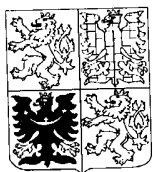


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.05.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.06.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/19825447**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.04.2001**
(Věstník č. 4/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/03490**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/64598**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4525

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/17

C 07 K 14/62

A 61 K 38/28

A 61 P 5/48

(71) Přihlašovatel:

AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH,
Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce:

Ertl Johann, Eppstein, DE;
Habermann Paul, Eppstein, DE;
Geisen Karl, Frankfurt, DE;
Seipke Gerhard, Hofheim, DE;
Wollmer Axel, Aachen, DE;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Analogy inzulínu, způsob jejich přípravy a
farmaceutické přípravky obsahující tyto analogy**

(57) Anotace:

Předkládané řešení se týká analogů inzulínu, které projevují zvýšené schopnosti vázat zinek, a také komplexů inzulínu se zinkem, které ve srovnání s humánním inzulínem mají opožděný účinek. Dále se vynález týká způsobů přípravy těchto analogů a jejich použití zejména pro výrobu farmaceutických přípravků k léčení Diabetes mellitus I. a II. typu.

04.12.00

PV 1070-455

85732

178 449/KB

- 1 -

Analogy inzulínu, způsob jejich přípravy a farmaceutické přípravky obsahující tyto analogy

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká analogů inzulínu, které projevují zvýšené schopnosti vázat zinek, a také komplexů inzulínu se zinkem, které ve srovnání s humánním inzulínem mají opožděný profil účinku. Dále se vynález týká způsobů přípravy těchto analogů a jejich použití zejména ve farmaceutických přípravcích k léčení *Diabetes mellitus* I. a II. typu.

Dosavadní stav techniky

Celosvětově trpí onemocněním *Diabetes mellitus* asi 120 milionů lidí. Z toho asi 12 milionů lidí trpí diabetem I. typu, přičemž pro tyto diabetiky představuje v současné době jedinou možnou terapií substituční léčba nahrazující chybějící endokrinní sekreci. Postižení lidé jsou celoživotně, zpravidla několikrát denně, závislí na inzulínové injekci. Ve srovnání s tím diabetes II. typu neznámá zásadní nedostatek inzulínu, avšak přesto v mnohých případech, zejména v pokročilém stádiu, léčení inzulínem, případně v kombinaci s perorálními antidaibetiky, představuje účinnou formu terapie.

U zdravých jedinců je uvolňování inzulínu z pankreatu přísně svázáno s hladinou glukózy v krvi. Zvýšená glykémie, ke které dochází po jídle, je urychleně kompenzována odpovídajícím zvýšením sekrece inzulínu. V lačném stavu klesá

hladina inzulínu v plazmě na bazální hodnotu, která je dostatečná k tomu, aby bylo zajištěno kontinuálně zásobování glukózou orgánů a tkání vnímavých k inzulínu a přitom produkce glukózy v játrech byla v noci udržována na nízké úrovni. Náhrada tělu vlastní sekrece inzulínu exogenním inzulínem, většinou dodávaným subkutánní injekcí, se však kvalitou zpravidla nepřibližuje výše popsané fyziologické regulaci krevní glukózy. Často dochází k vychýlení hladiny glukózy krvi směrem dolů nebo nahoru, což se v těžších případech může stát faktorem ohrožujícím život. Kromě toho po léta zvýšená hladina krevní glukózy bez počátečních příznaků představuje zvýšené zdravotní riziko. Rozsáhlá studie DCCT v USA (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993, N. Engl. J. Med. 329: 977-986) jasně ukázala, že chronické zvýšení glykémie je významně zodpovědné za rozvoj pozdních diabetických poškození. Tato pozdní diabetické poškození představují mikro- a makrovaskulární poškození, která se manifestují jako různé retino-, nefro- a nebo neuropatie vedoucí k oslepnutí, selhání ledvin a ztrátě končetin, a jsou spojeny se zvýšeným rizikem srdečních a oběhových onemocnění. Z výše uvedeného je zřejmé, že terapie diabetu musí v první řadě být zacílena na to, aby byla udržena hladina krevní glukózy ve fyziologických mezích. Podle konceptu intenzivní inzulínové terapie je toho dosaženo pomocí injekcí rychle a pomalu působících inzulínových přípravků aplikovaných několikrát denně. Rychle působící přípravky se podávají současně s jídlem, aby se vyrovnal postprandiální vzestup krevní glukózy. Pomalu působící přípravky se podávají k udržení základního přísunu inzulínu, zejména k zabezpečení přes noc, aniž by došlo k hypoglykémii.

V současnosti užívané základní inzulínové přípravky tyto požadavky splňují jen nedokonale. Zejména často užívané

NPH-inzulíny projevují významné maximum účinnosti a přitom mají krátkodobý účinek. To při večerní aplikaci přináší nebezpečí noční hypoglykémie a ranní hyperglykémie.

Z Evropského patentu EP 0 821006 jsou známy analogy inzulínu se zvýšenou schopností vázat zinek, které mají ve srovnání s humánním inzulínem prodloužený profil účinku. Tyto analogy se liší od humánního inzulínu změnou aminokyseliny v pozici A21 řetězce A a adicí histidinových zbytků nebo peptidu s 2 až 35 aminokyselinovými zbytky, v nichž je 1 až 5 histidinových zbytků, na pozici B30 v řetězci B inzulínu.

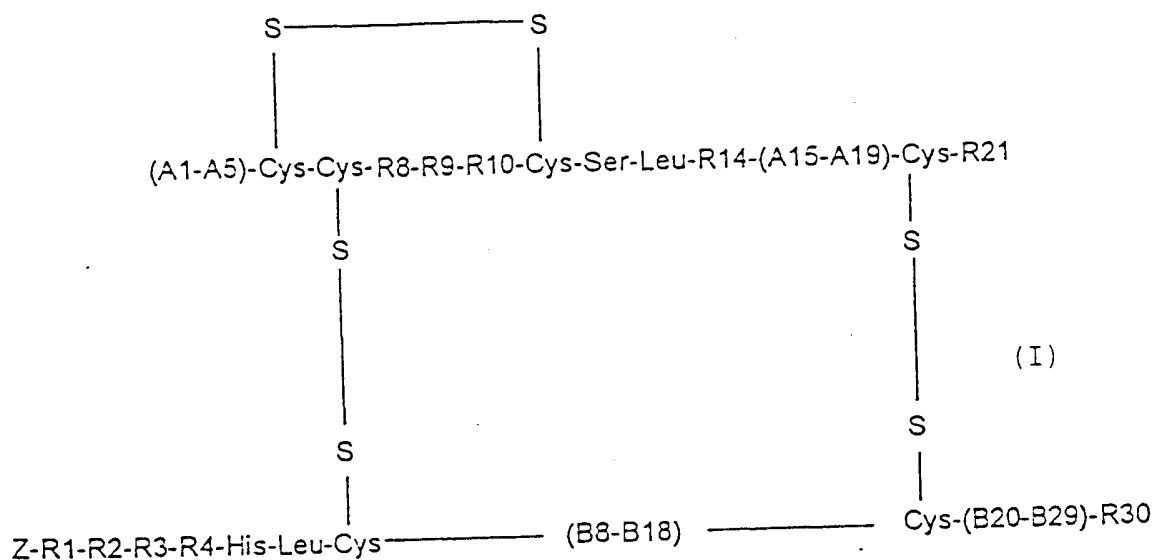
Podstata vynálezu

Cílem předkládaného vynálezu bylo připravit další nové analogy (analogy humánního nebo zvířecího inzulínu), které mají zvýšenou schopnost vázat zinek, vytvářejí stabilní komplex obsahující hexamer inzulínových analogů a zinku, a jeho výhodné použití pro subkutánní injekce, které ve srovnání s humánním inzulínem mají opožděný profil účinku, což umožňuje zlepšit terapii *Diabetes mellitus* I. a II. typu.

