

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034393**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.03

(21) Номер заявки
201590944

(22) Дата подачи заявки
2013.11.13

(51) Int. Cl. *A61K 38/28* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

(54) СОСТАВ ИНСУЛИНА БЫСТРОГО ДЕЙСТВИЯ, СОДЕРЖАЩИЙ ЗАМЕЩЕННОЕ АНИОННОЕ СОЕДИНЕНИЕ

(31) 12/60808; 61/725,775; 12/60855;
61/726,349
(32) 2012.11.13; 2012.11.13; 2012.11.14;
2012.11.14
(33) FR; US; FR; US
(43) 2016.05.31
(86) PCT/FR2013/052736
(87) WO 2014/076423 2014.05.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АДОСИА (FR)

(72) Изобретатель:
Сула Оливье, Сула Жерар, Доти
Эммануэль, Шарве Ришар (FR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2010249020
BAUDYS M. ET AL.: "Extending insulin
action in vivo by conjugation to carboxymethyl
dextran", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS,
WASHINGTON, DC, US, vol. 9, no. 2, 5 February
1998 (1998-02-05), pages 176-183, XP002363506,
ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC970180A, the
whole document
WO-A1-2013064787

(57) Изобретение относится к композиции в водном растворе, содержащей инсулин и по меньшей мере одно анионное замещенное соединение, выбранное из анионных замещенных соединений, состоящих из остова, образованного дискретным числом u в диапазоне от 1 до 8 ($1 \leq u \leq 8$) одинаковых или разных сахаридных звеньев, связанных одинаковыми или разными гликозидными связями, где указанные сахаридные звенья выбраны из группы, состоящей из гексоз в циклической форме или открытой восстановленной форме, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, является солеобразующим. Изобретение также относится к фармацевтическому составу, содержащему композицию по любому из предшествующих пунктов формулы.

B1**034393****034393****B1**

Настоящее изобретение относится к составу инсулина быстрого действия.

С момента получения инсулина путем генетической инженерии с начала 80-х гг. пациенты с диабетом используют инсулин человека для лечения. Этот продукт существенно улучшил эту терапию вследствие того, что устраняются иммунологические риски, связанные с использованием не принадлежащего человеку инсулина, в частности свиного инсулина. Однако инсулин человека, инъеклируемый подкожным путем, оказывает гипогликемизирующее действие только через 60 мин, что приводит к тому, что пациенты с диабетом, получающие лечение инсулином человека, должны проводить инъекцию за 30 мин до приема пищи.

Одна из проблем, которую предстоит решить для улучшения состояния здоровья и удобства страдающих диабетом пациентов, заключается в получении составов инсулина, которые позволяют получать более быстрый гипогликемизирующий ответ, чем гипогликемизирующий ответ инсулина человека, по возможности приближаясь к физиологической реакции здорового индивидуума. Секреция эндогенного инсулина у здорового индивидуума непосредственно инициируется повышением гликемии. Целью является сведение к минимуму периода времени между инъекцией инсулина и началом приема пищи.

В настоящее время признано, что получение таких составов является необходимым как можно для более эффективного лечения заболевания.

Генная инженерия позволила выработать решение за счет разработки быстродействующих инсулинов-аналогов. Такие инсулины модифицируют по одной или двум аминокислотам для того, чтобы они быстрее всасывались в кровяное русло после подкожной инъекции. Такие инсулины лизпро (Humalog®, Lilly), аспарт (Novolog®, Novo) и глулизин (Apidra®, Sanofi Aventis) представляют собой стабильные растворы инсулина с более быстрым гипогликемизирующим ответом, чем гипогликемизирующий ответ инсулина человека. Таким образом, пациенты, получающие лечение такими быстродействующими инсулинами-аналогами, могут проводить инъекцию инсулина лишь за 15 мин до приема пищи.

Принцип действия быстродействующих инсулинов-аналогов заключается в образовании гексамеров в концентрации 100 МЕд./мл для обеспечения стабильности инсулина в коммерческом продукте, при этом способствуя очень быстрой диссоциации таких гексамеров на момеры после подкожной инъекции для получения быстрого действия.

Инсулин человека, такой как составленный в его коммерческой форме, не позволяет получать гипогликемизирующего ответа, близкого по кинетике физиологической реакции, возникающей в начале приема пищи (повышение гликемии), т.е. в используемых концентрациях (100 МЕд./мл) в присутствии цинка и других эксципиентов, таких как фенол или мета-крезол, он собирается в форме гексамера, тогда как он является активным в форме мономера и димера. Инсулин человека получают в форме гексамеров для того, чтобы он являлся стабильным приблизительно 2 года при 4°C, так как в форме мономеров он обладает большой склонностью к агрегации, затем к образованию фибрилл, что вызывает потерю его активности. Кроме того, в такой агрегированной форме он представляет иммунологическую опасность для пациента.

Диссоциации гексамеров до димеров и димеров до мономеров замедляет его действие приблизительно на 20 мин по сравнению с быстродействующим аналогом инсулина (Brange J. et al., *Advanced Drug Delivery Review*, 35, 1999, 307-335).

Кроме того, кинетика поступления инсулинов-аналогов в кровь, так же как их кинетика снижения гликемии, не являются оптимальными, и существует насущная потребность в составе, обладающем еще более коротким временем действия, для того, чтобы приблизиться к видам кинетики секреции эндогенного инсулина у здоровых пациентов.

Компанией Bidel было предложено решение этой проблемы с использованием состава инсулина человека, содержащего EDTA и лимонную кислоту, такого как описанный в патентной заявке US200839365. EDTA вследствие ее способности образовывать комплексы с атомами цинка и лимонная кислота вследствие ее взаимодействий с катионными участками, представленными на поверхности инсулина, описаны как дестабилизирующие гексамерную форму инсулина и, таким образом, уменьшающие ее время действия.

Однако такой состав обладает, в частности, таким недостатком, как диссоциация гексамерной формы инсулина, являющейся единственной стабильной формой, которая может отвечать требованиям стабильности фармацевтических норм.

Также известна заявка PCT WO 2010/122385 на имя заявителя, в которой описаны составы инсулина человека или инсулина-аналога и которая позволяет решать разные указанные выше проблемы путем добавления замещенного полисахарида, содержащего карбоксильные группы.

Однако потребности, возникающие в результате длительного и интенсивного использования и даже использования в педиатрии таких составов, приводят специалиста в данной области к поиску эксципиентов, молекулярная масса и размер которых являются как можно более сниженными, для облегчения элиминации.

Полисахариды, описанные в заявках WO 2010/122385A1 и US 2012/094902A1 в качестве эксципиентов, представляют собой соединения, состоящие из цепей, длина которых является статистически пе-

ременной и которые содержат большое разнообразие возможных участков взаимодействия с активными белковыми веществами. Такое разнообразие может приводить к недостатку специфичности в отношении взаимодействия, и в этом случае меньшая и лучше определенная молекула может обеспечивать конкретное преимущество.

Кроме того, молекулу с хорошо определенным остовом, как правило, легче отслеживать (например, MS/MS) в биологических средах во время фармакокинетических исследований или ADME (введения, распределения, метаболизм, элиминации) по отношению к полимеру, который, как правило, дает очень рассеянный и шумный сигнал при масс-спектрометрии.

И наоборот, не исключена возможность того, что хорошо определенная и более короткая молекула может предоставлять недостаточно возможных участков взаимодействия с активными белковыми веществами. Это объясняется тем, что вследствие своего уменьшенного размера они не обладают теми же самыми свойствами, как полимеры типа полисахарида, так как существует потеря полимерного эффекта, как это продемонстрировано в сравнительных примерах экспериментальной части, в частности, см. испытания солубилизации инсулина в изoeлектрической точке и испытания взаимодействия с модельным белком, таким альбумин.

Несмотря на эти не обнадеживающие результаты, заявителю удалось разработать составы, способные ускорять действие инсулина с использованием анионного замещенного соединения в сочетании с полианионным соединением.

Кроме того, как и в случае использования полисахаридов, гексамерная природа инсулина не нарушается, таким образом, стабильность составов не нарушается, как это к тому же подтверждено примерами состояния ассоциации инсулина человека и инсулина-аналога в круговом дихроизме в присутствии анионного замещенного соединения по изобретению.

Настоящее изобретение позволяет решать указанные выше разные проблемы, так как, в частности, оно позволяет получать состав инсулина человека или инсулина-аналога, способный после введения ускорять поступление инсулина человека или его аналогов в кровь и быстрее снижать гликемию по сравнению с соответствующими коммерческими продуктами инсулина.

Изобретение относится к композиции, водному раствору, содержащему инсулин в гексамерной форме, по меньшей мере, анионное замещенное соединение и неполимерное полианионное соединение.

Под "анионным замещенным соединением" подразумевают соединения, состоящие из сахаридного остова, образованного дискретным числом u в диапазоне от 1 до 8 ($1 \leq u \leq 8$) одинаковых или разных сахаридных звеньев, связанных одинаковыми или разными гликозидными связями, где указанные сахаридные звенья выбраны из группы, состоящей из гексоз, в циклической форме или в восстановленной открытой форме, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, можно переводить в соль.

В одном из вариантов осуществления инсулин находится в гексамерной форме.

В одном из вариантов осуществления инсулин представляет собой инсулин человека.

Под инсулином человека подразумевают инсулин, получаемый синтезом или рекомбинацией, пептидная последовательность которого представляет собой последовательность инсулина человека, включая аллельные варианты и гомологи.

В одном из вариантов осуществления инсулин представляет собой рекомбинантный инсулин человека, такой как описанный в европейской Фармакопее и Фармакопее США.

В одном из вариантов осуществления инсулин представляет собой инсулин-аналог.

Под инсулином-аналогом подразумевают рекомбинантный инсулин, первичная последовательность которого содержит по меньшей мере одну модификацию по сравнению с первичной последовательностью инсулина человека.

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог выбирают из группы, состоящей из инсулина лизпро (Humalog®), инсулина аспарт (Novolog®, Novorapid®) и инсулина глулизин (Apidra®).

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог представляет собой инсулин лизпро (Humalog®).

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог представляет собой инсулин аспарт (Novolog®, Novorapid®).

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог представляет собой инсулин глулизин (Apidra®).

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение выбирают из анионных замещенных соединений в выделенной форме или в смеси, состоящих из остова, образованного дискретным числом u в диапазоне от 1 до 8 ($1 \leq u \leq 8$) одинаковых или разных сахаридных звеньев, связанных одинаковыми или разными гликозидными связями, где указанные сахаридные звенья выбраны из группы, состоящей из гексоз, в циклической форме или открытой восстановленной форме, отличающейся тем, что они являются замещенными:

а) по меньшей мере одним заместителем общей формулы I



где заместители являются одинаковыми или разными заместителями, когда содержится по меньшей мере два заместителя,

радикал $-\text{[AA]}$ означает аминокислотный остаток,

радикал $-\text{R}_1$ - представляет собой

или связь, тогда $a=0$ и аминокислотный остаток $-\text{[AA]}$ непосредственно связан с остовом функциональной группой G,

или углеродную цепь $\text{C}_2\text{-C}_{15}$, тогда $a=1$, необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и по меньшей мере одну кислотную функциональную группу до взаимодействия с аминокислотой, где указанная цепь образует с аминокислотным остатком $-\text{[AA]}$ функциональную амидную группу и соединена с остовом с помощью функциональной группы F, что приводит к взаимодействию между функциональной гидроксильной группой, находящейся на остове, и функциональной группой или заместителем, который несет предшественник радикала $-\text{R}_1$,

F представляет собой функциональную группу, выбранную из эфирной, сложноэфирной или карбаматной функциональных групп,

G представляет собой карбаматную функциональную группу,

m равно 1 или 2,

где степень замещения сахаридных звеньев j в $-\text{[R}_1\text{]}_a\text{[AA]}_m$ является строго больше 0 и больше или равна 6, $0 < j \leq 6$; и

b) необязательно, одним или несколькими заместителями - R'_1 ,

где заместитель $-\text{R}'_1$ представляет собой углеродную цепь $\text{C}_2\text{-C}_{15}$, необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и, по меньшей мере, кислотную функциональную группу в форме соли катионов щелочных металлов, где указанная цепь является связанной с остовом функциональной группой F', что приводит к взаимодействию между функциональной гидроксильной группой, содержащейся на остове, и функциональной группой или заместителем, который несет предшественник заместителя $-\text{R}'_1$;

F' представляет собой эфирную, сложноэфирную или карбаматную функциональную группу,

степень замещения сахаридных звеньев i в $-\text{R}'_1$ находится в диапазоне от 0 до 6-j, $0 \leq i \leq 6-j$, и

F и F' являются одинаковыми или разными,

F и G являются одинаковыми или разными,

$i+j \leq 6$;

$-\text{R}'_1$ является одинаковым или отличным от $-\text{R}_1$;

солеобразующие свободные кислотные функциональные группы, которые несет заместитель $-\text{R}'_1$, находятся в форме солей катионов щелочных металлов,

указанные одинаковые или разные гликозидные связи выбраны из группы, состоящей из гликозидных связей типа (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) или (1,6), в альфа- или бета-положении.

