1,5	63	79,2	66,7
2	77,8	90,9	81,6
3	91,5	96,3	97,2
4	99,5	96	101,6

Пример 8: Фармакодинамика Lys (B3), Glu (B29)-инсулина и Lys (B3), Ile (B28)-инсулина после подкожного введения собаке

Группы из четырех собак получали подкожные инъекции указанных инсулинов (0,3 м.е./кг). Уровень глюкозы в крови поддерживали в пределах от 3,7 до 4 ммоль/л путем непрерывного вливания глюкозы. Была показана средняя скорость вливания глюкозы $\pm$ (стандартная погрешность) от момента инъекции ($t = 0$) в течение 240 мин. (фиг.1)

Клампы глюкозы при ведении собаке натошак быстродействующих вариантов инсулина

Параметры профилей вливания глюкозы

Доза: 1 x 0,3 м.е./кг подкожно при t_0 (n = 4) Таблица3

Препарат	Фаза инкремента		$t_{\text{макс}}$ (мин)	Фаза декремента	
	Точка поворота (мин)	Угловой коэффициент точки поворота		Точка поворота (мин)	Угловой коэффициент точки поворота
Человеческий инсулин фирмы Хехст	43	0,144	100	156	-0,065
Lys (B3), Glu (B29)- инсулин	33	0,227	80	127	-0,091
Lys (B3), Ile (B28)- инсулин	16	0,267	60	104	-0,102

Клампы глюкозы при введении собаке натошак быстродействующих вариантов инсулина

Доза: 1 x 0,3 м.е./кг подкожно при t_0 (среднее $\pm$ РЭМ, n = 4)

Таблица 4

Человеческий инсулин фирмы Хёхст АГ					
Скорость вливания глюкозы			Глюкоза в крови		
Время, мин	мг·мин ⁻¹ ·кг ⁻¹		Время, мин	ммоль/л	
	среднее	стандартн. погреш.		среднее	стандартн. погреш.
0	0.00	0.00	0	3.98	0.07
6	0.14	0.01	4	3.97	0.04
11	0.23	0.08	9	3.98	0.08
16	0.35	0.19	14	3.99	0.04
21	0.44	0.18	19	4.01	0.05
26	1.50	0.25	24	3.85	0.08
31	3.50	0.56	29	3.82	0.13
36	5.50	0.90	34	3.77	0.13
41	4.50	0.56	39	3.99	0.07
46	4.00	1.17	44	4.09	0.11
51	5.25	0.54	49	3.98	0.06
56	5.75	0.89	54	4.01	0.10
61	7.25	1.19	59	3.93	0.13
66	6.50	1.09	64	4.08	0.06
71	7.75	1.08	69	3.98	0.01
76	7.75	1.14	74	4.08	0.10
81	8.50	1.09	79	4.03	0.12
86	8.75	1.29	84	4.09	0.15
91	8.75	1.08	89	4.03	0.18
96	9.25	2.33	94	3.99	0.22
101	8.50	1.68	99	4.08	0.10
106	8.50	1.44	104	3.96	0.08
111	8.00	1.06	109	3.92	0.19
116	9.25	1.47	114	3.83	0.17
121	8.00	1.58	119	4.04	0.21
126	8.00	1.37	124	3.95	0.12
131	9.25	1.19	129	3.81	0.09
136	8.50	1.30	134	3.92	0.16
141	8.50	1.25	139	3.86	0.13

Продолжение таблицы 4

146	8.25	1.24	144	3.91	0.12
151	7.00	1.46	149	4.06	0.08
156	6.25	1.29	154	4.05	0.04
161	6.00	0.79	159	3.97	0.12
166	5.00	0.50	164	4.04	0.09
171	4.75	1.39	169	3.95	0.15
176	4.33	0.54	174	4.01	0.12
181	5.33	1.19	179	3.88	0.14
186	4.67	0.72	184	4.03	0.09
191	3.33	0.72	189	4.12	0.11
196	3.00	0.00	194	4.13	0.03
201	3.67	0.72	199	3.98	0.11
206	4.67	0.72	204	3.91	0.05
211	4.67	0.72	209	3.92	0.08
216	3.33	0.72	214	4.09	0.04
221	3.00	0.94	219	4.05	0.11
226	2.17	0.68	224	4.17	0.12
231	2.67	0.98	229	4.00	0.13
236	2.00	0.47	234	4.01	0.05
240	1.17	0.36	239	4.08	0.02