Analogy inzulínu jsou odvozeny z inzulínů přírodního původu, zejména humánního inzulínu (sekvence id. č. 1: řetězec A humánního inzulínu, sekvence id. č. 2: řetězec B humánního inzulínu) nebo zvířecího inzulínu buďto substitucí nebo delecí alespoň jednoho přirozeně se vyskytujícího aminokyselinového zbytku a/nebo adicí alespoň jednoho přirozeně se vyskytujícího aminokyselinového zbytku v řetězci A a/nebo řetězci B přirozeně se vyskytujícího inzulínu.

- 4 -

Vynález poskytuje analog inzulínu, nebo jeho fyziologicky přijatelnou sůl, který má vzorec (I):



kde

(A1-A5) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích A1 až A5 v řetězci A humánního (viz sekvence id. č. 1) nebo zvířecího inzulínu,

(A15-A19) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích A15 až A19 v řetězci A humánního (viz sekvence id. č. 1) nebo zvířecího inzulínu,

(B8-B18) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích B8 až B18 v řetězci B humánního (viz sekvence id. č. 2) nebo zvířecího inzulínu,

(B20-B29) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích B20 až B29 v řetězci B humánního (viz sekvence id. č. 2) nebo zvířecího inzulínu,

R8 je Thr nebo Ala,

R9 je Ser nebo Gly,

R10 je Ile nebo Val,

R14 je Tyr, His, Asp nebo Glu,

R21 je Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu nebo Gln,

R1 je libovolný geneticky kódovatelný aminokyselinový zbytek, nebo není přítomen, nebo je to atom vodíku,

R2 je Val, Ala nebo Gly,

R3 je Asn, His, Glu nebo Asp,

R4 je Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly nebo Glu,

R30 je libovolný geneticky kódovatelný aminokyselinový zbytek nebo -OH,

Z je atom vodíku nebo peptidový zbytek obsahující 1 až 4 geneticky kódovatelné aminokyselinové zbytky, z nichž 1 až 4 jsou histidinové zbytky (His),

příčemž platí podmínky, že v případě, kdy Z je atom vodíku, R1 nebo R3 jsou His, Glu nebo Asp, příčemž R3 je His, když R1 je neutrální nebo negativně nabitá aminokyselina, nebo platí, že v případě, kdy Z je atom vodíku, R14 je His, Asp nebo Glu, a dále platí, že analog inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl se neodlišuje od humánního inzulinu (viz sekvence id. č. 1 a sekvence id. č. 2) pouze díky změnám aminokyselinových zbytků v pozici R3 nebo společně v pozicích R3 a R21 nebo společně v pozicích R3 a R4 ve vzorci I.

Výhodné analogy inzulinu nebo jejich fyziologicky přijatelné soli jsou ty, kde

2. R8 je Thr, R9 je Ser a R10 je Ile,

3. R1 je Phe, His, Asn, Asp nebo Gly,

4. R30 je Thr, Ala nebo Ser,

5. R21 je Asn a R1 je Phe.

6. Dalším výhodným provedením předkládaného vynálezu je analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl, podle vzorce I, který se vyznačuje tím, že R2 je Val, R3 je Asn a R4 je Gln.

Dále je výhodný analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl, podle vzorce I, kde R14 je

7. Tyr,

8. His,

9. Asp, nebo

10 Glu.

Dále je výhodný analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl, podle vzorce I, kde R30 je

11. Thr,

12. Ala,

13. Ser, nebo

14. -OH.

Zvláště výhodný je analog inzulínu, nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl, podle vzorce I, kde Z je

15. His,

16. His-Ala- nebo

17. His-Ala-Ala-.

K příkladům výhodných provedení analogů inzulínu podle předkládaného vynálezu dále patří:

18. Analog inzulínu, nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl, podle vzorce I, kde řetězec B má sekvenci (sekvence id. č. 3)

His 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

např. His(B0),des(B30)-humánní inzulín.

19. Analog inzulínu, nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl, podle vzorce I, kde řetězec B má sekvenci (sekvence id. č. 4)

His 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

např. His(B0)-humánní inzulín.

20. Analog inzulínu, nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl, podle vzorce I, kde řetězec B má sekvenci (sekvence id. č. 5)

His Ala 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

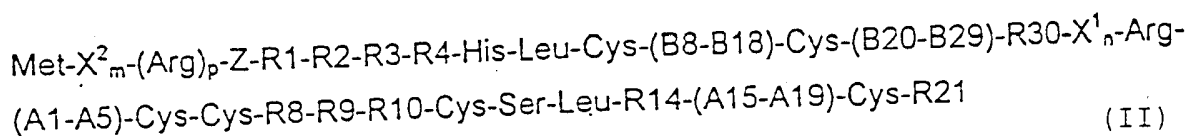
např. His(B-1),Ala(B0)-humánní inzulín nebo

21. Analog inzulínu, nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl, podle vzorce I, kde řetězec B má sekvenci (sekvence id. č. 6)

His Ala Ala 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

např. His(B-2), Ala(B-1), Ala(B0)-humánní inzulin.

Předkládaný vynález se dále týká způsobu přípravy analogů inzulinu nebo jejich fyziologicky přijatelných solí podle vynálezu, kterýžto způsob obsahuje konstrukci replikovatelného expresního vektoru, který obsahuje sekvenci DNA, která kóduje prekursor analogu inzulinu s obecnou aminokyselinovou sekvencí podle vzorce II:



kde

X_n^1 je peptidový řetězec obsahující n aminokyselinových zbytků, přičemž n je celé číslo 0 až 34,

X_m^2 peptidový řetězec obsahující m aminokyselinových zbytků, přičemž m je celé číslo 0 až 20,

p je 0, 1 nebo 2,

R30 je libovolná geneticky kódovatelná aminokyselina nebo není přítomen, a

Z buďto chybí nebo je to peptidový zbytek obsahující 1 až 4 geneticky kódovatelné aminokyseliny obsahující 1 až 4 histidinových zbytků (His) a zbývající proměnné mají stejný význam jako v předchozím vzorci I, stejně tak jako platí předchozí pravidla,

a dále způsob obsahuje expresi v hostitelských buňkách a uvolnění analogů inzulinu z jejich prekursorů chemickými a/nebo enzymatickými metodami.

Výhodné hostitelské buňky jsou bakterie, zejména pak bakterie *E. coli*.

Výhodnými hostitelskými buňkami jsou také kvasinky, zvláště výhodné jsou buňky *Saccharomyces cerevisiae*.