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение в выделенной форме или в смеси выбрано из анионных замещенных соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом u в диапазоне от 1 до 8 ($1 \leq u \leq 8$), одинаковых или разных сахаридных звеньев, связанных одинаковыми или разными гликозидными связями, где указанные сахаридные звенья выбраны из гексоз в циклической форме или открытой восстановленной форме, отличающихся тем, что:

a) они являются статистически замещенными:

по меньшей мере одним заместителем общей формулы I:



где заместители являются одинаковыми или разными, когда содержится по меньшей мере два заместителя;

радикал $-\text{[AA]}$ означает аминокислотный остаток, где указанная аминокислота выбрана из группы, состоящей из фенилаланина, альфа-метилфенилаланина, 3,4-дигидрофенилаланина, тирозина, альфа-метилтирозина, O-метилтирозина, альфа-фенилглицина, 4-гидроскифенилглицина, 3,5-дигидроксифенилглицина и солей катионов щелочных металлов, где указанные производные находятся в абсолютной L- или D-конфигурации, $-\text{[AA]}$ соединен с остовом молекулы посредством промежуточного соединения плеча связи $-\text{R}_1$ - или непосредственно связан с остовом посредством функциональной группы G;

$-\text{R}_1$ - представляет собой

или связь G, тогда $a=0$,

или углеродную цепь $\text{C}_2\text{-C}_{15}$, тогда $a=1$, необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и несущую по меньшей мере одну кислотную функциональную группу до взаимодействия с аминокислотой, где указанная цепь образует с аминокислотным остатком $-\text{[AA]}$ амидную связь и присоединена к сахаридному остову с помощью функциональной группы F, что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы, содержащейся на остове, с функциональной группой, которую несет предшественник R_1 ;

F представляет собой эфирную, сложноэфирную или карбаматную функциональную группу;

G представляет собой карбаматную функциональную группу;

m равно 1 или 2,

где степень замещения j в $-[R_1]_a-[AA]_m$ является строго больше 0 и больше или равна 6, $0 < j \leq 6$,

одним или несколькими заместителями $-R'_1$,

где $-R'_1$ представляет собой углеродную цепь C_2-C_{15} , необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом (такой как O, N и S) и несущую по меньшей мере одну кислотную функциональную группу в форме соли катионов щелочных металлов, где указанная цепь присоединена к сахаридному остову посредством функциональной группы F', что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы, содержащейся на остове, с функциональной группой, которую несет предшественник $-R'_1$;

F' представляет собой эфирную, сложноэфирную или карбаматную функциональную группу,

где степень замещения i в $-R'_1$ находится в диапазоне от 0 до $6-j$, $0 \leq i \leq 6-j$, и

$-R'_1$ является одинаковым или отличным от $-R_1$ -,

F и F' являются одинаковыми или разными,

F' и G являются одинаковыми или разными,

свободные солеобразующие кислотные функциональные группы находятся в форме солей катионов щелочных металлов;

b) указанные одинаковые или разные гликозидные связи выбраны из группы, состоящей из гликозидных связей типа (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) или (1,6), в альфа- или бета-положении;

c) $i+j \leq 6$.

В одном из вариантов осуществления m равно 1.

В одном из вариантов осуществления одинаковые или разные $-R_1$ и $-R'_1$ представляют собой углеродную цепь C_2-C_8 .

В одном из вариантов осуществления одинаковые или разные $-R_1$ - и $-R'_1$ представляют собой углеродную цепь C_2-C_4 .

i и j представляют собой статистические степени замещения и означают среднее число заместителей на сахаридное звено. В случае, когда каждое сахаридное звено содержит много гидроксильных функциональных групп разной реакционной способности, распределение заместителей на анионных замещенных соединениях может отличаться в одном сахаридном звене от другого в одном и том же полианионном соединении.

В одном из вариантов осуществления $0,3 \leq i$.

В одном из вариантов осуществления $0,4 \leq i$.

В одном из вариантов осуществления $i \leq 3$.

В одном из вариантов осуществления $i \leq 2,5$.

В одном из вариантов осуществления $0,3 \leq j$.

В одном из вариантов осуществления $0,4 \leq j$.

В одном из вариантов осуществления $j \leq 2$.

В одном из вариантов осуществления $j \leq 1,8$.

В одном из вариантов осуществления представлены i и j , такие как $0 \leq i+j \leq 6$.

В одном из вариантов осуществления $0 < i+j \leq 5$.

В одном из вариантов осуществления $0 < i+j \leq 4$.

В одном из вариантов осуществления $0 < i+j \leq 3$.

В одном из вариантов осуществления $0 < i+j \leq 2,5$.

В одном из вариантов осуществления $0 < i+j \leq 2$.

В одном из вариантов осуществления $0,5 \leq i+j \leq 3$.

В одном из вариантов осуществления $0,5 \leq i+j \leq 2,5$.

В одном из вариантов осуществления $0,5 \leq i+j \leq 2$.

В одном из вариантов осуществления $0,6 \leq i+j \leq 3,5$.

В одном из вариантов осуществления $0,8 \leq i+j \leq 2,5$.

В одном из вариантов осуществления $0,7 \leq i+j \leq 2,5$.

В одном из вариантов осуществления $0,7 \leq i+j \leq 2$.

В одном из вариантов осуществления $1 < i+j \leq 2,5$.

В одном из вариантов осуществления $1 < i+j \leq 2$.

В одном из вариантов осуществления $-R_1$ - и $-R'_1$ присоединены к остову эфирной связью.

В одном из вариантов осуществления в случае, когда $-R_1$ - представляет собой углеродную цепь, она непосредственно присоединена к остову эфирной связью.

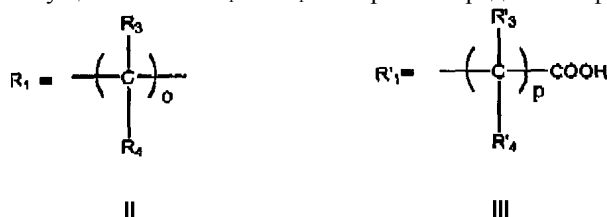
В одном из вариантов осуществления в случае, когда $-R_1$ - представляет собой углеродную цепь, она необязательно содержит гетероатом, выбранный из группы, состоящей из O, N и S.

В одном из вариантов осуществления $-R_1$ - образует с аминокислотным остатком AA амидную связь и непосредственно соединен с остовом эфирной функциональной группой F.

В одном из вариантов осуществления $-R_1-$ образует с аминокислотным остатком АА амидную связь и непосредственно соединен с остовом карбаматной функциональной группой F.

В одном из вариантов осуществления $-R_1-$ образует с аминокислотным остатком АА амидную связь и непосредственно соединен с остовом сложноэфирной функциональной группой F.

В одном из вариантов осуществления $-R_1-$ и $-R'_1$ выбирают из радикалов формул II и III:



где o и p являются одинаковыми или разными, больше или равны 1 и больше или равны 12;

одинаковые или разные $-R_3$, R'_3 , R_4 и $-R'_4$ выбраны из группы, состоящей из атома водорода, насыщенного или ненасыщенного, линейного, разветвленного или циклического C_1 - C_6 -алкила, бензила, C_7 - C_{10} -алкиларила и необязательно содержащей гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из O, N и/или S, или функциональные группы, выбранные из группы, состоящей из функциональных групп карбоновой кислоты, аминных, спиртовых или тиоловых функциональных групп.

В одном из вариантов осуществления $-R_1-$ до присоединения к -АА- представляет собой $-CH_2-COOH$.

В одном из вариантов осуществления анионные замещенные соединения по изобретению отличаются тем, что радикал $-R'_1$ представляет собой $-CH_2-COOH$.

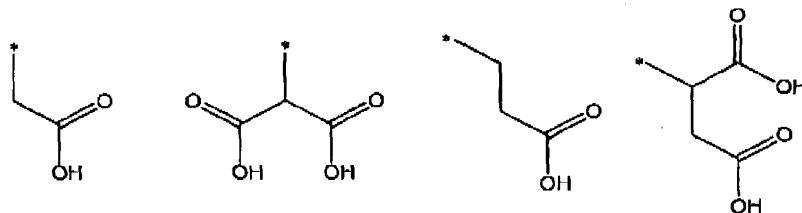
В одном из вариантов осуществления $-R_1-$ до необязательного присоединения к -АА- получают из лимонной кислоты.

В одном из вариантов осуществления $-R_1-$ до необязательного присоединения к -АА- получают из яблочной кислоты.

В одном из вариантов осуществления $-R'_1$ получают из лимонной кислоты.

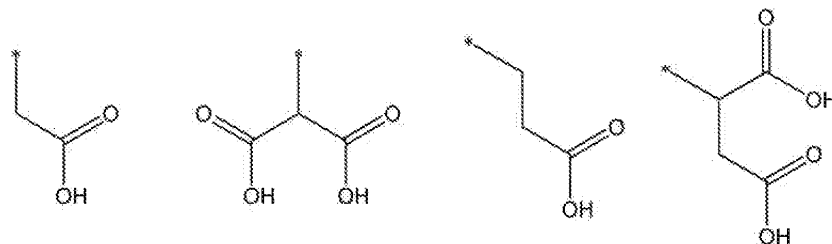
В одном из вариантов осуществления $-R'_1$ получают из яблочной кислоты.

В одном из вариантов осуществления $-R_1-$ до присоединения к -АА выбран из следующих ниже групп, где * означает место присоединения к F:



или их солей катионов щелочных металлов, выбранных из группы, состоящей из Na^+ или K^+ .

В одном из вариантов осуществления $-R'_1$ выбран из следующих ниже групп, где * означает место присоединения к F:



или их солей катионов щелочных металлов, выбранных из группы, состоящей из Na^+ или K^+ .

В одном из вариантов осуществления радикал $-[AA]$ представляет собой остаток фенилаланина и его солей катионов щелочных металлов в абсолютной L-, D-конфигурации или в рацемической конфигурации.

В одном из вариантов осуществления радикал $-[AA]$ представляет собой остаток альфа-метилфенилаланина и его солей катионов щелочных металлов в абсолютной L-, D-конфигурации или в рацемической конфигурации.

В одном из вариантов осуществления радикал $-[AA]$ представляет собой остаток 3,4-дигидроксифенилаланина и его солей катионов щелочных металлов в абсолютной L-, D-конфигурации или в рацемической конфигурации.

В одном из вариантов осуществления радикал $-[AA]$ представляет собой остаток тирозина и его солей катионов щелочных металлов в абсолютной L-, D-конфигурации или в рацемической конфигурации.

В одном из вариантов осуществления радикал $-\text{[AA]}$ представляет собой остаток альфа-метилтирозина и его солей катионов щелочных металлов в абсолютной L-, D-конфигурации или в рацемической конфигурации.

В одном из вариантов осуществления радикал $-\text{[AA]}$ представляет собой остаток O-метилтирозина и его солей катионов щелочных металлов в абсолютной L-, D-конфигурации или в рацемической конфигурации.

В одном из вариантов осуществления радикал $-\text{[AA]}$ представляет собой остаток альфа-фенилглицина и его солей катионов щелочных металлов в абсолютной L-, D-конфигурации или в рацемической конфигурации.

В одном из вариантов осуществления радикал $-\text{[AA]}$ представляет собой остаток 4-гидроксифенилглицина и его солей катионов щелочных металлов в абсолютной L-, D-конфигурации или в рацемической конфигурации.

В одном из вариантов осуществления радикал $-\text{[AA]}$ представляет собой остаток 3,5-дигидроксифенилглицина и его солей катионов щелочных металлов в абсолютной L-, D-конфигурации или в рацемической конфигурации.

В одном из вариантов осуществления радикал $-\text{[AA]}$ представляет собой аминокислотный остаток в форме рацемической смеси.

В одном из вариантов осуществления радикал $-\text{[AA]}$ представляет собой аминокислотный остаток в форме выделенных изомеров абсолютной D-конфигурации.

В одном из вариантов осуществления радикал $-\text{[AA]}$ представляет собой аминокислотный остаток в форме выделенных изомеров абсолютной L-конфигурации.

В одном из вариантов осуществления u находится в диапазоне от 1 до 5.

В одном из вариантов осуществления u находится в диапазоне от 3 до 5.

В одном из вариантов осуществления $u=8$.

В одном из вариантов осуществления $u=7$.

В одном из вариантов осуществления $u=6$.

В одном из вариантов осуществления $u=5$.

В одном из вариантов осуществления $u=4$.

В одном из вариантов осуществления $u=3$.

В одном из вариантов осуществления $u=2$.

В одном из вариантов осуществления $u=1$.

В одном из вариантов осуществления гексозы выбирают из группы, состоящей из маннозы, глюкозы, фруктозы, сорбозы, тагатозы, психозы, галактозы, аллозы, алытрозы, талозы, идозы, гулозы, фукозы, фуколозы, рамнозы, маннитола, сорбита и галактитола (дульцит).

В одном из вариантов осуществления гликозидные связи являются типов (1,4) или (1,6).

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение выбирают из анионных соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом $u=2$ одинаковых или разных сахаридных звеньев, выбранных из гексоз, связанных гликозидной связью типа (1,1).

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение выбирают из анионных соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом $u=2$ разных сахаридных звеньев, выбранных из гексоз и связанных гликозидной связью типа (1,1), где указанный сахаридный остов выбран из группы, состоящей из трегалозы и сукрозы.