Таблица 5

Lys (B3), Glu (B29)-инсулин					
Скорость вливания глюкозы			Глюкоза в крови		
Время,	мг·мин ⁻¹ ·кг ⁻¹		Время,	ммоль/л	
мин	среднее	стандартн. погреш.	мин	среднее	стандартн. погреш.
0	0.00	0.00	0	3.77	0.12
6	0.24	0.08	5	3.85	0.22
11	0.36	0.18	10	3.86	0.17
16	0.95	0.60	15	3.86	0.22
21	2.75	0.96	20	3.61	0.16
26	3.25	0.65	25	3.73	0.14
31	3.75	0.22	30	3.76	0.08
36	5.25	0.41	35	3.66	0.15

Продолжение таблицы 5

41	6.00	0.00	40	3.71	0.12
46	9.00	0.87	45	3.58	0.19
51	8.00	0.00	50	3.73	0.14
56	8.50	0.56	55	3.81	0.11
61	11.50	0.43	60	3.57	0.14
67	10.00	1.22	65	3.81	0.20
71	11.50	0.43	70	3.85	0.23
76	11.00	1.70	75	3.81	0.28
81	10.50	0.83	80	3.94	0.15
86	8.25	1.75	85	3.95	0.18
91	9.00	0.50	90	3.69	0.12
96	11.00	0.94	95	3.56	0.14
101	9.75	0.41	100	3.71	0.16
106	10.25	0.89	105	3.59	0.20
111	8.00	0.94	110	3.84	0.16
116	10.25	0.74	115	3.46	0.10
121	10.25	1.24	120	3.56	0.25
126	9.75	1.34	125	3.70	0.23
131	7.75	1.52	130	3.88	0.21
136	5.50	1.44	135	3.97	0.15
141	6.75	1.85	140	3.64	0.15
146	6.25	1.67	145	3.71	0.14
151	4.75	1.14	150	3.82	0.08
156	5.75	0.96	155	3.71	0.11
161	4.75	0.82	160	3.81	0.11
166	5.50	1.03	165	3.67	0.15
171	4.75	0.41	169	3.81	0.04
176	3.75	0.54	175	3.83	0.08
181	4.00	0.94	180	3.75	0.16
186	2.88	0.87	185	3.85	0.14
191	3.25	0.41	190	3.78	0.10
196	3.13	0.84	195	3.81	0.14
201	2.13	0.51	200	3.88	0.13
206	2.06	0.66	205	3.85	0.14

Продолжение таблицы 5

211	1.79	0.62	210	3.85	0.17
216	1.78	0.63	215	3.85	0.18
221	1.41	0.58	220	3.87	0.16
226	0.78	0.36	225	3.85	0.13
231	0.85	0.37	230	3.72	0.23
236	0.76	0.51	235	3.74	0.21
240	1.07	0.47	240	3.56	0.18

Таблица 6

Lys (B3), Ile (B28)-инсулин					
Скорость вливания глюкозы			Глюкоза в крови		
Время, мин	мг·мин ⁻¹ ·кг ⁻¹		Время, мин	ммоль/л	
	среднее	стандартн. погреш.		среднее	стандартн. погреш.
0	0.00	0.00	0	3.74	0.07
6	1.54	0.53	4	3.60	0.17
11	3.75	1.24	10	3.49	0.19
16	5.25	0.89	15	3.53	0.14
21	8.25	1.67	20	3.38	0.18
26	7.25	1.63	25	3.81	0.20
31	7.50	1.25	30	3.64	0.13
36	8.50	1.15	35	3.65	0.12
41	11.00	1.12	40	3.63	0.09
46	11.75	0.22	45	3.68	0.10
51	10.75	0.96	50	3.81	0.09
56	11.25	1.78	55	3.73	0.11
61	10.50	1.09	60	3.78	0.16
66	9.75	1.85	65	3.83	0.14
71	11.00	1.50	70	3.69	0.11
76	10.50	0.83	75	3.81	0.06
81	9.25	1.19	80	3.89	0.01
86	10.00	1.22	85	3.78	0.02
91	8.75	1.29	90	3.83	0.04
96	10.25	0.74	95	3.67	0.11

Продолжение таблицы 6

101	10.00	1.22	100	3.66	0.18
106	10.50	1.15	105	3.59	0.15
111	8.50	1.03	109	3.74	0.10
116	7.75	0.22	115	3.81	0.08
121	7.50	1.09	120	3.83	0.07
126	6.00	1.62	125	3.94	0.07
131	4.25	1.29	130	3.95	0.12
136	5.33	1.19	135	3.70	0.20
142	4.75	1.19	140	3.71	0.08
146	4.00	0.94	145	3.73	0.07
151	3.25	0.89	150	3.74	0.14
156	4.00	0.71	155	3.62	0.05
162	3.75	0.54	160	3.69	0.09
166	2.25	0.54	165	3.80	0.13
171	2.25	0.41	170	3.75	0.05
176	1.63	0.48	175	3.77	0.05
181	1.54	0.53	180	3.77	0.12
186	0.88	0.46	185	3.76	0.10
191	1.19	0.54	190	3.76	0.04
196	1.28	0.79	195	3.76	0.08
202	1.07	0.58	200	3.71	0.11
206	0.94	0.60	205	3.66	0.08
212	1.41	1.04	210	3.69	0.08
217	0.95	0.60	215	3.74	0.09
221	0.54	0.21	220	3.66	0.17
226	0.72	0.38	225	3.72	0.10
231	0.69	0.38	230	3.75	0.08
237	0.94	0.60	235	3.71	0.03
240	0.88	0.61	240	3.69	0.03