Při expresi v *E. coli* vytvářejí tzv. fúzní proteiny (sekvence id. č. 7 až 9) zpravidla nerozpustné komplexy, tzv. inkluzní tělíska, která se po rozrušení buněk mohou izolovat centrifugací a pomocí chaotropních přísad (jako je např. 8M močovina nebo 6M guanidiniumchlorid) dále rozpouštět. Rozpuštěné fúzní proteiny se pak mohou podrobit sulfitolýze, při které jsou skupiny SH převedeny na S-sulfonátové skupiny (viz např. B.R.C. Marshall, A.S. Iglis, Practical Protein Chemistry - A Handbook, A. Darbre, 1986, str. 49-53). Tím se zlepší rozpustnost fúzních proteinů a usnadní další čištění, např. pomocí aniontové výměnné chromatografie nebo gelové permeační chromatografie.

K převedení derivatizovaných fúzních proteinů na preproinzulín s nativní prostorovou strukturou a správně vytvořenými disulfidickými můstky (sestavení proteinu, "folding") dojde ve zředěném vodném roztoku přidáním vymezeného množství SH-činidla jako je např. merkaptoetanol, cystein nebo glutathion, a následně vzdušnou oxidací. Alternativně může být rozpuštěný, nederivatizovaný fúzní protein za podobných podmínek také sestaven přímo (viz Evropské patenty EP A 0 600372, EP A 0 668292).

Preproinzulín je pak převeden omezeným proteolytickým štěpením na biologicky aktivní inzulín. K tomu se může využít trypsin, který ze sloučeniny podle vzorce II odstraňuje presekvenci $\text{Met-X}_m^2-(\text{Arg})_p$ a štěpí peptidový řetězec X_n^1-Arg , čímž odděluje řetězce A a B. Zpravidla sekvence X_n^1 začíná Arg, Arg_2 nebo vůbec není ($n=0$), takže po štěpení je

k dispozici derivát inzulínu, který je na C-konci řetězce B prodloužen o Arg nebo Arg₂. Tyto aminokyseliny mohou být odstraněny karboxypeptidázou B. Tryptické štěpení lze provést zvýšením koncentrace trypsinu nebo prodloužením reakční doby, takže je navíc štěpen Lysin(B29). V tomto případě vznikne derivát (B30)-inzulín. Inzulínové analogy získané štěpením je pak možné purifikovat standardními chromatografickými postupy (iontová výměnná chromatografie nebo chromatografie s reverzní fází) a nakonec izolovat vysrážením, krystalizací nebo jednoduše lyofilizací.

Prekurzor analogu inzulínu má výhodně sekvenci (sekvence id. č. 7)

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His 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
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

např. sekvenci His(B0)-preproinzulín, nebo sekvenci (sekvence id. č. 8)

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Ala 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
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

např. sekvenci desHis(B1),Ala(B0)-preproinzulín, nebo sekvenci (sekvence id. č. 9)

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
 His Ala Ala 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
 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

např. sekvenci desHis(B-2),Ala(B-1),Ala(B0)-preproinzulín.

Předkládaný vynález se dále týká prekursorů inzulínových analogů podle vynálezu, zejména preproinzulínu, sekvence DNA, která kóduje prekursor analogu inzulínu podle vynálezu, expresního vektoru, který obsahuje sekvenci DNA kódující prekursor analogu inzulínu podle vynálezu, a také se týká hostitelských buněk, které jsou transformované takovým expresním vektorem.

Dále se předkládaný vynález týká farmaceutického přípravku, který obsahuje alespoň jeden inzulínový analog podle vynálezu a/nebo alespoň jednu jeho fyziologicky přijatelnou sůl.

Farmaceutický přípravek podle vynálezu obsahuje analog inzulínu podle vynálezu a/nebo jeho fyziologicky přijatelnou sůl v rozpuštěné, amorfní nebo krystalické formě.

Farmaceutický přípravek podle vynálezu obsahuje případně pomocné depotní látky, např. protaminsulfát, přičemž analog inzulínu a/nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl je ve formě společně krystalizované např. s protaminsulfátem.

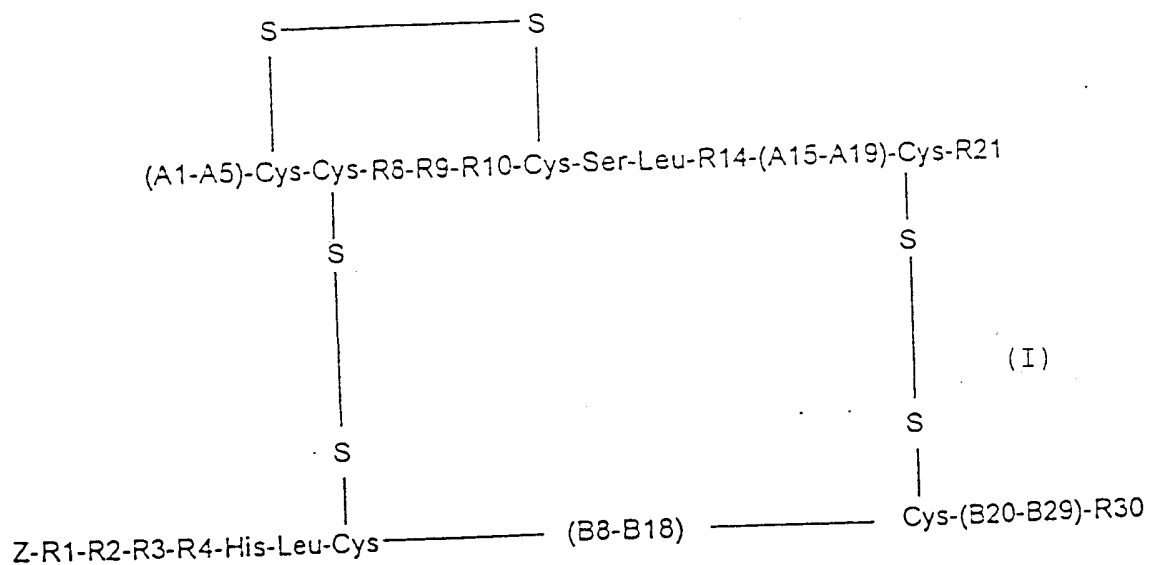
Farmaceutický přípravek podle vynálezu případně obsahuje

navíc nemodifikovaný humánní inzulin a/nebo další analogy inzulinu, např. Gly(A21)-Arg(B31)-Arg(B32)-humánní inzulin.

Předkládaný vynález se dále týká injikovatelného roztoku s inzulinovou aktivitou, který obsahuje farmaceutický přípravek podle vynálezu v rozpuštěné formě, s obsahem 1 µg až 2 mg zinku na 1 ml, zvláště výhodně s obsahem 5 µg až 200 µg zinku na 1 ml.

Vynález se dále týká použití analogů inzulinu a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí podle vynálezu pro výrobu farmaceutického přípravku, který projevuje inzulinovou aktivitu s opožděným nástupem účinku.