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение выбирают из анионных соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом $u=2$ одинаковых или разных сахаридных звеньев, выбранных из гексоз, связанных гликозидной связью типа (1,2).

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение выбирают из анионных соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом $u=2$ одинаковых или разных сахаридных звеньев, выбранных из гексоз, связанных гликозидной связью типа (1,2), где указанный сахаридный остов представляет собой коджибиозу.

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение выбирают из анионных соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом $u=2$ одинаковых или разных сахаридных звеньев, выбранных из гексоз, связанных гликозидной связью типа (1,3).

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение выбирают из анионных соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом $u=2$ одинаковых или разных сахаридных звеньев, выбранных из гексоз, связанных гликозидной связью типа (1,3), где указанный сахаридный остов выбран из группы, состоящей из нигерозы и ламинарибозы.

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение выбирают из анионных соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом $u=2$ одинаковых или разных сахаридных звеньев, выбранных из гексоз, связанных гликозидной связью типа (1,4).

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение выбирают из анионных соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом $u=2$ одинаковых или разных сахаридных звеньев, выбранных из гексоз, связанных гликозидной связью типа (1,4), где указан-

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение по изобретению отличается тем, что сахаридный остов представляет собой мелезитозу.

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение по изобретению отличается тем, что сахаридный остов представляет собой панозу.

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение по изобретению отличается тем, что сахаридный остов представляет собой кестозу.

В одном из вариантов осуществления анионное замещенное соединение по изобретению отличается тем, что сахаридный остов представляет собой стахиозу.

В одном из вариантов осуществления полианионное соединение представляет собой неполимерное полианионное соединение (PNP), аффинность которого к цинку является выше аффинности инсулина к цинку и константа диссоциации которого $Kd_{Ca} = [PNP \text{ соединение}]^r [Ca^{2+}]^s / [(PNP \text{ соединение})^r - (Ca^{2+})^s]$ является больше или равна $10^{-1.5}$.

Константы диссоциации (Kd) разных полианионных соединений по отношению к ионам кальция определяют внешней калибровкой с использованием электрода, специфического к ионам кальция (Mettler Toledo) и электрода сравнения. Все измерения проводят в 150 mM NaCl при pH 7. Определяют только концентрации свободных ионов кальция; ионы кальция, связанные с полианионным соединением, не вызывают электродного потенциала.

В одном из вариантов осуществления полианионное соединение выбирают из группы, состоящей из полисахаридов, содержащих карбоксильные группы, и их солей Na^+ , K^+ , Ca^{2+} или Mg^{2+} .

В одном из вариантов осуществления полисахарид содержащий карбоксильные группы, выбирают из группы, состоящей из лимонной кислоты, винной кислоты и их солей Na^+ , K^+ , Ca^{2+} или Mg^{2+} .

В одном из вариантов осуществления полианионное соединение выбирают из группы, состоящей из полисахаридов, содержащих фосфор, и их солей Na^+ , K^+ , Ca^{2+} или Mg^{2+} .

В одном из вариантов осуществления полисахарид, содержащий фосфор, представляет собой трифосфат и его соли Na^+ , K^+ , Ca^{2+} или Mg^{2+} .

В одном из вариантов осуществления полианионное соединение представляет собой лимонную кислоту и ее соли Na^+ , K^+ , Ca^{2+} или Mg^{2+} .

В одном из вариантов осуществления полианионное соединение представляет собой винную кислоту и ее соли Na^+ , K^+ , Ca^{2+} или Mg^{2+} .

В одном из вариантов осуществления полианионное соединение представляет собой трифосфорную кислоту и ее соли Na^+ , K^+ , Ca^{2+} или Mg^{2+} .

В одном из вариантов осуществления полианионное соединение представляет собой соединение, состоящее из сахаридного остова, образованного дискретным числом сахаридных звеньев, получаемого из соединения дисахарида, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, мальтозы, лактозы, сахарозы, целлобиозы, изомальтозы, мальтитола и изомальтитола.

В одном из вариантов осуществления полианионное соединение, состоящее из сахаридного остова, образованного дискретным числом сахаридных звеньев, получают из соединения, состоящего из остова, образованного дискретным числом сахаридных звеньев, выбранного из группы, состоящей из мальтотриозы, мальтотетраозы, мальтопентаозы, мальтогексаозы, мальтогептаозы, мальтооктаозы и изомальтотриозы.

В одном из вариантов осуществления полианионное соединение, состоящее из сахаридного остова, образованного дискретным числом сахаридных звеньев, выбирают из группы, состоящей из карбоксиметилмальтотриозы, карбоксиметилмальтотетраозы, карбоксиметилмальтопентаозы, карбоксиметилмальтогексаозы, карбоксиметилмальтогептаозы, карбоксиметилмальтооктаозы и карбоксиметилизомальтотриозы.

В одном из вариантов осуществления отношение (число моль кислотных функциональных групп, которые несет полианионное соединение/число моль анионного соединения) больше или равно 3.

В одном из вариантов осуществления отношение (число моль кислотных функциональных групп, которые несет полианионное соединение/число моль анионного соединения) больше или равно 4.

В одном из вариантов осуществления отношение (число моль кислотных функциональных групп, которые несет полианионное соединение, состоящее из сахаридного остова/число моль анионного соединения) больше или равно 5.

В одном из вариантов осуществления отношение (число моль кислотных функциональных групп, которые несет полианионное соединение, состоящее из сахаридного остова/число моль анионного соединения) больше или равно 8.

В одном из вариантов осуществления молярные отношения анионное замещенное соединение/инсулин находятся в диапазоне от 0,6 до 75.

В одном из вариантов осуществления молярные отношения находятся в диапазоне от 0,7 до 50.

В одном из вариантов осуществления молярные отношения находятся в диапазоне от 1,4 до 35.

В одном из вариантов осуществления молярные отношения находятся в диапазоне от 1,9 и 30.

В одном из вариантов осуществления молярные отношения находятся в диапазоне от 2,3 до 30.

Изобретение относится к использованию, по меньшей мере, анионного замещенного соединения, где указанное соединение состоит из сахаридного остова, образованного дискретным числом u в диапазоне от 1 до 8 ($1 \leq u \leq 8$) одинаковых или разных сахаридных звеньев, связанных одинаковыми или разными гликозидными связями, где указанные сахаридные звенья выбраны из группы, состоящей из гексоз в циклической форме или открытой восстановленной форме, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, преобразуют в соль для получения фармацевтического состава инсулина человека в сочетании с полианионным соединением, позволяющего после введения ускорять поступление инсулина в кровь и быстрее снижать гликемию по сравнению с составом без анионного замещенного соединения и необязательно анионных соединений.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к использованию, по меньшей мере, анионного замещенного соединения, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, преобразуют в соль для получения фармацевтического состава инсулина человека в сочетании с полианионным соединением, позволяющего после введения ускорять поступление инсулина в кровь и быстрее снижать гликемию по сравнению с составом без анионного замещенного соединения и необязательно анионных соединений.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к использованию, по меньшей мере, анионного замещенного соединения, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, преобразуют в соль для получения состава инсулина-аналога в сочетании с полианионным соединением, позволяющего после введения ускорять поступление инсулина-аналога в кровь и быстрее снижать гликемию по сравнению с составом без анионного замещенного соединения и необязательно анионных соединений.

В одном из вариантов осуществления инсулин представляет собой инсулин человека.

Под инсулином человека подразумевают инсулин, получаемый синтезом или рекомбинацией, пептидная последовательность которого представляет собой последовательность инсулина человека, включая аллельные гликозидными связями, где указанные сахаридные звенья выбраны из группы, состоящей из гексоз в циклической форме или открытой восстановленной форме, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, преобразуют в соль для получения фармацевтического состава инсулина человека в сочетании с полианионным соединением, позволяющего после введения ускорять поступление инсулина в кровь и быстрее снижать гликемию по сравнению с составом без анионного замещенного соединения и необязательно анионных соединений.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к использованию, по меньшей мере, анионного замещенного соединения, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, преобразуют в соль для получения фармацевтического состава инсулина человека в сочетании с полианионным соединением, позволяющего после введения ускорять поступление инсулина в кровь и быстрее снижать гликемию по сравнению с составом без анионного замещенного соединения и необязательно анионных соединений.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к использованию, по меньшей мере, анионного замещенного соединения, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, преобразуют в соль для получения состава инсулина-аналога в сочетании с полианионным соединением, позволяющего после введения ускорять поступление инсулина-аналога в кровь и быстрее снижать гликемию по сравнению с составом без анионного замещенного соединения и необязательно анионных соединений.

Использование по меньшей мере одного анионного функционализированного соединения, состоящего из остова, образованного дискретным числом u в диапазоне от 1 до 3 ($1 \leq u \leq 3$) идентичных или различных сахаридных звеньев, связанных идентичными или различными гликозидными связями, где указанные сахаридные звенья выбраны из группы, состоящей из гексоз в циклической форме или открытой восстановленной форме, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, является солеобразующим, для получения фармацевтического состава инсулина, обеспечивающего после введения увеличение скорости поступления инсулина в кровь и более быстрое снижение гликемию по сравнению с составом, не содержащим анионного замещенного соединения, в комбинации, по меньшей мере, с указанным полианионным соединением, являющимся неполимерным полианионным соединением (PNP), аффинность которого к цинку является больше аффинности к цинку инсулина и константа диссоциации которого $K_dCa = [\text{соединение PNP}]_r [\text{Ca}^{2+}]_s / [(\text{соединение PNP})^f - (\text{Ca}^{2+})^s]$ больше или равна $10^{-1.5}$.

В одном из вариантов осуществления использование отличается тем, что анионное функционализированное соединение находится в смеси с полианионным соединением.

В одном из вариантов осуществления инсулин представляет собой инсулин человека.

Под инсулином человека подразумевают инсулин, получаемый синтезом или рекомбинацией, пептидная последовательность которого представляет собой последовательность инсулина человека, включая аллельные варианты и гомологи.

В одном из вариантов осуществления инсулин представляет собой рекомбинантный инсулин человека, такой как описанный в европейской Фармакопее и Фармакопее США.

В одном из вариантов осуществления инсулин представляет собой инсулин-аналог.

Под инсулином-аналогом подразумевают рекомбинантный инсулин, первичная последовательность которого содержит по меньшей мере одну модификацию со сравнением с первичной последовательностью инсулина человека.

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог выбран из группы, состоящей из инсулина лизпро (Humalog®), инсулина аспарт (Novolog®, Novorapid®) и инсулина глулизин (Apidra®).

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог представляет собой инсулин-аналог лизпро (Humalog®).

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог представляет собой инсулин аспарт (Novolog®, Novorapid®).

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог представляет собой инсулин глулизин (Apidra®).

В одном из вариантов осуществления использование отличается тем, что анионное замещенное соединение выбрано из анионных замещенных соединений в выделенной форме или в смеси, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом u в диапазоне от 1 до 8 ($1 \leq u \leq 8$) одинаковых или разных сахаридных звеньев, связанных одинаковыми или разными гликозидными связями, где указанные сахаридные звенья выбраны из гексоз в циклической форме или открытой восстановленной форме, отличающихся тем, что они являются замещенными[^]

а) по меньшей мере одним заместителем общей формулы I



где заместители являются одинаковыми или разными в случае, когда содержится по меньшей мере два заместителя;

радикал $-[AA]$ означает аминокислотный остаток,

радикал $-R_1$ представляет собой

или связь, тогда $a=0$ и аминокислотный остаток $-[AA]$ непосредственно связан с остовом функциональной группой G,

или углеродную цепь C_2-C_{15} , тогда $a=1$, необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и, по меньшей мере, кислотную функциональную группу до взаимодействия с аминокислотой, где указанная цепь образует с аминокислотным остатком $-[AA]$ -функциональную амидную группу и присоединена к остову посредством функциональной группы F, что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы, содержащейся на остове, с функциональной группой или заместителем, который несет предшественник радикала $-R_1$,

F представляет собой функциональную группу, выбранную из эфирной, сложноэфирной или карбаматной функциональных групп,

G представляет собой карбаматную функциональную группу,

m равно 1 или 2,

где степень замещения сахаридных звеньев j в $-[R_1]_a-[AA]_m$ является строго больше 0 и больше или равна 6, $0 < j \leq 6$; и

b) необязательно, одним или несколькими заместителями $-R'_1$,

где заместитель $-R'_1$ представляет собой углеродную цепь C_2-C_{15} , необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и, по меньшей мере, кислотную функциональную группу в форме соли катионов щелочных металлов, где указанная цепь связана с остовом функциональной группой F', что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы, содержащейся на остове, с функциональной группой или заместителем, который несет предшественник заместителя $-R'_1$,

F' представляет собой эфирную, сложноэфирную или карбаматную функциональную группу,

степень замещения сахаридных звеньев i в $-R'_1$ находится в диапазоне от 0 до $6-j$, $0 \leq i \leq 6-j$,

F и F' являются одинаковыми или разными,

F и G являются одинаковыми или разными,

$i+j \leq 6$.

$-R'_1$ является одинаковым или отличным от $-R_1$,

свободные солеобразующие кислотные функциональные группы, которые несет заместитель $-R'_1$, находятся в форме солей катионов щелочных металлов,

указанные одинаковые или разные гликозидные связи выбраны из группы, состоящей из гликозидных связей типа (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) или (1,6), в альфа- или бета-положении.