ПРОТОКОЛ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

(i) ЗАЯВИТЕЛЬ:

(А) ИМЯ: **Хехст Марион Руссель Дойчланд ГмбХ**

(Б) УЛИЦА: -

(В) ГОРОД: **Франкфурт на Майне**

(Г) ЗЕМЛЯ: -

(Д) СТРАНА: **Федеративная Республика Германия**

(Е) ПОЧТОВЫЙ ИНДЕКС: **65926**

(Ж) ТЕЛЕФОН: **069-305-5307**

(З) ТЕЛЕФАКС: **069-35-7175**

(ii) НАЗВАНИЕ ЗАЯВКИ: **Производные инсулина с быстрым
наступлением действия**

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: **8**

(iv) МАШИНОЧИТАЕМАЯ ФОРМА:

(А) НОСИТЕЛЬ ДАННЫХ: **дискета**

(Б) КОМПЬЮТЕР: **ИБМ-совместимый ПК**

(В) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: **PC-DOS/MS-DOS**

(Г) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: **PatentIn Release # 1.0,
Version # 1.25 (EPA).**

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: **21 аминокислота**

(Б) ВИД: **аминокислота**

(В) ФОРМА НИТИ: **одиночная**

(Г) ТОПОЛОГИЯ: **линейная**

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: **белок**

(ix) ПРИЗНАКИ:

(А) НАИМЕНОВАНИЕ/КОД: **белок**

(В) ПОЛОЖЕНИЕ: **1..21**

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: **SEQ ID NO 1:**

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 30 аминокислот

(Б) ВИД: аминокислота

(В) ФОРМА НИТИ: одиночная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(ix) ПРИЗНАКИ:

(A) НАИМЕНОВАНИЕ/КОД: белок

(B) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..30

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 2:

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 30 аминокислот

(Б) ВИД: аминокислота

(В) ФОРМА НИТИ: одиночная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(ix) ПРИЗНАКИ:

(A) НАИМЕНОВАНИЕ/КОД: белок

(B) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..30

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 3:

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ **SEQ ID NO 4:**

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 30 аминокислот

(Б) ВИД: аминокислота

(В) ФОРМА НИТИ: одиночная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(ix) ПРИЗНАКИ:

(A) НАИМЕНОВАНИЕ/КОД: белок

(В) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..30

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: **SEQ ID NO 4:**

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ **SEQ ID NO 5:**

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 30 аминокислот

(Б) ВИД: аминокислота

(В) ФОРМА НИТИ: одиночная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(ix) ПРИЗНАКИ:

(A) НАИМЕНОВАНИЕ/КОД: белок

(В) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..30

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: **SEQ ID NO 5:**

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ **SEQ ID NO 6:**

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 97 аминокислот

(Б) ВИД: аминокислота

(В) ФОРМА НИТИ: одиночная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(ix) ПРИЗНАКИ:

(А) НАИМЕНОВАНИЕ/КОД: белок

(В) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..97

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 6:

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO 7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 97 аминокислот

(Б) ВИД: аминокислота

(В) ФОРМА НИТИ: одиночная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(ix) ПРИЗНАКИ:

(А) НАИМЕНОВАНИЕ/КОД: белок

(В) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..97

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 7:

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

(A) НАИМЕНОВАНИЕ/КОД: **белок**(B) ПОЛОЖЕНИЕ: **1..21**(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: **SEQ ID NO 9:**

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ **SEQ ID NO 10:**

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: **30 аминокислот**(B) ВИД: **аминокислота**(B) ФОРМА НИТИ: **одиночная**(Г) ТОПОЛОГИЯ: **линейная**(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: **белок**

(ix) ПРИЗНАКИ:

(A) НАИМЕНОВАНИЕ/КОД: **белок**(B) ПОЛОЖЕНИЕ: **1..30**(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: **SEQ ID NO 10:**

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ **SEQ ID NO 11:**

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: **97 аминокислот**(B) ВИД: **аминокислота**(B) ФОРМА НИТИ: **одиночная**(Г) ТОПОЛОГИЯ: **линейная**(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: **белок**

(ix) ПРИЗНАКИ:

(A) НАИМЕНОВАНИЕ/КОД: **белок**(B) ПОЛОЖЕНИЕ: **1..97**

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 11:

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