Cíl vynálezu byl dále splněn tím, že vynález poskytuje komplex inzulin-zinek, obsahující hexamer inzulinu a 4 až 10 iontů zinku na jeden hexamer, přičemž inzulinový hexamer obsahuje šest molekul analogů inzulinu podle vzorce I



kde

(A1-A5) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích A1 až A5

v řetězci A humánního (viz sekvence id. č. 1) nebo zvířecího inzulínu,

(A15-A19) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích A15 až A19 v řetězci A humánního (viz sekvence id. č. 1) nebo zvířecího inzulínu,

(B8-B18) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích B8 až B18 v řetězci B humánního (viz sekvence id. č. 2) nebo zvířecího inzulínu,

(B20-B29) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích B20 až B29 v řetězci B humánního (viz sekvence id. č. 2) nebo zvířecího inzulínu,

R8 je Thr nebo Ala,

R9 je Ser nebo Gly,

R10 je Ile nebo Val,

R14 je Tyr, His, Asp nebo Glu,

R21 je Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu nebo Gln,

R1 je libovolný geneticky kódovatelný aminokyselinový zbytek, nebo není přítomen, nebo je to atom vodíku,

R2 je Val, Ala nebo Gly,

R3 je Asn, His, Glu nebo Asp,

R4 je Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly nebo Glu,

R30 je libovolný geneticky kódovatelný aminokyselinový zbytek nebo -OH,

Z je atom vodíku nebo peptidový zbytek obsahující 1 až 4 geneticky kódovatelné aminokyselinové zbytky, z nichž 1 až 4 jsou histidinové zbytky (His).

Výhodně komplex inzulín-zinek obsahuje 5 až 8 iontů zinku na jeden inzulínový hexamer.

Výhodně komplex inzulín-zinek obsahuje inzulínový hexamer, který se skládá z šesti molekul analogu inzulínu podle výše uvedeného vzorce I podle vynálezu.

Komplex inzulin-zinek podle předkládaného vynálezu výhodně obsahuje řetězec B analogu inzulinu podle vzorce I, který má sekvenci (sekvence id. č. 10)

Phe Val His 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

např. His(B3)-humánní inzulin, nebo obsahuje řetězec B analogu inzulinu podle vzorce I, která má sekvenci (sekvence id. č. 11)

Phe Val Asp 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

např. Asp(B3)-humánní inzulin.

Předkládaný vynález se dále také týká farmaceutického přípravku, který obsahuje alespoň jeden komplex inzulin-zinek podle vynálezu a také farmaceutického přípravku, který obsahuje kyselý roztok alespoň jednoho analogu inzulinu a/nebo jeho fyziologicky přijatelné soli s odpovídajícím množstvím iontů zinku, které umožní vytvoření komplexu inzulin-zinek podle vynálezu, přičemž analog inzulinu a/nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl jsou výhodně výše uvedený analog podle vzorce I podle vynálezu nebo analog podle vzorce I, jehož řetězec B má sekvenci odpovídající sekvence id. č. 3, 4, 5, 10 nebo 11.

Farmaceutický přípravek podle vynálezu obsahuje komplex inzulin-zinek v rozpuštěné, amorfni a/nebo krystalické formě.

Předkládaný vynález se dále týká injikovatelného roztoku s inzulinovou aktivitou, který obsahuje farmaceutický přípravek podle vynálezu v rozpuštěné formě, s obsahem 1 µg až 2 mg zinku na 1 ml, zvláště výhodně s obsahem 5 µg až 200 µg zinku na 1 ml.

Vynález se dále týká použití analogů inzulínu a/nebo jejich fyziologicky přijatelných solí podle vynálezu pro výrobu farmaceutického přípravku, který projevuje inzulínovou aktivitu se zpožděným nástupem účinku.

Analogy inzulínu podle předkládaného vynálezu jsou biologicky aktivní a při subkutánní aplikaci slabě kyselého, čirého roztoku obsahujícího $80 \mu\text{g Zn}^{++}/\text{ml}$ (zinek/ml) psům projevují silně opožděný účinek. U analogů, kde je N-konec řetězce B prodloužen o histidin, tj. His(B0), např. des(B30)-humánní inzulín (sekvence id. č. 3), je účinný profil silně závislý např. na množství přidaných zinečnatých iontů. Přípravek neobsahující zinek nemá žádný depotní účinek (celkový účinek po 6 až 8 hodin, viz příklad 8) a sotva se farmakodynamikou liší od běžného humánního inzulínu, přičemž po přidání zinečnatých iontů ($80 \mu\text{g/ml}$) dochází k silnému opoždění/prodloužení účinku (celkový účinek po 16 hodin, viz příklad 8). Pozorovaný depotní účinek je také mnohem výraznější než u NPH-inzulínů. Tyto analogy mají tudíž výhodu, že farmakodynamika je prostřednictvím obsahu zinku široce regulovatelná, což u normálního humánního inzulínu není možné. Je možné také získat přípravky s rychlým nástupem účinku stejně tak jako přípravky se středně nebo silně opožděným účinkem prostřednictvím změn v obsahu zinku. Tím je také možné účinný profil přípravku upravit individuálním potřebám pacienta, a to buď použitím přípravku s odpovídajícím, předem nastaveným obsahem zinku, nebo smícháním přípravku s vysokým a nízkým obsahem zinku, které provede buďto lékař nebo sám pacient.

Analogy inzulínu podle vynálezu mají ve srovnání s humánním inzulínem zvýšenou afinitu k iontům zinku.

Humánní inzulín ve vodném neutrálním roztoku vytváří hexamery, které prostřednictvím His(B10)-postranního řetězce komplexují dva zinečnaté ionty. Tyto dva ionty nelze odstranit dialýzou proti vodnému neutrálnímu pufru. Za stejných podmínek váží analogy podle vynálezu více než 4 zinečnaté ionty. V případě His(B0)-des(B30)- a His(B3)-inzulínu je to 7 iontů zinku/hexamer a v případě Asp(B3)-inzulínu bylo naměřeno 4,2 iontů zinku/hexamer (viz příklad 9).

Je známo, že v neutrálním roztoku zinek vytváří vysokomolekulární shluky a vede k vysrážení inzulínu. Po injekci slabě kyselého přípravku obsahujícího zinek, který obsahuje čirý rozpuštěný inzulín, dojde v důsledku neutralizace v podkožní tkáni k vytvoření komplexů inzulín-zinek a následně k precipitaci inzulínu. Z tohoto depotu se inzulín zase postupně uvolňuje do roztoku a dochází tak ke zpoždění účinku. Takové zpomalení účinku je u humánního inzulínu velmi slabé, avšak u analogů inzulínu podle vynálezu k němu dochází na základě jejich zvýšené afinity k zinku. Zvýšená vazba zinku je tudíž základem výše popsaného opoždění účinku závislého na zinku.