В одном из вариантов осуществления использование отличается тем, что анионное замещенное соединение в выделенной форме или в смеси выбирают из анионных замещенных соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом u в диапазоне от 1 до 8 ($1 \leq u \leq 8$) одинаковых или разных сахаридных звеньев, связанных одинаковыми или разными гликозидными связями, где указанные сахаридные звенья выбраны из гексоз в циклической форме или открытой восстановленной форме, отличающихся тем, что:

- а) они являются статистически замещенными по меньшей мере одним заместителем общей формулы I



где заместители являются одинаковыми или разными в случае, когда содержится по меньшей мере два заместителя,

радикал $-[AA]-$ означает аминокислотный остаток, где указанная аминокислота выбрана из группы, состоящей из фенилаланина, альфа-метилфенилаланина, 3,4-дигидроксифенилаланина, тирозина, альфа-метилтирозина, О-метилтирозина, альфа-фенилглицина, 4-гидроксифенилглицина, 3,5-дигидроксифенилглицина и их солей катионов щелочных металлов, где указанные производные находятся в абсолютной L- или D-конфигурации, $-[AA]-$ присоединен к остову молекулы посредством промежуточного соединения плеча связи $-R_1-$ или непосредственно связан с остовом посредством функциональной группы G,

$-R_1-$ представляет собой

или связь G, тогда $a=0$,

или углеродную цепь C_2-C_{15} , тогда $a=1$, необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и несущую по меньшей мере одну кислотную функциональную группу до взаимодействия с аминокислотой, где указанная цепь образует с аминокислотным остатком $-[AA]-$ амидную связь и является присоединенной к сахаридному остову посредством функциональной группы F, что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы, содержащейся на остове, с функциональной группой, которую несет предшественник R_1 ,

F представляет собой эфирную, сложноэфирную или карбаматную функциональную группу,

G представляет собой карбаматную функциональную группу,

M равно 1 или 2,

где степень замещения j в $-[R_1]_a-[AA]_m$ статистически больше 0 и больше или равна 6, $0 < j \leq 6$,

и необязательно

один или несколько заместителей $-R'_1$, где $-R'_1$ представляют собой углеродную цепь C_2-C_{15} , необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом (такой как O, N и S) и несущую, по меньшей мере, кислотную функциональную группу в форме соли катионов щелочных металлов, где указанная цепь присоединена к сахаридному остову посредством функциональной группы F', что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы, содержащейся на остове, с функциональной группой, которую несет предшественник $-R'_1$,

F' представляет собой эфирную, сложноэфирную или карбаматную функциональную группу, степень замещения i в $-R'_1$ находится в диапазоне от 0 до $6-j$, $0 \leq i \leq 6-j$,

$-R'_1-$ является одинаковым или отличным от $-R_1$,

F и F' являются одинаковыми или разными,

F' и G являются одинаковыми или разными,

свободные солеобразующие кислотные функциональные находятся в форме солей катионов щелочных металлов;

б) указанные одинаковые или разные гликозидные связи выбраны из группы, состоящей из гликозидных связей типа (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) или (1,6), в альфа- или бета-положении;

с) $i+j \leq 6$.

В одном из вариантов осуществления m равно 1.

В одном из вариантов осуществления одинаковые или разные $-R_1-$ и $-R'_1$ представляют собой углеродную цепь C_1-C_8 .

В одном из вариантов осуществления одинаковые или разные $-R_1-$ и $-R'_1$ представляют собой углеродную цепь C_1-C_4 .

В одном из вариантов осуществления одинаковые или разные $-R_1-$ и $-R'_1$ представляют собой углеродную цепь C_1-C_2 .

Специалисту в данной области известно, что указанное действие инсулинов зависит от концентрации инсулина. Документально подтверждены только значения периода действия составов 100 МЕд./мл.

"Постоянно представленные" на рынке составы инсулина человека в концентрации 600 мкМ (100 МЕд./мл) имеют период действия в диапазоне от 50 до 90 мин и окончание действия приблизительно через 360-420 мин у человека. Время достижения максимальной концентрации инсулина в крови на-

Изобретение также относится к способу получения состава инсулина-аналога с концентрацией инсулина 1800 мкМ (300 МЕд./мл), период действия которого у человека является больше по меньшей мере на 10% периода действия состава инсулина-аналога в отсутствие анионного замещенного соединения и полианионного соединения, отличающемся тем, что он включает:

(1) этап добавления к указанному составу по меньшей мере одного анионного замещенного соединения, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, является солеобразующим; и

(2) этап добавления к указанному составу по меньшей мере одного полианионного соединения.

В одном из вариантов осуществления инсулин находится в гексамерной форме.

Изобретение также относится к способу получения состава инсулина-аналога с концентрацией инсулина 2400 мкМ (400 МЕд./мл), период действия которого у человека является больше по меньшей мере на 10% периода действия состава инсулина-аналога в отсутствие анионного замещенного соединения и полианионного соединения отличающемся тем, что он включает:

(1) этап добавления к указанному составу по меньшей мере одного анионного замещенного соединения, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, является солеобразующим; и

(2) этап добавления к указанному составу по меньшей мере одного полианионного соединения.

В одном из вариантов осуществления инсулин находится в гексамерной форме.

Изобретение также относится к способу получения состава инсулина-аналога с концентрацией инсулина 3000 мкМ (500 МЕд./мл), период действия которого у человека является больше по меньшей мере на 10% периода действия состава инсулина-аналога в отсутствие анионного замещенного соединения и полианионного соединения, отличающемся тем, что он включает:

(1) этап добавления к указанному составу по меньшей мере одного анионного замещенного соединения, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, является солеобразующим; и

(2) этап добавления к указанному составу по меньшей мере одного полианионного соединения.

В одном из вариантов осуществления инсулин находится в гексамерной форме.

Изобретение относится к получению так называемого состава инсулина-аналога очень быстрого действия, отличающийся тем, что он включает этап добавления к указанному составу по меньшей мере одного анионного замещенного соединения, где указанное соединение, содержащее частично замещенные карбоксильные функциональные группы, незамещенные карбоксильные функциональные группы, является солеобразующим.

В одном из вариантов осуществления получение включает другой этап добавления к указанному составу по меньшей мере одного полианионного соединения.

В одном из вариантов осуществления инсулин находится в гексамерной форме.

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог выбирают из группы, состоящей из инсулина лизпро (Humalog®), инсулина аспарт (Novolog®, Novorapid®) и инсулина глулизин (Apidra®).

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог представляет собой инсулин лизпро (Humalog®).

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог представляет собой инсулин аспарт (Novolog®, Novorapid®).

В одном из вариантов осуществления инсулин-аналог представляет собой инсулин глулизин (Apidra®).

В одном из вариантов осуществления инсулин представляет собой рекомбинантный инсулин человека, такой как описанный в европейской Фармакопее и Фармакопее США.

В одном из вариантов осуществления инсулин представляет собой инсулин-аналог, выбираемый из группы, состоящей из инсулина лизпро (Humalog®), инсулина аспарт (Novolog®, Novorapid®) и инсулина глулизин (Apidra®).

Кроме того, композицию можно получать простым смешиванием водного раствора инсулина человека или инсулина-аналога и водного раствора анионного замещенного соединения в смеси с полианионным соединением.

В одном из вариантов осуществления композицию можно получать простым смешиванием водного раствора инсулина человека или инсулина-аналога, водного раствора анионного замещенного соединения и полианионного соединения в растворе или в форме лиофилизата.

В одном из вариантов осуществления композицию можно получать простым смешиванием водного раствора инсулина человека или инсулина-аналога, анионного замещенного соединения в форме лиофилизата и полианионного соединения в растворе или в форме лиофилизата.

Предпочтительно эта композиция находится в форме инъектируемого раствора.

В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина человека или инсулина-аналога находится в диапазоне от 240 до 3000 мкМ (от 40 до 500 МЕд./мл).

В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина человека или инсулина-аналога находится в диапазоне от 600 до 3000 мкМ (от 100 до 500 МЕд./мл).

В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина человека или инсулина-аналога находится в диапазоне от 600 до 2400 мкМ (от 100 до 400 МЕд./мл).

В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина человека или инсулина-аналога находится в диапазоне от 600 до 1800 мкМ (от 100 до 300 МЕд./мл).

В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина человека или инсулина-аналога находится в диапазоне от 600 до 1200 мкМ (от 100 до 200 МЕд./мл).

В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина человека или инсулина-аналога составляет 600 мкМ (100 МЕд./мл).

В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина человека или инсулина-аналога составляет 1200 мкМ (200 МЕд./мл).

В одном из вариантов осуществления концентрацию инсулина человека или инсулина-аналога 600 мкМ (100 МЕд./мл) можно уменьшать простым разбавлением, в частности для применений в педиатрии.

В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина человека или инсулина-аналога составляет 1800 мкМ (300 МЕд./мл).

В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина человека или инсулина-аналога составляет 2400 мкМ (400 МЕд./мл).

В одном из вариантов осуществления концентрация инсулина человека или инсулина-аналога составляет 3000 мкМ (500 МЕд./мл).

Изобретение также относится к фармацевтическому составу по изобретению, отличающемуся тем, что его получают сушкой и/или лиофилизацией.

В одном из вариантов осуществления композиции по изобретению также предусматривают введение солей цинка в концентрации в диапазоне от 0 до 500 мкМ.

В одном из вариантов осуществления композиции по изобретению также предусматривают введение солей цинка в концентрации в диапазоне от 0 до 300 мкМ.

В одном из вариантов осуществления композиции по изобретению также предусматривают введение солей цинка в концентрации в диапазоне от 0 до 200 мкМ.

В одном из вариантов осуществления композиции по изобретению содержат буферы в концентрациях в диапазоне от 0 до 100 мм, предпочтительно от 0 до 50 мМ или от 15 до 50 мМ.

В одном из вариантов осуществления буфер представляет собой Tris.

В одном из вариантов осуществления композиции по изобретению также содержат консерванты.

В одном из вариантов осуществления консерванты выбирают из группы, состоящей из мета-крезола и фенола по отдельности или в смеси.

В одном из вариантов осуществления концентрация консервантов находится в диапазоне от 10 до 50 мм.

В одном из вариантов осуществления концентрация консервантов находится в диапазоне от 10 до 40 мм.

Композиции по изобретению также могут содержать добавки, такие как средства придания тоничности, такие как глицерин, хлорид натрия (NaCl), маннитол и глицин.

Композиции по изобретению также могут содержать добавки в соответствии с фармакопеями, такие как поверхностно-активные средства, например, полисорбат.

Композиции по изобретению также могут содержать любые эксципиенты в соответствии с фармакопеями и совместимые с используемыми видами инсулина в используемых концентрациях.

В случае местного и системного высвобождения предусматриваемые способы введения представляют собой внутривенный, подкожный, внутрикожный или внутримышечный путь.

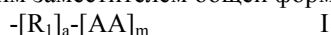
Также предусматривают чрескожное, пероральное, назальное, влагалищное, глазное, буккальное, легочное введение.

Изобретение также относится к использованию композиции по изобретению для состава раствора инсулина человека или инсулина-аналога в концентрации 100 МЕд./мл, предназначенного для имплантируемых и переносных насосов инсулина.

Изобретение также относится к использованию композиции по изобретению для состава раствора инсулина человека или инсулина-аналога в концентрации 200 МЕд./мл, предназначенного для имплантируемых и переносных насосов инсулина.

Изобретение также относится к анионным замещенным соединениям в выделенной форме или в смеси, выбранным из анионных замещенных соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом u в диапазоне от 1 до 8 ($1 \leq u \leq 8$) одинаковых или разных сахаридных звеньев, связанных одинаковыми или разными гликозидными связями, где указанные сахаридные звенья выбраны из гексоз в циклической форме или открытой восстановленной форме, отличающихся тем, что они являются замещенными:

а) по меньшей мере одним заместителем общей формулы I:



где заместители являются одинаковыми или разными в случае, когда содержится по меньшей мере два заместителя,

радикал $-\text{[AA]}$ обозначает аминокислотный остаток,

радикал $-\text{R}_1$ - представляет собой

или связи, тогда $a=0$ и аминокислотный остаток $-\text{[AA]}$ - непосредственно связан с остовом функциональной группой G,

или углеродную цепь $\text{C}_2\text{-C}_{15}$, тогда $a=1$, необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и по меньшей мере одну кислотную функциональную группу до взаимодействия с аминокислотой, где указанная цепь, образующая с аминокислотным остатком $-\text{[AA]}$ -функциональную амидную группу, является присоединенной к остову посредством функциональной группы F, что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы, содержащейся на остове, с функциональной группой, которую несет предшественник радикала $-\text{R}_1$,

F представляет собой функциональную группу, выбранную из эфирной, сложноэфирной или карбаматной функциональных групп,

G представляет собой карбаматную функциональную группу,

m равно 1 или 2,

степень замещения сахаридных звеньев j в $-\text{[R]}_a-\text{[AA]}_m$ -является строго больше 0 и больше или равна 6, $0 < j \leq 6$; и

b) необязательно, одним или несколькими заместителями $-\text{R}'_1$,

где заместитель $-\text{R}'_1$ представляет собой углеродную цепь $\text{C}_2\text{-C}_{15}$, необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и по меньшей мере одну кислотную функциональную группу в форме соли катионов щелочных металлов, где указанная цепь, является связанной с остовом посредством функциональной группы F', что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы, содержащейся на остове, с функциональной группой или заместителем, который несет предшественник заместителя $-\text{R}'_1$,

F' представляет собой эфирную, сложноэфирную или карбаматную функциональную группу, где степень замещения сахаридных звеньев i в $-\text{R}'_1$ находится в диапазоне от 0 до 6-j, $0 \leq i \leq 6-j$,

F и F' являются одинаковыми или разными,

F и G являются одинаковыми или разными,

$i+j < 6$,

$-\text{R}'_1$ является одинаковой или отличной от $-\text{R}_1$,

свободные солеобразующие кислотные функциональные группы, которые несет заместитель $-\text{R}'_1$, находятся в форме солей катионов щелочных металлов,

указанные одинаковые или разные гликозидные связи выбраны из группы, состоящей из гликозидных связей типа (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) или (1,6), в альфа- или бета-положении.