Předkládaný vynález se tudíž netýká je výše popsaných analogů inzulínu, ale také příslušných komplexů inzulín-zinek. Tyto komplexy se odlišují od komplexů humánního inzulínu se zinkem v tom, že mají vyšší podíl pevně vázaného zinku. Je tedy nasnadě, že je možné k vytvoření komplexů kromě zinku užít také jiné ionty přechodných kovů jako je např. kobalt nebo měď.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Konstrukce plazmidu pINT345d, který kóduje variantu His(B3)-preproinzulínu

Patent USA č. 5358857 popisuje plazmid pINT90d. DNA tohoto plazmidu sloužila jako výchozí materiál ke konstrukci plazmidu pINT345d, který má proti původnímu plazmidu pINT90d dvě nové vlastnosti. Za prvé kóduje analog preproinzulínu, který v pozici 3 řetězce B obsahuje aminokyselinu histidin místo asparaginu a bezprostředně před počátkem kódující sekvence nese sekvenci rozpoznávanou restriční enzymem BssH2, takže sekvence kódující 10 aminokyselin N-konce preproinzulínu může být snadno použita pro genové manipulace, když se přihlédne k štěpnému místu Dra3 v sekvenci preproinzulínu.

Pro konstrukci plazmidu pINT345d byla DNA z plazmidu pINT90d po dvojitěm naštěpení v pozici 284 bp a pozici 351 bp restričními enzymy NcoI a Dra3 rozdělena, takže byly získány 2 fragmenty. Po elektroforetickém rozdělení štěpné směsi byl izolován velký DNA fragment zbytkového plazmidu.

Tento DNA fragment byl pak v reakci s T4-DNA-ligázou spojen s následujícím DNA fragmentem

½ NcoI	BssH2	B1	B2	His	B4	B5	B6
5'- C ATG GCA ACA ACA TCA ACA GGA AAT TCG GCG CGC TTT GTG CAC CAG CAC CTG							
3'- CGT TGT TGT AGT TGT CCT TTA AGC CGC GCG AAA CAC GTG GTC GTG GAC							

B7	B8	B9	½ Dra3
TGC	GGC	TCC	CAC CTA - 3'
ACG	CCG	AGG	GTG -5'

Ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* K12 a transformované buňky byly vysety na NA-plotny obsahující 20 mg/l ampicilinu. Plotny byly inkubovány přes noc při 37 °C. Ze vzniklých kolonií byla izolována plazmidová DNA a naštěpena restrikčním enzymem *BssH2*. Požadovaná DNA tím byla linearizována a tím se odlišila od DNA plazmidu pINT90d, která neobsahuje žádné štěpné místi pro *BssH2* a tudíž není štěpena.

Odpovídající plazmidová DNA ze správného klonu byla označena pINT345d.

Tato DNA byla použita jako výchozí materiál pro konstrukci variant preproinzulínu popsanych v následujících příkladech.

Příklad 2

Konstrukce plazmidu pINT342d, který kóduje variantu His(B0)-preproinzulínu

DNA z plazmidu pINT345d byla dvojitě naštěpena restrikčními enzymy *NcoI* a *Dra3* a po elektroforetickém rozdělení štěpné směsi byl izolován velký DNA fragment zbytkového plazmidu. Tento DNA fragment byl pak v reakci s T4-DNA-ligázou spojen s následujícím DNA fragmentem

	His B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10					
5'-	CG	CGC	CAC	TTT	GTT	AAC	CAG	CAC	CTG	TGC	GGC	TCC	CAC	CTA	- 3'
3'-		G	GTG	AAA	CAA	TTG	GTC	GTG	GAC	ACG	CCG	AGG	GTG		- 5'
	½ <i>BssH2</i>					½ <i>HpaI</i>									½ <i>Dra3</i>

Vznikl tak plazmid pINT324d, který se od výchozího plazmidu liší štěpným místem *HpaI*. Tento plazmid kóduje

variantu preproinzulínu, která obsahuje v pozici B0 histidin.

Příklad 3

Konstrukce plazmidu pINT343d, který kóduje variantu His(B1),Ala(B0)-preproinzulínu

DNA fragment zbytkového plazmidu z předchozího příkladu byl v reakci s T4-DNA-ligázou spojen s následujícím DNA fragmentem

	His	Ala	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11		
5'-	CG	CGC	CAC	GCT	TTT	GTT	AAC	CAG	CAC	CTG	TGC	GGC	TCC	CAC	CTA - 3'
3'-		G	GTG	CGA	AAA	CAA	TTG	GTC	GTG	GAC	ACG	CCG	AGG	GTG	- 5'
	↳ BssH2						↳ Hpa1								↳ Dra3

Vznikl tak plazmid pINT343d, který se, stejně jako plazmid pINT342d, liší od výchozího plazmidu dodatečným štěpným místem Hpa1.

Příklad 4

Konstrukce plazmidu pINT344d, který kóduje variantu His(B-2),Ala(B-1), Ala(B0)-preproinzulínu

DNA fragment zbytkového plazmidu z příkladu 2 byl v reakci s T4-DNA-ligázou spojen s následujícím DNA fragmentem

	His	Ala	Ala	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11		
5'-	CG	CGC	CAC	GCT	GCT	TTT	GTT	AAC	CAG	CAC	CTG	TGC	GGC	TCC	CAC	CTA - 3'
3'-		G	GTG	CGA	CGA	AAA	CAA	TTG	GTC	GTG	GAC	ACG	CCG	AGG	GTG	- 5'
	↳ BssH2										↳ Hpa1					↳ Dra3

Vznikl tak plazmid pINT344d, který se liší od výchozího vektoru dodatečným štěpným místem *Hpa*I.

Příklad 5

Expres konstruktů kódujících varianty inzulínu

Plazmidy pINT342d, 343d a 344d byly transformovány do buněk *E. coli* K12 W3110. Rekombinantní bakterie, které byly získány pro každou variantu, byly fermentovány podle příkladu 4 z patentu USA č. 5227293 a byla tak získána požadovaná výchozí surovina pro každou z inzulínových variant.

Příklad 6

Příprava His(B0),des(B30)-inzulínu

Varianty proinzulínu byly exprimovány v *E. coli* podle příkladu 5 a pak izolovány ve formě inkluzních tělísek centrifugací po rozrušení buněk. Inkluzní tělíska byla rozpuštěna v močovíně (8 mol/l), podrobena sulfitolýze a pak přečištěna pomocí aniontové výměnné chromatografie (na Q-Sepharose) a gelové permeační chromatografie (na Sephacryl S 200). Pufr použitý pro chromatografii obsahoval 4M močovinu a 50mM Tris/HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl), pH 8,5. Následovala frakcionovaná eluce z iontoměniče pomocí gradientu 0 až 0,5 M NaCl. Koncentrace močoviny byla nakonec ultrafiltrací a ředěním snížena na hodnotu nižší než 1M a preproinzulín-S-sulfonát byl izolován vysrážením při pH 4,

a nakonec byl precipitát vysušen.