В указанной выше формуле разные переменные представляют собой перечисленные выше величины.

Анионные замещенные соединения по изобретению также можно получать прививкой заместителей на сахаридный остов.

В одном из вариантов осуществления анионные замещенные соединения, выбираемые из анионных соединений, замещенных заместителями формул I или II, отличаются тем, что их также можно получать прививкой заместителей в точных положениях на сахаридных звеньях способом, в котором используют этапы защиты/снятия защиты группировок спирта или карбоновой кислоты, естественным образом содержащихся на остове. Эта стратегия приводит к избирательной прививке, конкретнее - регулярной прививке заместителей на остове. Защитные группировки включают без ограничения защитные группировки, описанные в работе (Wuts P.G.M. et al., *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 2007).

Сахаридный остов также можно получать расщеплением высокомолекулярного полисахарида. Способы расщепления включают, без ограничения, химическое расщепление и/или ферментативное расщепление.

Сахаридный остов также можно получать посредством образования гликозидных связей между моносахаридными или олигосахаридными молекулами с использованием стратегии химического или ферментативного связывания. Стратегии связывания включают связывания, описанные в публикации (Smoot J.T. et al., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2009, 62, 162-250) и в работе (Lindhorst T.K., *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2007, 157-208). Реакции связывания можно проводить в растворе или на твердой подложке. Сахаридные молекулы до связывания могут содержать представляющие интерес заместители и/или являться функционализированными после связывания друг с другом статистически или региоселективно.

Таким образом, в качестве примеров соединения по изобретению также можно получать одним из следующих способов:

статистической прививкой заместителей на сахаридный остов;

одним или несколькими этапами гликозилирования между моносахаридными или олигосахаридными молекулами, несущими заместители;

одним или несколькими этапами гликозилирования между молекулой или молекулами моносахаридов или олигосахаридов, несущими заместители, и молекулой или молекулами моносахаридов или олигосахаридов;

одним или несколькими этапами введения защитных группировок на спирты или кислоты, естественным образом несущие сахаридный остов, с последующей одной или несколькими реакциями прививки заместителей и в заключении этапом снятия защитных группировок;

одним или несколькими этапами гликозилирования между молекулой или молекулами моносахаридов или олигосахаридов, несущих защитные группировки, на спиртах или кислотах, которые естественным образом содержит сахаридный остов, этапом или этапами прививки заместителей на получаемом остоле, затем этапом снятия защитных группировок;

одним или несколькими этапами гликозилирования между молекулой или молекулами моносахаридов или олигосахаридов, несущих защитные группировки, на спиртах или кислотах, которые естественным образом содержит сахаридный остов, и молекулой или молекулами моносахаридов или олигосахаридов, этапом или этапами прививки заместителей, затем этапом снятия защитных группировок.

Выделенные или в смеси соединения по изобретению можно разделять и/или очищать разными способами, в частности после их получения описанными выше способами.

В частности, можно перечислить хроматографические способы, конкретнее - так называемые "препаративные" или "подготовительные" способы, такие как

виды флэш-хроматографии", в частности, на диоксиде кремния и

виды хроматографии типа HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография), в частности RP-HPLC или "reverse phase HPLC" (высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой).

Также можно использовать способы избирательного осаждения.

Изобретение проиллюстрировано следующими ниже примерами.

Примеры

Структуры анионных замещенных соединений по изобретению приведены в табл. 1. Структуры противопоставительных полисахаридов представлены в табл. 2.

Анионные замещенные соединения AA.

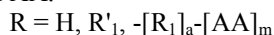
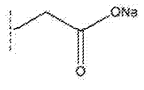
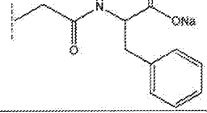
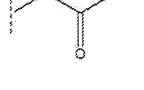
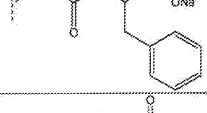
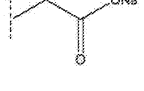
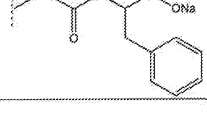


Таблица 1

Соединение	i	j	Цепь сахаридов	Заместитель $-R'_1$	Заместитель $-[R_1]_a-[AA]_m$
1	0,65	1,0			
2	1,0	0,65			
3	0,46	1,2			

4	0,35	0,65			
5	1,25	0,4			
6	0,8	0,65			
7	2,65	0,65			
8	1,0	0,75			
9	1,0	0,65			
10	0,83	0,81			
11	1,12	0,52			

Противопоставительные примеры полисахаридов АВ.

Противопоставительные примеры полисахаридов	i	j	Цепь сахаридов	Средневзвешенная молекулярная масса (кг/моль)	Заместитель - R' ₁	Заместитель - [R ₁] _a -[AA] _m
Противопоставительные примеры полисахаридов АВ1, АВ2, АВ3, АВ4 и АВ5 : R = H, R' ₁ , -[R ₁] _a -[AA] _m						
AB1	0,6	0,46		10		
AB2	1,01	0,64		5		
AB3	0,65	0,45		5		

AB4	1,01	0,64		10		
AB5	0,45	0,65		5		

AA1. Соединение 1. Мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатом натрия.

К 8 г (143 ммоль гидроксильных функциональных групп) мальтотриозы (CarboSynth), растворенной в воде при 65°C, добавляют 0,6 г (16 ммоль) боргидрида натрия. Через 30 мин перемешивания добавляют 28 г (238 ммоль) хлорацетата натрия. Затем к этому раствору по каплям добавляют 24 мл 10н. NaOH (24 ммоль), затем нагревают смесь при 65°C в течение 90 мин. Затем в реакционную среду по каплям добавляют 16,6 г (143 ммоль) хлорацетата натрия, а также 14 мл 10н. NaOH (14 ммоль). Через 1 ч нагревания смесь разбавляют водой, нейтрализуют уксусной кислотой, затем очищают ультрафильтрацией на мембране PES 1 кДа против воды. Концентрацию молекул конечного раствора определяют по сухому экстракту, затем проводят дозирование кислоты/щелочи в смесь вода/ацетон 50/50 (об./об.) для определения степени замещения по метилкарбоксилату.

В соответствии с сухим остатком: [соединение]=32,9 мг/г.

В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилату составляет 1,65 на сахаридное звено.

Раствор мальтотриозаметилкарбоксилата натрия окисляют на смоле пьюролайт (анионная) с получением мальтотриозаметилкарбоновой кислоты, которую затем подвергают лиофилизации в течение 18 ч.

10 г мальтотриозаметилкарбоновой кислоты (63 ммоль функциональных групп метилкарбоновой кислоты) растворяют в DMF, затем охлаждают до 0°C. Получают смесь этилфенилаланината, соль гидрохлорида (8,7 г, 38 ммоль) в DMF. К этой смеси добавляют 3,8 г триэтиламина (38 ммоль). Затем к смеси добавляют раствор NMM (6,3 г, 63 ммоль) и EtOCOC1 (6,8 г, 63 ммоль) при 0°C. Затем добавляют раствор этилфенилаланината и перемешивают смесь при 10°C. Добавляют водный раствор имидазола, затем нагревают смесь до 30°C. Среду разбавляют водой, затем получаемый раствор очищают ультрафильтрацией на мембране PES 1 кДа против 0,1н. NaOH, NaCl 0,9% и воды. Молекулярную концентрацию конечного раствора определяют по сухому остатку. Образец раствора лиофилизируют и анализируют посредством ЯМР ¹H в D₂O для определения степени замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатом натрия.

В соответствии с сухим остатком: [соединение]=29,4 мг/г.

В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 0,65.

По данным ЯМР ¹H: степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатом натрия, на сахаридное звено составляет 1,0.

AA2. Соединение 2. Мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатом натрия.

Способом, аналогичным способу, используемому для получения соединения 1, получают мальтотриозакарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатом натрия. В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 1,0.

В соответствии с сухим остатком: [соединение 2]=20,2 мг/г.

По данным ЯМР ¹H: степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатом натрия, на сахаридное звено составляет 0,65.

AA3. Соединение 3. Мальтотриозаметилкарбоксилат натрия функционализированный L-фенилаланинатом натрия.

Способом, аналогичным способу, используемому для получения соединения 1, получают мальтотриозакарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатом натрия. В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 0,46.

В соответствии с сухим остатком: [соединение 3]=7,2 мг/г.

По данным ЯМР ¹H: степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатом натрия, на сахаридное звено составляет 1,2.

АА4. Соединение 4. Мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланином натрия.

Способом, аналогичным способу, используемому для получения соединения 1, получают мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланином натрия. В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 0,35.

В соответствии с сухим остатком: [соединение 4]=3,1 мг/г.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланином натрия, на сахаридное звено составляет 0,65.

АА5. Соединение 5. Мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланином натрия

Способом, аналогичным способу, используемому для получения соединения 1, получают мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланином натрия.

В соответствии с сухим остатком: [соединение 5]=10,9 мг/г.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланином натрия на сахаридное звено составляет 0,40.

Степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 1,25.

АА6. Соединение 6. Мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланином натрия.

К 8 г (143 ммоль гидроксильных функциональных групп) мальтотриозы (CarboSynth), растворенной в воде, при 65°C добавляют 0,6 г (16 ммоль) боргидрида натрия. После 30 мин перемешивания 28 г добавляют (237 ммоль) хлорацетата натрия. Затем к этому раствору по каплям добавляют 24 мл 10н. NaOH (240 ммоль). После нагревания до 65°C в течение 90 мин смесь разбавляют водой, нейтрализуют добавлением уксусной кислоты, затем очищают ультрафильтрацией через мембрану PES 1 кДа против воды. Концентрацию соединения конечного раствора определяют по сухому остатку, затем проводят кислотное/щелочное титрование в смеси вода/ацетон 50/50 (об./об.) для определения степени замещения по метилкарбоксилату натрия.

В соответствии с сухим остатком: [соединение]=14,5 мг/г.

В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 1,45.

Раствор мальтотриозаметилкарбоксилата натрия окисляют на смоле пьюролайт (анионная) с получением мальтотриозаметилкарбоновой кислоты, которую затем подвергают лиофилизации в течение 18 ч.

Способом, аналогичным способу, используемому для получения соединения 1, получают мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланином натрия.

В соответствии с сухим остатком: [соединение 6]=10,8 мг/г.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланином натрия, на сахаридное звено составляет 0,65.

Степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 0,8.

АА7. Соединение 7. Мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланином натрия.

Способом, аналогичным способу, описанному в получении соединения 1, синтезируют 8 г мальтотриозаметилкарбоксилата натрия, отличающегося степенью замещения по метилкарбоксилату натрия 1,76, и подвергают его лиофилизации.

8 г (58 ммоль гидроксильных функциональных групп) лиофилизата и 15 г (129 ммоль) хлорацетата натрия растворяют в воде при 65°C. К этому раствору добавляют по каплям 13 мл 10н. NaOH (130 ммоль), затем нагревают смесь до 65°C в течение 90 мин. Затем к реакционной среде по каплям добавляют 9 г (78 ммоль) хлорацетата натрия, а также 8 мл 10н. NaOH (80 ммоль). Через 1 ч нагревания смесь разбавляют водой, нейтрализуют уксусной кислотой, затем очищают ультрафильтрацией через мембрану PES 1 кДа против воды. Концентрацию соединения конечного раствора определяют по сухому остатку, затем проводят кислотное/щелочное титрование в смеси вода/ацетон 50/50 (об./об.) для определения степени замещения по метилкарбоксилатам натрия.

В соответствии с сухим остатком: [соединение]=11,7 мг/г.

В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 3,30.

Раствор мальтотриозаметилкарбоксилата натрия окисляют на смоле пьюролайт (анионная) с получением мальтотриозаметилкарбоновой кислоты, которую затем подвергают лиофилизации в течение 18 ч.

Способом, аналогичным способу, используемому для получения соединения 1, получают мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланином натрия.

В соответствии с сухим остатком: [соединение 7]=14,9 мг/г.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатов натрия, на сахаридное звено составляет 0,65.

Степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 2,65.

AA8. Соединение 8. Мальтопентаозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия. Способом, аналогичным способу, описанному в получении соединения 1, но проводимым с мальтопентаозой (CarboSynth), получают 10 г мальтопентаозаметилкарбоновой кислоты со степенью замещения по метилкарбоновой кислоте 1,75 на сахаридное звено, а затем распыляют.

Способом, аналогичным способу, используемому для получения соединения 1, получают мальтопентаозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия.

В соответствии с сухим остатком: [соединение 8]=7,1 мг/г.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатов натрия, на сахаридное звено составляет 0,75.

Степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 1,0.

AA9. Соединение 9. Мальтооктаозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия.

Способом, аналогичным способу, описанному в получении соединения 1, но проводимым с мальтооктаозой (CarboSynth), получают 10 г мальтооктаозаметилкарбоновой кислоты со степенью замещения по метилкарбоновой кислоте 1,65 на сахаридное звено, а затем лиофилизируют.

Способом, аналогичным способу, используемому для получения соединения 1, получают мальтооктаозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия.

В соответствии с сухим остатком: [соединение 9]=26,3 мг/г.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатов натрия, на сахаридное звено составляет 0,65.

Степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 1,0.

AA10. Соединение 10. Мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-тирозинатов натрия.

Способом, аналогичным способу, описанному в получении соединения 1, но проводимым с метил-L-тирозинатом, соль соляной кислоты (Bachem), мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, отличающийся степенью замещения по метилкарбоксилату натрия на сахаридное звено 1,64, функционализируют L-тирозинатов натрия.

В соответствии с сухим остатком: [соединение 10]=9,1 мг/г.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-тирозинатов натрия, на сахаридное звено составляет 0,81.

Степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 0,83.

AA11. Соединение 11. Мальтотриозаметилкарбоксилат натрия, функционализированный альфа-фенилглицинатов натрия.

Способом, аналогичным способу, описанному в получении соединения 1, получают 10 г мальтотриозаметилкарбоновой кислоты со степенью замещения по метилкарбоновой кислоте на сахаридное звено 1,64, а затем лиофилизируют.

8 г мальтотриозаметилкарбоновой кислоты (50 ммоль функциональных групп метилкарбоновой кислоты) растворяют в DMF, затем охлаждают до 0°C. Получают смесь альфа-фенилглицината натрия (Bachem, 5 г; 33 ммоль) и триэтиламина (33 ммоль) в воде. Затем к раствору мальтотриозаметилкарбоновой кислоты добавляют раствор NMM (4,9 г; 49 ммоль) и EtOCCl (5,3 г, 49 ммоль) при 0°C. Затем добавляют раствор альфа-фенилглицината натрия и триэтиламина и перемешивают смесь при 30°C. Через 90 мин добавляют водный раствор имидазола (340 г/л). Среду разбавляют водой, затем очищают получаемый раствор ультрафильтрацией через мембрану PES 1 кДа против буфера $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ pH 10,4 150 мм, 0,9% NaCl и воды. Концентрацию соединения конечного раствора определяют по сухому остатку. Образец раствора лиофилизируют и анализируют ЯМР ^1H в D_2O для определения степени замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным альфа-фенилглицинатов натрия.

В соответствии с сухим остатком: [соединение 11]=9,1 мг/г.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным альфа-фенилглицинатов натрия, на сахаридное звено составляет 0,52.

Степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 1,12.

AB. Сопоставительные примеры полисахаридов.

AB1. Полисахарид 1: Декстранметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия.

Полисахарид 1 представляет собой декстранметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия, получаемый из декстрана со средневзвешенной молекулярной массой 10 кг/моль (DP=39, Pharmacosmos) способом, описанным в патентной заявке FR 07/02316, опубликованной под номером FR2914305. В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 0,6.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатов натрия, на сахаридное звено составляет 0,46.

Этот полисахарид соответствует полисахариду 1 заявки FR0901478.

AB2. Полисахарид 2: Декстранметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия.

Полисахарид 2 представляет собой декстранметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия, получаемый из декстрана со средневзвешенной молекулярной массой 5 кг/моль ($\text{DP}=19$, Pharmacosmos) способом, описанным в патентной заявке FR 07/02316, опубликованной под номером FR2914305. В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 1,01.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатов натрия, на сахаридное звено составляет 0,64.

AB3. Полисахарид 3: Декстранметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия.

Полисахарид 3 представляет собой декстранметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия, получаемый из декстрана со средневзвешенной молекулярной массой 5 кг/моль ($\text{DP}=19$, Pharmacosmos) способом, описанным в патентной заявке FR 07/02316, опубликованной под номером FR2914305. В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 0,65.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатов натрия, на сахаридное звено составляет 0,45.

AB4. Полисахарид 4: Декстранметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия.

Полисахарид 4 представляет собой декстранметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия, получаемый из декстрана со средневзвешенной молекулярной массой 10 кг/моль ($\text{DP}=39$, Pharmacosmos) способом, описанным в патентной заявке FR 07/02316, опубликованной под номером FR2914305. В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 1,01.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатов натрия, на сахаридное звено составляет 0,64.

AB5. Полисахарид 5: Декстранметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия.

Полисахарид 5 представляет собой декстранметилкарбоксилат натрия, функционализированный L-фенилаланинатов натрия, получаемый из декстрана со средневзвешенной молекулярной массой 5 кг/моль ($\text{DP}=19$, Pharmacosmos) способом, описанным в патентной заявке FR 07/02316, опубликованной под номером FR2914305. В соответствии с кислотным/щелочным титрованием степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 0,45.

По данным ЯМР ^1H : степень замещения по метилкарбоксилатам, функционализированным L-фенилаланинатов натрия, на сахаридное звено составляет 0,65.

АС. Полианионное соединение.

Полианионное соединение 1. Мальтотриозаметилкарбоксилат натрия

К 8 г (143 ммоль гидроксильных функциональных групп) мальтотриозы (CarboSynth), растворенной в воде при 65°C, добавляют 0,6 г (16 ммоль) боргидрида натрия. Через 30 мин перемешивания добавляют 28 г (238 ммоль) хлорацетата натрия. Затем к этому раствору по каплям добавляют 24 мл 10н. NaOH (240 ммоль), затем нагревают смесь до 65°C в течение 90 мин. Затем к реакционной среде по каплям добавляют 16,6 г (143 ммоль) хлорацетата натрия, а также 14 мл 10н. NaOH (140 ммоль). После 1 часа нагревания смесь разбавляют водой, нейтрализуют уксусной кислотой, затем очищают ультрафильтрацией через мембрану PES 1 кДа против воды. Концентрация соединения конечного раствора определяют по сухому остатку, затем проводят кислотное/щелочное титрование в смеси вода/ацетон 50/50 (об./об.) для определения степени замещения по метилкарбоксилату натрия.

В соответствии с сухим остатком: [полианионное соединение 1]=32,9 мг/г.

В соответствии с кислотным/щелочным титрованием: степень замещения по метилкарбоксилатам натрия на сахаридное звено составляет 1,65.

В. Получение растворов.

B1. Раствор быстродействующего инсулина-аналога Novolog® 100 МЕд./мл.

Этот раствор представляет собой коммерческий раствор инсулина аспарт от Novo Nordisk, поставляемый под названием Novolog®. Этот продукт представляет собой быстродействующий инсулин-аналог аспарт.

B2. Раствор быстродействующего инсулина-аналога Humalog® 100 МЕд./мл.

Этот раствор представляет собой коммерческий раствор инсулина лизпро от Eli Lilly, поставляемый под названием Humalog®. Этот продукт представляет собой быстродействующий инсулин-аналог.

В3. Раствор обычного инсулина человека Actrapid® 100 МЕд./мл.

Этот раствор представляет собой коммерческий раствор инсулина человека от Novo Nordisk, поставляемый под названием Actrapid®. Этот продукт представляет собой обычный инсулин человека.

В4. Раствор обычного инсулина человека Humulin® R 100 МЕд./мл.

Этот раствор представляет собой коммерческий раствор инсулина человека от Eli Lilly, поставляемый под названием Humulin® R. Этот продукт представляет собой обычный инсулин человека.

В5. Получение растворов эксципиентов.

Отбирали неполимерные полианионные соединения на основании их константы диссоциации по отношению к ионам кальция и по отношению к их свойству не дестабилизировать гексамерную форму инсулина.

Касательно константы диссоциации по отношению к ионам кальция, ее определяют так, как указано ниже.

Получают растворы, содержащие 2,5 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl и увеличивающиеся концентрации полианионного соединения (в диапазоне от 0 до 20 мМ). Измеряют потенциал всех этих составов и определяют концентрации свободных ионов кальция в составах. После линеаризации способом Скэтчарда устанавливали константы диссоциации. Эти данные позволяют сравнивать аффинность к Са карбоксилатов и фосфатов разных полианионных соединений.

Касательно их свойства не дестабилизировать гексамерную форму инсулина, это свойство измеряют посредством кругового дихроизма по сравнению с одним инсулином (без анионного соединения или полианионного соединения), см. протоколы экспериментов в экспериментальной части D.

Получение раствора цитрата натрия 1,188 М.

Раствор цитрата натрия получают, растворяя 9,0811 г цитрата натрия (30,9 ммоль) в 25 мл воды в мерной колбе. рН точно доводят до 7,4 добавлением 1 мл 1 М HCl. Фильтруют раствор на фильтре 0,22 мкм.

Получение раствора мета-крезола 130 мМ.

Раствор мета-крезола получают, растворяя 14,114 г мета-крезола (130 ммоль) в 98,64 мл воды в мерной колбе 1 л.

Получение раствора мета-крезола и глицерина (96,6 мМ мета-крезола и 566 мМ глицерина).

73,3 г 130 мМ раствора мета-крезола добавляют к 5,26 г глицерина, а затем разбавляют добавлением 22,25 г воды. Получаемый раствор мета-крезола и глицерина гомогенизируют в течение 30 мин, затем фильтруют через мембрану 0,22 мкм.

Получение 32,7 мМ раствора Tween 20.

Раствор Tween 20 получают, растворяя 2,0079 г Tween 20 (1,636 ммоль) в 50 мл воды в мерной колбе. Раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм.

В6. Получение раствора инсулина человека 500 МЕд./мл.

К 563,6 мг инсулина человека добавляют 15 г воды, затем понижают рН добавлением 5,98 г 0,1н. HCl. После полной солиubilизации инсулина при кислом рН раствор нейтрализуют при рН 7,2 добавлением 8,3 мл 0,1н. NaOH. Затем доводят концентрацию до 500 МЕд./мл добавлением 0,76 г воды. В заключение фильтруют раствор через мембрану 0,22 мкм.

В7. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин лизпро] 2,0 добавляют разные реактивы в количествах, указанных ниже и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 1	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл

Конечный рН доводят до 7,4±0,4.

Прозрачный раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В8. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 1	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъекруемым составом.

Конечный рН доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В9. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[полианионное соединение 1]/[инсулин лизпро] 2,0/2,0/1 разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 1	730 мг
Полианионное лиофилизированное соединение 1	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

V10. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[полианионное соединение 1]/[инсулин лизпро] 2,0/5,5/1 разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 1	730 мг
Лиофилизированное полианионное соединение 1	2000 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

V11. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 2	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
Раствор цитрата натрия 1,188М	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

V12. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[полианионное соединение 1]/[инсулин лизпро] 2,0/2,0/1 разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 2	730 мг
Лиофилизированное полианионное соединение 1	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

V13. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[полианионное соединение 1]/[инсулин лизпро] 2,0/5,5/1 разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 2	730 мг
Лиофилизированное полианионное соединение 1	2000 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B14. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин лизпро] 4 разные реактивы добавляют в указанных количествах:

Соединение 1 в лиофилизированной форме	1460 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B15. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин лизпро] 4 разные реактивы добавляют в указанных количествах:

Соединение 2 в лиофилизированной форме	1460 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B16. Получение раствора инсулина-аналога лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и тартрата натрия.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 80 мМ тартрата натрия разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах:

Соединение 1 в лиофилизированной форме	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
Тартрат натрия	1,552 г

В качестве тартрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B17. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[полианионное соединение 1]/[инсулин лизпро] 2/4/1 разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах:

Соединение 1 в лиофилизированной форме	730 мг
Полианионное соединение 1 в лиофилизированной форме	1460 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B18. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и трифосфата натрия.

Для конечного объема 100 мл состава разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах:

Соединение 1 в лиофилизированной форме	730 мг
Трифосфат натрия	184 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл

В качестве трифосфата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B19. Получение раствора инсулина-аналога лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и тартрата натрия.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 80 мМ тартрата натрия разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах:

Соединение 2 в лиофилизированной форме	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
Тартрат натрия	1,552 г

В качестве тартрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B20. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава, с массовым отношением [соединение 2]/[полианионное соединение 1]/[инсулин лизпро] 2/4/1 разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах:

Соединение 2 в лиофилизированной форме	730 мг
Полианионное соединение 1 в лиофилизированной форме	1460 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B21. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и трифосфата натрия.

Для конечного объема 100 мл состава разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах:

Соединение 2 в лиофилизированной форме	730 мг
Трифосфат натрия	184 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл

В качестве трифосфата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B22. Получение раствора инсулина-аналога (инсулин лизпро) 200 МЕд./мл.