Pro vytvoření správných disulfidických můstků, které existují v přírodním inzulinu, byl preproinzulín-S-sulfonát v koncentraci 0,3 g/l rozpuštěn v pufru obsahujícím 20mM glycin při pH 10,8, doplněn merkptoetanolem (asi 25 až 50 mol/mol preproinzulínu) a míchán po celou noc při 4 °C. Vzorek byl nakonec pomocí kyseliny fosforečné upraven na pH 3,5 a centrifugován. Preproinzulín obsažený v supernatantu byl pak úpravou pH na 8,2 přidavkem Tris (25mM) a poté přidáním trypsinu (1,5 mg/g preproinzulínu) převeden na inzulin. Průběh proteolytického štěpení byl sledován pomocí HPLC s reverzní fází. Asi po 6 hodinách obsahoval vzorek vysoký podíl His(B0),des(B30)-inzulinu. Reakce byla ukončena okyselením na pH 3,5. Pak pokračovalo čištění analogů inzulinu pomocí iontové výměnné chromatografie (S-hyper-D, Sepracor) a chromatografie s reverzní fází (PLRP-S RP300, Polymer Laboratories). Iontová výměnná chromatografie se prováděla v pufru, který obsahoval 30% 2-proanol a 50mM kyselinu mléčnou (pH 3,5). Eluce navázaného inzulinu byla provedena pomocí lineárního gradientu 0 až 0,5M NaCl. Chromatografie s reverzní fází probíhala v 0,1% trifluoroctové kyselině, která se pro eluci míchala s rostoucím množstvím acetonitrilu. Produkt byl izolován vysrážením při pH 5,4 a pak lyofilizován.

Příklad 7

Formulace analogů inzulinu pro parenterální podávání

Přípravek podle vynálezu obsahuje 40, popřípadě 100 IE inzulinu (1 IE odpovídá přibližně 6,2 nmol), 20 mg 85%

glycerinu, 2,7 mg m-kresolu a případně zinek⁺⁺ (jako chlorid zinečnatý) ve vodném sterilním roztoku s pH 4.

Příklad 8

Účinný profil His(B0),des(B30)-inzulínu u psů

Každý ze šesti psů (Beagl) dostal subkutánní injekci přípravku se 40 U/ml (přípravek z příkladu 7) a udaným množstvím zinku. Dávka byla 0,3 IE/kg. V dalším průběhu pokusu byla v daných časových okamžicích měřena hladina glukózy v krvi. Hodnoty byly normovány v procentech ke každé výchozí hodnotě a vyneseny do následující tabulky.

ČAS (hod.)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
bez Zn	100	59	50	61	75	84	89	98	103	97	104	100
80 µg Zn ⁺⁺ /ml	100	97	83	75	65	56	51	58	68	72	78	82

Příklad 9

Vazba zinku analogy inzulínu

Inzulínový přípravek (0,3mM inzulín, 0,13M NaCl, 0,1% Fenol, 100 µg/ml zinek⁺⁺ (jako chlorid zinečnatý), 25mM Tris/HCl, pH 7,4) byl extenzivně dialyzován proti neutrálnímu pufru bez zinku (3 hodin proti 0,15M NaCl, 10mM Tris/HCl pH 7,4 při teplotě místnosti, 72 hodin proti 10mM Tris/HCl pH 7,4 při 15 °C a ještě 16 hodin proti 10mM Tris/HCl pH 7,4

při 15 °C. Poté by dialyzát odsát a analyzován. Koncentrace inzulínu byla stanovena pomocí HPLC s reverzní fází a koncentrace zinku byla stanovena atomovou absorpční spektroskopií. Hodnoty pro zinek byly korigovány podle obsahu zinku kontrolních vzorků, které neobsahovaly žádný inzulín.

Vázání zinku variantami inzulínu

Inzulín	mol Zn/mol hexamerů
humánní inzulín	2,5
His(B3)-inzulín	6,9
Asp(B3)-inzulín	4,2
His(B0),des(B30)-inzulín	6,8

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 21 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselinový
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: protein
- (ix) DALŠÍ ZNAKY:
 - (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: protein
 - (B) POZICE: 1...21
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S I

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) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 30 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselinový
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: protein
- (ix) DALŠÍ ZNAKY:
 - (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: protein
 - (B) POZICE: 1...30
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S I

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) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DĚLKA: 30 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselinový
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: protein

- 25 -

- (ix) DALŠÍ ZNAKY:
 (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: protein
 (B) POZICE: 1...30

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 3:

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

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

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 31 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyseliny
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

- (ix) DALŠÍ ZNAKY:
 (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: protein
 (B) POZICE: 1...31

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 4:

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

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

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 32 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyseliny
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

- (ix) DALŠÍ ZNAKY:
 (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: protein
 (B) POZICE: 1...32

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 5:

04.12.00

- 27 -

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

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

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

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

Cys Asn

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 99 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyseliny
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: protein
- (B) POZICE: 1...99

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 8:

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

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

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

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

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

Tyr Cys Asn

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 100 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyseliny
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: protein
- (B) POZICE: 1...100

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 9:

```

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

```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyseliny
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: protein
- (B) POZICE: 1...30

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

Phe	Val	His	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) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 30 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyseliny
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

- (ix) DALŠÍ ZNAKY:
 (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: protein
 (B) POZICE: 1...30

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

Phe	Val	Asp	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		

04.12.00

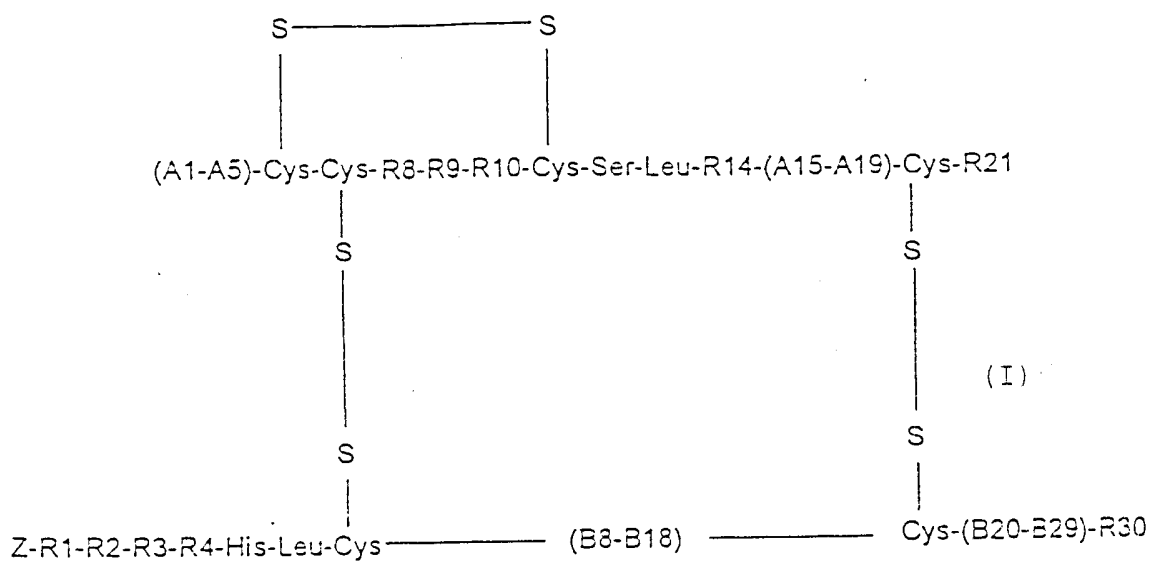
PV 2000-455

85732

- 30 -

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Analog inzulínu, nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl, který má vzorec I



kde

(A1-A5) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích A1 až A5 v řetězci A humánního nebo zvířecího inzulínu,

(A15-A19) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích A15 až A19 v řetězci A humánního nebo zvířecího inzulínu,

(B8-B18) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích B8 až B18 v řetězci B humánního nebo zvířecího inzulínu,