Коммерческий состав инсулина лизпро (Humalog®) концентрировали с использованием центрифужных пробирок AMICON Ultra-15 с порогом пропускания 3 кДа. Сначала пробирки Amicon ополаскивали 12 мл деионизированной воды. Центрифугировали 12 мл коммерческого состава в течение 35 мин при 4000g при 20°C. Измеряли объем ретентата, а также определяли концентрацию. Объединяли все ретентаты и определяли общую концентрацию (>200 МЕд./мл).

Концентрацию этого концентрированного раствора инсулина лизпро довели до 200 МЕд./мл добавлением коммерческого состава инсулина лизпро (Humalog®).

Концентрированный состав инсулина лизпро обеспечивает такие же концентрации эксципиентов (мета-крезола, глицерина, фосфата), как и коммерческий состав 100 МЕд./мл.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B23. Получение раствора инсулина лизпро 200 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин лизпро] 2 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин лизпро 200 МЕд./мл	100 мл
Леофилизат соединения 1	1460 мг
1,188М раствор цитрата натрия	1566 мкл

Конечный pH доводят до 7,4±0,4. Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B24. Получение раствора инсулина лизпро 200 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[полианионное соединение 1]/[инсулин лизпро] 2/2/1 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин лизпро 200 МЕд./мл	100 мл
Леофилизат соединения 1	1460 мг
Леофилизат полианионного соединения 1	1460 мг

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B25. Получение раствора инсулина лизпро 200 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[полианионное соединение 1]/[инсулин лизпро] 2/4/1 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин лизпро 200 МЕд./мл	100 мл
Леофилизат соединения 1	1460 мг
Леофилизат полианионного соединения 1	2920 мг

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B26. Получение раствора инсулина лизпро 200 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[полианионное соединение 1]/[инсулин лизпро] de 2/4/1, разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин лизпро 200 МЕд./мл	100 мл
Леофилизат соединения 2	1460 мг
Леофилизат полианионного соединения 1	2920 мг

Инсулин лизпро 200 МЕд./мл 100 мл

Леофилизат соединения 2 1460 мг

Леофилизат полианионного соединения 1 2920 мг

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B27. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и тартрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин человека] 2 и 80 мМ тартрата разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 500 МЕд./мл	20 мл
Раствор соединения 1 36,01 мг/мл	20,27 мл
Раствор 96,6 мМ мета-крезола/566 мМ глицерина	30 мл
Вода	28,95 мл
Тартрат натрия	1,552 г

В качестве тартрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH составляет $7,4 \pm 0,4$. Этот светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм, затем помещают при 4°C.

B28. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и трифосфата.

Для конечного объема 100 мл состава разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 500 МЕд./мл	20 мл
Раствор соединения 1 36,01 мг/мл	20,27 мл
Раствор 96,6 мМ мета-крезола/566 мМ глицерина	30 мл
Вода	28,95 мл
Трифосфат натрия	184 мг

В качестве трифосфата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH составляет $7,4 \pm 0,4$. Этот светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм, затем помещают при 4°C.

B29. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и тартрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин человека] 2 и 80 мМ тартрата разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 500 МЕд./мл	20 мл
Раствор соединения 2 36,01 мг/мл	20,27 мл
Раствор 96,6 мМ мета-крезола/566 мМ глицерина	30 мл
Вода	28,95 мл
Тартрат натрия	1,552 г

В качестве тартрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH составляет $7,4 \pm 0,4$. Этот светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм, затем помещают при 4°C.

V30. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и трифосфата.

Для конечного объема 100 мл состава разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 500 МЕд./мл	20 мл
Раствор соединения 2 36,01 мг/мл	20,27 мл
Раствор 96,6 мМ мета-крезола/566 мМ глицерина	30 мл
Вода	28,95 мл
Трифосфат натрия	184 мг

В качестве трифосфата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъекруемым составом.

Конечный pH составляет $7,4 \pm 0,4$. Этот светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм, затем помещают при 4°C.

V31. Получение раствора инсулина человека 200 МЕд./мл.

Коммерческий состав инсулина человека (Humulin®) концентрировали с использованием центрифужных пробирок AMICON Ultra-15 с порогом пропускания 3 кДа. Сначала пробирки Amicon ополаскивали 12 мл деионизированной воды.

Центрифугировали 12 мл коммерческого состава в течение 35 мин при 4000g при 20°C. Измеряли объем ретентата, а также определяли концентрацию. Объединяли все ретентаты и определяли общую концентрацию (>200 МЕд./мл).

Концентрацию этого концентрированного раствора инсулина человека доводили до 200 МЕд./мл добавлением коммерческого состава инсулина человека (Humulin® R). Концентрированный состав инсулина человека обеспечивает такие же концентрации эксципиентов (мета-крезола, глицерина), как и коммерческий состав 100 МЕд./мл.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

V32. Получение раствора инсулина человека 200 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин человека] 2 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 200 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	1460 мг
1,188М раствор цитрата натрия	1566 мкл

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

V33. Получение раствора инсулина человека 200 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[полианионное соединение 1]/[инсулин человека] 2/2/1 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 200 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	1460 мг
Лиофилизат полианионного соединения 1	1460 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

V34. Получение раствора инсулина человека 200 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[полианионное соединение 1]/[инсулин человека] 2/4/1 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 200 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	1460 мг
Лиофилизат полианионного соединения 1	2920 мг

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъекруемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В35. Получение раствора инсулина человека 200 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин человека] 2 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 200 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	1460 мг
1,188М раствор цитрата натрия	1566 мкл

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В36. Получение раствора инсулина человека 200 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[полианионное соединение 1]/[инсулин человека] 2/2/1 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 200 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	1460 мг
Лиофилизат полианионного соединения 1	1460 мг

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъеклируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В37. Получение раствора инсулина человека 200 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и полианионного соединения 1.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[полианионное соединение 1]/[инсулин человека] 2/4/1 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 200 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	1460 мг
Лиофилизат полианионного соединения 1	2920 мг

Полианионное соединение 1 можно использовать в кислотной форме или щелочной форме в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъеклируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В38. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин человека] 2 и 9,3 мМ цитрата разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 500 МЕд./мл	20 мл
Раствор соединения 2 36,01 мг/мл	20,27 мл
Раствор 96,6 мМ мета-крезола/566 мМ глицерина	30 мл
Вода	28,95 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъеклируемым составом.

Конечный pH составляет $7,4 \pm 0,4$. Этот светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм, затем помещают при 4°C.

В39. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин человека] 2 и 9,3 мМ цитрата разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 500 МЕд./мл	20 мл
Раствор соединения 1 36,01 мг/мл	27 мл
Раствор 96,6 мМ мета-крезола/566 мМ глицерина	30 мл
Вода	28,95 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъеклируемым составом.

Конечный pH составляет $7,4 \pm 0,4$. Этот светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм, затем помещают при 4°C.

В40. Получение раствора инсулина аспарт 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин аспарт] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 1	730 мг
Коммерческий раствор Novolog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В41. Раствор быстродействующего инсулина-аналога Apidra® 100 МЕд./мл.

Этот раствор представляет собой коммерческий раствор инсулина глулизин от Sanofi-Aventis, поставляемый под названием Apidra®. Этот продукт является быстродействующим инсулином-аналогом.

В42. Получение раствора инсулина глулизин 100 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин глулизин] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 1	730 мг
Коммерческий раствор Apidra® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В43. Получение раствора инсулина аспарт 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин аспарт] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 2	730 мг
Коммерческий раствор Novolog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В44. Получение раствора инсулина глулизин 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин глулизин] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 2	730 мг
Коммерческий раствор Apidra® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В45. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 5 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 5]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 5	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В46. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 6 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 6]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 6	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В47. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 7 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 7]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 7	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В48. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 8 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 8]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 8	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В49. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 9 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 9]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 9	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

В50. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 5 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 5]/[инсулин человека] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 5	730 мг
Коммерческий раствор Humulin® R 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до 7,4±0,4.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В51. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 6 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 6]/[инсулин человека] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 6	730 мг
Коммерческий раствор Humulin® R 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъеклируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B52. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 7 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 7]/[инсулин человека] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 7	730 мг
Коммерческий раствор Humulin® R 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъеклируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B53. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 8 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 8]/[инсулин человека] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 8	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъеклируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B54. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 9 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 9]/[инсулин человека] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 9	730 мг
Коммерческий раствор Humulin® R 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъеклируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B55. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 2.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин человека] 2,0 разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 2	730 мг
Коммерческий раствор Humulin® R 100 МЕд./мл	100 мл

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B56. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 7.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 7]/[инсулин человека] 2,0 разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 7	730 мг
Коммерческий раствор Humulin® R 100 МЕд./мл	100 мл

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B57. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 10 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 10]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата, разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 10	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B58. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 11 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 11]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 11	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

B59. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 10 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 10]/[инсулин человека] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 10	730 мг
Коммерческий раствор Humulin® R 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B60. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 11 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 11]/[инсулин человека] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 11	730 мг
Коммерческий раствор Humulin® R 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B61. Получение раствора инсулина аспарт 200 МЕд./мл.

Коммерческий состав инсулина аспарт (Novolog®) концентрировали с использованием центрифужных пробирок AMICON Ultra-15 с порогом пропускания 3 кДа. Сначала пробирки Amicon ополаскивали 12 мл деионизированной воды. 12 мл коммерческого состава центрифугировали в течение 35 мин при 4000g при 20°C.

Измеряли объем ретентата, а также определяли концентрацию. Объединяли все ретентаты и определяли общую концентрацию (>200 МЕд./мл).

Концентрация этого концентрированного раствора инсулина аспарт довели до 200 МЕд./мл добавлением коммерческого состава инсулина аспарт (Novolog®).

Концентрированный состав инсулина аспарт обеспечивает такие же концентрации эксципиентов (мета-крезола, глицерина), как и коммерческий состав 100 МЕд./мл.

Изменяя время центрифугирования и конечное разбавление коммерческим составом, можно получать аналогичным способом составы инсулина аспарт 300, 400 или 500 МЕд./мл.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B62. Получение раствора инсулина глулизин 200 МЕд./мл.

Коммерческий состав инсулина глулизин (Apidra®) концентрировали с использованием центрифужных пробирок AMICON Ultra-15 с порогом пропускания 3 кДа. Сначала пробирки Amicon ополаскивали 12 мл деионизированной воды. 12 мл коммерческого состава центрифугировали в течение 35 мин

при 4000g при 20°C. Измеряли объем ретентата, а также определяли концентрацию. Объединяли все ретентаты и определяли общую концентрацию (>200 МЕд./мл).

Концентрацию этого концентрированного раствора инсулина глулизин доводят 200 МЕд./мл добавлением коммерческого состава инсулина глулизин (Apidra®).

Концентрированный состав инсулина глулизин обеспечивает такие же концентрации эксципиентов (мета-крезола, NaCl, TRIS), как и коммерческий состав 100 МЕд./мл.

Изменяя время центрифугирования и конечное разбавление коммерческим составом, можно получать аналогичным способом составов инсулина глулизин 300, 400 или 500 МЕд./мл.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B63. Получение раствора инсулина аспарт 200 МЕд./мл в присутствии 14,6 мг/мл соединения 1 и 18,6 мМ цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин аспарт] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизат соединения 1	1460 мг
Инсулин аспарт 200 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	1566 мкл

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B64. Получение раствора инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт или инсулина глулизин 300, 400 и 500 МЕд./мл.

Получают концентрированные составы инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт или инсулина глулизин 300, 400 или 500 МЕд./мл (а также все промежуточные концентрации) на основании протокола примера B62 относительно получения раствора инсулина глулизин 200 МЕд./мл. Коммерческий состав инсулина концентрируют с использованием центрифужных пробирок AMICON Ultra-15 с порогом пропускания 3 кДа. Сначала пробирки Amicon ополаскивали 12 мл деионизированной воды. 12 мл коммерческого состава центрифугируют при 4000g и 20°C. Изменяя время центрифугирования, можно регулировать конечную концентрацию инсулина в составе. Измеряют объем ретентата, а также определяют концентрацию. Объединяют все ретентаты и определяют общую концентрацию (>300, 400 или 500 МЕд./мл).