(B20-B29) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích B20 až B29 v řetězci B humánního nebo zvířecího inzulínu,

R8 je Thr nebo Ala,

R9 je Ser nebo Gly,

R10 je Ile nebo Val,

R14 je Tyr, His, Asp nebo Glu,

R21 je Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu nebo Gln,

R1 je libovolný geneticky kódovatelný aminokyselinový

- zbytek, nebo není přítomen, nebo je to atom vodíku,
- R2 je Val, Ala nebo Gly,
- R3 je Asn, His, Glu nebo Asp,
- R4 je Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly nebo Glu,
- R30 je libovolný geneticky kódovatelný aminokyselinový zbytek nebo -OH,
- Z je atom vodíku nebo peptidový zbytek s 1 až 4 geneticky kódovatelnými aminokyselinovými zbytky, obsahující 1 až 4 histidinové zbytky (His),

příčemž platí podmínky, že v případě, kdy Z je atom vodíku, R1 nebo R3 jsou His, Glu nebo Asp, příčemž R3 je His, když R1 je neutrální nebo negativně nabitá aminokyselina, nebo platí, že v případě, kdy Z je atom vodíku, R14 je His, Asp nebo Glu,

a dále platí podmínka, že analog inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle vzorce I se neodlišuje od humánního inzulinu pouze samotnými změnami aminokyselinových zbytků v pozici R3 nebo společně v pozicích R3 a R21 nebo společně v pozicích R3 a R4 podle vzorce I.

2. Analog inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 1, kde R8 je Thr, R9 je Ser a R10 je Ile.

3. Analog inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 1 nebo 2, kde R1 je Phe, His, Asn, Asp nebo Gly.

4. Analog inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde R30 je Thr, Ala nebo Ser.

5. Analog inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl.

podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, kde R21 je Asn a R1 je Phe.

6. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, kde R2 je Val, R3 je Asn a R4 je Gln.

7. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, kde R14 je Tyr.

8. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, kde R14 je His.

9. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, kde R14 je Asp.

10. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, kde R14 je Glu.

11. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, kde R30 je Thr.

12. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, kde R30 je Ala.

13. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, kde R30 je Ser.

14. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, kde R30 je -OH.

15. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl.

podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14, kde Z je His.

16. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14, kde Z je His-Ala.

17. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14, kde Z je His-Ala-Ala.

18. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 15, kde řetězec B má sekvenci (sekvence id. č. 3):

His 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

19. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 15, kde řetězec B má sekvenci (sekvence id. č. 4):

His 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

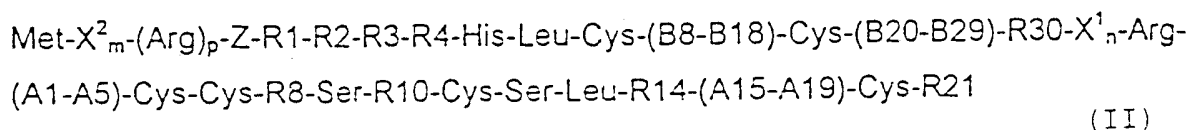
20. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 16, kde řetězec B má sekvenci (sekvence id. č. 5):

His Ala 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

21. Analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl podle nároku 17, kde řetězec B má sekvenci (sekvence id. č. 6):

His Ala Ala 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

22. Způsob přípravy analogu inzulinu nebo jeho fyziologicky přijatelné soli podle kteréhokoliv z nároků 1 až 21 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky konstrukce replikovatelného expresního vektoru, který obsahuje sekvenci DNA, která kóduje prekursor analogu inzulinu s obecnou aminokyselinovou sekvencí podle vzorce II:



kde

$X}_{\text{n}}^1$ je peptidový řetězec obsahující n aminokyselinových zbytků, přičemž n je celé číslo 0 až 34,

$X}_{\text{m}}^2$ peptidový řetězec obsahující m aminokyselinových zbytků, přičemž n je celé číslo 0 až 20,

p je 0, 1 nebo 2,

R30 je libovolný, geneticky kódovatelný aminokyselinový zbytek, nebo chybí, a

Z buďto chybí nebo je to peptidový zbytek s 1 až 4 geneticky kódovatelnými aminokyselinami obsahující 1 až 4 histidinových zbytků (His)

a zbývající proměnné mají stejný význam jako v nároku 1, přičemž platí i pravidla z nároku 1,

a dále způsob obsahuje krok exprese v hostitelských buňkách a uvolnění analogu inzulinu z jeho prekursoru chemickými a/nebo enzymatickými metodami.

23. Způsob podle nároku 22 v y z n a č u j í c í s e t í m, že hostitelská buňka je bakterie.

24. Způsob podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že bakterie je *E. coli*.

25. Způsob podle nároku 22 v y z n a č u j í c í s e t í m,
že hostitelská buňka je kvasinka.

26. Způsob podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m,
že kvasinka je *Saccharomyces cerevisiae*.

27. Způsob podle nároku 22 až 26 přípravy analogu inzulínu
podle nároku 19 v y z n a č u j í c í s e t í m, že
prekurzor analogu inzulínu má sekvenci (sekvence id.
č. 7):

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His 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
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

28. Způsob podle nároku 22 až 26 přípravy analogu inzulínu
podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že
prekurzor analogu inzulínu má sekvenci (sekvence id.
č. 8):

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Ala 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
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

29. Způsob podle nároku 22 až 26 přípravy analogu inzulínu podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že prekurzor analogu inzulínu má sekvenci (sekvence id. č. 9):

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Ala Ala 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
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

30. Prekurzor analogu inzulínu podle nároku 22.

31. Prekurzor analogu inzulínu podle nároku 27.

32. Prekurzor analogu inzulínu podle nároku 28.

33. Prekurzor analogu inzulínu podle nároku 29.

34. Sekvence DNA, která kóduje prekuzor analogu inzulínu podle nároku 30.

35. Sekvence DNA, která kóduje prekuzor analogu inzulínu podle nároku 31.

36. Sekvence DNA, která kóduje prekuzor analogu inzulínu podle nároku 32.

37. Sekvence DNA, která kóduje prekuzor analogu inzulínu podle nároku 33.

38. Expresní vektor obsahující sekvenci DNA podle nároku 34.
39. Expresní vektor obsahující sekvenci DNA podle nároku 35.
40. Expresní vektor obsahující sekvenci DNA podle nároku 36.
41. Expresní vektor obsahující sekvenci DNA podle nároku 37.
42. Hostitelské buňka, která je transformována expresním vektorem podle kteréhokoliv z nároků 38 až 41.
43. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň jeden analog inzulínu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 21 a/nebo alespoň jednu jeho fyziologicky přijatelnou sůl.
44. Farmaceutický přípravek podle nároku 43 v y z n a č u j í c í s e t í m, že analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl je v rozpuštěné, amorfní a/nebo krystalické formě.
45. Farmaceutický přípravek podle nároku 43 nebo 44 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje depotní pomocné látky.
46. Farmaceutický přípravek podle nároku 45 v y z n a č u j í c í s e t í m, že depotní pomocná látka je protaminsulfát, přičemž analog inzulínu nebo jeho fyziologicky přijatelná sůl tvoří s protaminsulfátem společný krystalizát.
47. Farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 43 až .

46 v y z n a č u j í c í s e t í m, že navíc obsahuje nemodifikovaný humánní inzulín.

48. Farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 43 až 47 v y z n a č u j í c í s e t í m, že navíc obsahuje analog inzulínu.

49. Farmaceutický přípravek podle nároku 48 v y z n a č u j í c í s e t í m, že analog inzulínu je Gly(A21)-Arg(B31)-Arg(B32)-humánní inzulín.

50. Injektivatelný roztok s inzulinovou aktivitou v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 43 až 49 v rozpuštěné formě.

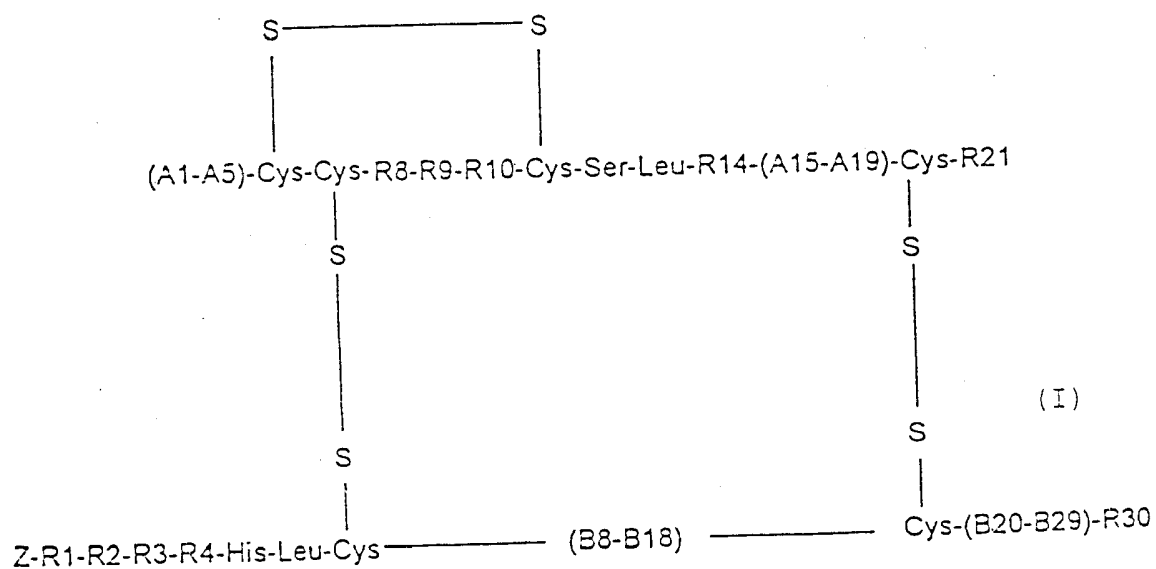
51. Injektivatelný roztok podle nároku 50 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 1 µg až 2 mg zinku na 1 ml.

52. Injektivatelný roztok podle nároku 51 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 5 µg až 200 µg zinku na 1 ml.

53. Použití analogu inzulínu a/nebo jeho fyziologicky přijatelné soli podle kteréhokoliv z nároků 1 až 21 k výrobě farmaceutického přípravku, který projevuje inzulinovou aktivitu s opožděným nástupem účinku.

54. Komplex inzulin-zinek, který obsahuje inzulinový hexamer a 4 až 10 zinečnatých iontů na každý inzulinový hexamer, přičemž inzulinový hexamer sestává ze šesti molekul

analogu inzulínu podle vzorce I



kde

(A1-A5) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích A1 až A5 řetězce A humánního nebo zvířecího inzulínu,

(A15-A19) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích A15 až A19 řetězce A humánního nebo zvířecího inzulínu,

(B8-B18) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích B8 až B18 řetězce B humánního nebo zvířecího inzulínu,

(B20-B29) znamená aminokyselinové zbytky v pozicích B20 až B29 řetězce B humánního nebo zvířecího inzulínu,

R8 je Thr nebo Ala,

R9 je Ser nebo Gly,

R10 je Ile nebo Val,

R14 je Tyr, His, Asp nebo Glu,

R21 je Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu nebo Gln,

R1 je libovolný geneticky kódovatelný aminokyselinový zbytek, nebo není přítomen, nebo je to atom vodíku,

R2 je Val, Ala nebo Gly,

R3 je Asn, His, Glu-nebo Asp,

- R4 je Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly nebo Glu,
 R30 je libovolný geneticky kódovatelný aminokyselinový zbytek nebo -OH,
 Z je atom vodíku nebo peptidový zbytek s 1 až 4 geneticky kódovatelnými aminokyselinovými zbytky, obsahující 1 až 4 histidinové zbytky (His).

55. Komplex inzulin-zinek podle nároku 54, který obsahuje 5 až 8 zinečnatých iontů na každý inzulinový hexamer.

56. Komplex inzulin-zinek podle nároku 54 nebo 55, kde inzulinový hexamer sestává ze šesti molekul analogu inzulinu podle vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 21.

57. Komplex inzulin-zinek podle nároku 54 nebo 55, kde řetězec B analogu inzulinu podle vzorce I má sekvenci (sekvence id. č. 10):

Phe Val His 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

58. Komplex inzulin-zinek podle nároku 54 nebo 55, kde řetězec B analogu inzulinu podle vzorce I má sekvenci (sekvence id. č. 11):

Phe Val Asp 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

59. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň jeden komplex inzulin-zinek podle kteréhokoliv z nároků 54 až 58.

60. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m,

že obsahuje kyselý roztok alespoň jednoho analogu inzulínu podle kteréhokoliv z nároků 54 až 58 a/nebo jeho fyziologicky přijatelné soli společně s odpovídajícím množstvím zinečnatých iontů, které umožní vznik komplexu inzulín-zinek podle kteréhokoliv z nároků 54 až 58.

61. Farmaceutický přípravek podle nároku 60
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kyselý roztok alespoň jednoho analogu inzulínu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 21 a/nebo jeho fyziologicky přijatelné soli společně s odpovídajícím množstvím zinečnatých iontů, které umožní vznik komplexu inzulín-zinek podle nároku 56.

62. Farmaceutický přípravek podle nároku 60
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kyselý roztok alespoň jednoho analogu inzulínu podle nároku 57 nebo 58 a/nebo jeho fyziologicky přijatelné soli společně s odpovídajícím množstvím zinečnatých iontů, které umožní vznik komplexu inzulín-zinek podle nároku 57 nebo 58.

63. Farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 59 až 62 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje komplex inzulín-zinek v rozpuštěné, amorfni a/nebo krystalické formě.

64. Injikovatelný roztok s inzulínovou aktivitou
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje farmaceutický přípravek podle nároku 63 v rozpuštěné formě.

65. Injikovatelný roztok podle nároku 64
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 1 µg až

2 mg zinku na 1 ml.

66. Injektivatelný roztok podle nároku 65
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 5 µg až
200 µg zinku na 1 ml.

67. Použití komplexu inzulin-zinek podle kteréhokoliv z nároků
54 až 58 k výrobě farmaceutického přípravku, který
projevuje inzulinovou aktivitu s opožděným nástupem
účinku.