Концентрацию такого концентрированного раствора инсулина доводят до желаемых концентраций (например, 300, 400 или 500 МЕд./мл) добавлением состава инсулина (Humulin® R, Novolog®, Humalog® или Apidra®). Концентрированный состав концентрированного инсулина обеспечивает такие же концентрации эксципиентов, как и коммерческий состав 100 МЕд./мл.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B65. Получение раствора инсулина глулизин 200 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин глулизин] 2 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизат соединения 1	1460 мг
Инсулин аспарт 200 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	1566 мкл

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B66. Получение раствора инсулина аспарт 300 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин аспарт] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 300 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	2190 мг
Цитрат натрия	720 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B67. Получение раствора инсулина глулизин 300 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин глулизин] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 300 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	2190 мг
Цитрат натрия	720 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B68. Получение раствора инсулина аспарт а 400 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин аспарт] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 400 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	2920 мг
Цитрат натрия	960 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B69. Получение раствора инсулина глулизин 400 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин глулизин] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 400 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	2920 мг
Цитрат натрия	960 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B70. Получение раствора инсулина аспарт 500 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин аспарт] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 500 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	3650 мг
Цитрат натрия	1200 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B71. Получение раствора инсулина глулизин 500 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин глулизин] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 500 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	3650 мг
Цитрат натрия	1200 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B72. Получение раствора инсулина человека 300 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин человека] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 300 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	2190 мг
Цитрат натрия	720 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B73. Получение раствора инсулина лизпро 300 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин лизпро] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 300 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	2190 мг
Цитрат натрия	720 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$. Светлый раствор

фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B74. Получение раствора инсулина человека 400 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин человека]

2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 400 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	2920 мг
Цитрат натрия	960 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B75. Получение раствора инсулина лизпро 400 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин лизпро] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 400 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	2920 мг
Цитрат натрия	960 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B76. Получение раствора инсулина человека 500 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин человека] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 500 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	3650 мг
Цитрат натрия	1200 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B77. Получение раствора инсулина лизпро 500 МЕд./мл в присутствии соединения 1 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 1]/[инсулин лизпро] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 500 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 1	3650 мг
Цитрат натрия	1200 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B78. Получение раствора инсулина лизпро 200 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин лизпро] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 200 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	1460 мг
1,188М раствор цитрата натрия	1566 мкл

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B79. Получение раствора инсулина аспарт 200 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин аспарт] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 200 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	1460 мг
1,188М раствор цитрата натрия	1566 мкл

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B80. Получение раствора инсулина глулизин 200 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин глулизин] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин глулизин 200 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	1460 мг
1,188М раствор цитрата натрия	1566 мкл

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В81. Получение раствора инсулина аспарт 300 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин аспарт] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 300 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	2190 мг
Цитрат натрия	720 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В82. Получение раствора инсулина глулизин 300 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин глулизин] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 300 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	2190 мг
Цитрат натрия	720 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В83. Получение раствора инсулина аспарт 400 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин аспарт] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 400 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	2920 мг
Цитрат натрия	960 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В84. Получение раствора инсулина глулизин 400 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин глулизин] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 400 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	2920 мг
Цитрат натрия	960 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В85. Получение раствора инсулина аспарт 500 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин аспарт] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 500 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	3650 мг
Цитрат натрия	1200 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В86. Получение раствора инсулина глулизин 500 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин глулизин] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 500 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	3650 мг
Цитрат натрия	1200 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В87. Получение раствора инсулина человека 300 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин человека] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин аспарт 300 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	2190 мг
Цитрат натрия	720 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В88. Получение раствора инсулина лизпро 300 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин лизпро] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин лизпро 300 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	2190 мг
Цитрат натрия	720 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В89. Получение раствора инсулина человека 400 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин человека] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 400 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	2920 мг
Цитрат натрия	960 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В90. Получение раствора инсулина лизпро 400 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин лизпро] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин лизпро 400 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	2920 мг
Цитрат натрия	960 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В91. Получение раствора инсулина человека 500 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин человека] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин человека 500 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	3650 мг
Цитрат натрия	1200 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В92. Получение раствора инсулина лизпро 500 МЕд./мл в присутствии соединения 2 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 2]/[инсулин лизпро] 2,0 разные реактивы смешивают в указанных ниже количествах:

Инсулин лизпро 500 МЕд./мл	100 мл
Лиофилизат соединения 2	3650 мг
Цитрат натрия	1200 мг

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В93. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 3 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 3]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 3	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъектируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

В94. Получение раствора инсулина лизпро 100 МЕд./мл в присутствии соединения 4 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 4]/[инсулин лизпро] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 4	730 мг
Коммерческий раствор Humalog® 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B95. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 3 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 3]/[инсулин человека] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 3	730 мг
Коммерческий раствор Humulin® R 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

B96. Получение раствора инсулина человека 100 МЕд./мл в присутствии соединения 4 и цитрата.

Для конечного объема 100 мл состава с массовым отношением [соединение 4]/[инсулин человека] 2,0 и концентрацией 9,3 мМ цитрата разные реактивы добавляют в указанных ниже количествах и в следующем ниже порядке:

Лиофилизированное соединение 4	730 мг
Коммерческий раствор Humulin® R 100 МЕд./мл	100 мл
1,188М раствор цитрата натрия	783 мкл

В качестве цитрата можно использовать кислотную форму или щелочную форму в форме соли натрия, соли калия или другой соли, совместимой с инъецируемым составом.

Конечный pH доводят до $7,4 \pm 0,4$.

Светлый раствор фильтруют через мембрану 0,22 мкм и хранят при 4°C.

C. Фармакодинамика и фармакокинетика.

C1. Протокол измерения фармакодинамики растворов инсулина.

12 домашних свиней массой приблизительно 50 кг, которым предварительно вводили катетер в яремную вену, лишают корма за 2,5 ч до начала эксперимента. За 1 ч до этого проводили инъекцию инсулина, 3 отбора образцов крови для определения фонового уровня глюкозы и инсулина.

Проводили подкожную инъекцию инсулина в дозе 0,09 МЕд./кг для инсулина лизпро и в дозе 0,125 МЕд./кг для инсулина человека и инсулина аспарт в шею, под ухом животного с помощью шприца-ручки с инсулином Novopen, оснащенного иглой 31 G.

Затем проводят отбор образцов крови каждые 4 мин в течение 20 мин, затем каждые 10 мин до 3 ч. После каждого отбора образца катетер ополаскивают разбавленным раствором гепарина.

Отбирают каплю крови для поредения гликемии посредством глюкометра.

Затем проводят построение кривых фармакодинамики глюкозы и определяют время, необходимое для достижения минимального содержания глюкозы в крови для каждой свиньи, и обозначают как $T_{\min}$ глюкозы. Затем рассчитывают среднее значение $T_{\min}$ глюкозы.

Оставшуюся кровь собирают в сухую пробирку и центрифугируют для выделения сыворотки. Для каждой свиньи измеряют содержание инсулина в образцах сыворотки иммуноферментным способом ELISA в формате сэндвич.

Затем проводят построение кривых фармакокинетики. Определяют время, необходимое для достижения максимальной концентрации инсулина в сыворотке каждой свиньи, и выражают как $T_{\max}$ инсулина. Затем рассчитывают среднее значение $T_{\max}$ инсулина.

C2. Результаты фармакодинамики и фармакокинетики растворов инсулина примеров B2 и B8.

Пример	Инсулин	Соединение	Полианионное соединение	Число свиней
B2	Лизпро	-	-	11
B8	Лизпро	1	9,3 мМ цитрат	10

Результаты фармакодинамики, получаемые с составами, описанными в примерах B2 и B8, представлены на фиг. 1. В соответствии с изобретением анализ этих кривых демонстрирует, что состав примера B8, содержащий соединение 1 и 9,3 мМ цитрата в качестве эксципиента (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру B8, $T_{\min}$ глюкозы = 30 ± 11 мин), позволяет получать более быстрое

действие, чем действие коммерческого состава Humalog® примера В2 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В2, $T_{\min}$ глюкозы= 44 ± 14 мин).

Результаты фармакокинетики, получаемые с составами, описанными в примерах В2 и В8, представлены на фиг. 2. В соответствии с изобретением анализ этих кривых демонстрирует, что состав примера В8, содержащий соединение 1 и 9,3 мМ цитрата в качестве эксципиентов (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В8, $T_{\max}$ инсулина= 11 ± 6 мин), приводит к более быстрому всасыванию инсулина лизпро, чем коммерческий состав Humalog® примера В2 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В2, $T_{\max}$ инсулина= 18 ± 8 мин).

С3. Результаты фармакодинамики и фармакокинетики растворов инсулина примеров В2 и В10.

Пример	Инсулин	Соединение	Полианионное соединение	Число свиней
В2	Лизпро	-	-	11
В10	Лизпро	1	Полианионное соединение 1	11

Результаты фармакодинамики, получаемые с составами, описанными в примерах В2 и В10, представлены на фиг. 3. В соответствии с изобретением анализ этих кривых демонстрирует, что состав примера В10, содержащий 20 мг/мл соединения 1 и полианионного соединения 1 в качестве эксципиентов (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В10, $T_{\min}$ глюкозы= 33 ± 13 мин), позволяет получать более быстрое действие, чем действие коммерческого состава Humalog® примера В2 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В2, $T_{\min}$ глюкозы= 44 ± 14 мин).

Результаты фармакокинетики, получаемые с составами, описанными в примерах В2 и В10, представлены на фиг. 4. В соответствии с изобретением анализ этих кривых демонстрирует, что состав примера В10, содержащий 20 мг/мл соединения 1 и полианионного соединения 1 в качестве эксципиентов (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В10, $T_{\max}$ инсулина= 15 ± 9 мин), приводит к более быстрому всасыванию инсулина лизпро, чем коммерческий состав Humalog® примера В2 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В2, $T_{\max}$ инсулина= 18 ± 8 мин).

С4. Результаты фармакодинамики и фармакокинетики растворов инсулина примеров В2 и В7.

Пример	Инсулин	Соединение	Полианионное соединение	Число свиней
В2	Лизпро	-	-	12
В7	Лизпро	1	-	12

Результаты фармакодинамики, получаемые с составами, описанными в примерах В2 и В7, представлены на фиг. 5. В соответствии с изобретением анализ этих кривых демонстрирует, что состав примера В7, содержащий соединение 1 в качестве эксципиента (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В7, $T_{\min}$ глюкозы= 41 ± 16 мин), приводит к более быстрому началу действия, чем начало действия коммерческого состава Humalog® примера В2 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В2, $T_{\min}$ глюкозы= 50 ± 14 мин).

Результаты фармакокинетики, получаемые с составами, описанными в примерах В2 и В7, представлены на фиг. 6. Анализ этих кривых демонстрирует, что состав, содержащий соединение 1 в качестве эксципиента (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В2, $T_{\max}$ инсулина= 21 ± 10 мин), не приводит к более быстрому всасыванию инсулина лизпро по сравнению с коммерческим составом Humalog® примера В2 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В2 ($T_{\max}$ инсулина= 20 ± 9 мин)). Таким образом, одного соединения 1 недостаточно для того, чтобы вызывать значительное увеличение фармакокинетики инсулина лизпро.

С5. Результаты фармакодинамики и фармакокинетики растворов инсулина примеров В1 и В3.

Пример	Инсулин	Соединение	Полианионное соединение	Число свиней
В1	Аспарт	-	-	11
В3	Человека	-	-	11

Результаты фармакодинамики, получаемые с составами, описанными в примерах В1 и В3, представлены на фиг. 7. Анализ этих кривых демонстрирует, что состав инсулина человека примера В3 (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В3, $T_{\min}$ глюкозы= 61 ± 31 мин) обладает более медленным действием, чем действие коммерческого состава инсулина аспарт примера В1 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В1, $T_{\min}$ глюкозы= 44 ± 13 мин).

Результаты фармакокинетики, получаемые с составами, описанными в примерах В1 и В3, представлены на фиг. 8. Анализ этих кривых демонстрирует, что состав только инсулина человека примера В3 (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В3, $T_{\max}$ инсулина= 36 ± 33 мин) также приводит к более медленному всасыванию, чем коммерческий состав инсулина аспарт (Novolog®) примера В1 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В1, $T_{\max}$ инсулина= 28 ± 13 мин).

Эти результаты соответствуют результатам, приведенным в литературе касательно увеличения скорости снижения гликемии и всасывания инсулина для быстродействующего инсулина-аналога по сравнению с инсулином человека.

С6. Результаты фармакодинамики и фармакокинетики растворов инсулина примеров В1 и В39.

Пример	Инсулин	Соединение	Полианионное соединение	Число свиней
В1	Аспарт	-	-	14
В39	Человека	1	9,3 мМ цитрата	5

Результаты фармакодинамики, получаемые с составами, описанными в примерах В1 и В39, представлены на фиг. 9. Анализ этих кривых демонстрирует, что состав на основе инсулина человека примера В39, содержащий соединение 1 и 9,3 мМ цитрата в качестве эксципиентов, (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В39, $T_{\min}$ глюкозы= 46 ± 9 мин) позволяет получать действие, аналогичное действию коммерческого состава инсулина аспарт (Novolog®) примера В1 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В1, $T_{\min}$ глюкозы= 53 ± 24 мин).

Результаты фармакокинетики, получаемые с составами, описанными в примерах В1 и В3 9, представлены на фиг. 10. Анализ этих кривых демонстрирует, что состав примера В39, содержащий соединение 1 и 9,3 мМ цитрата в качестве эксципиентов (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В39, $T_{\max}$ инсулина= 20 ± 7 мин), приводит к всасыванию инсулина человека, аналогичному всасыванию коммерческого состава инсулина аспарт (Novolog®) примера В1 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В1, $T_{\max}$ инсулина= 22 ± 10 мин).

Вследствие того, что параметры времени инсулина аспарт (Novolog®) в примерах С5 и С6 являются аналогичными, путем экстраполяции можно сделать вывод, что состав примера В39 приводит к увеличению скорости снижения гликемии и всасывания инсулина человека по сравнению с коммерческим составом инсулина человека (пример В3).

С7. Результаты фармакодинамики и фармакокинетики растворов инсулина примеров В2 и В11.

Пример	Инсулин	Соединение	Полианионное соединение	Число свиней
В2	Лизпро	-	-	26
В11	Лизпро	2	9,3 мМ цитрата	23

Результаты фармакодинамики, получаемые с составами, описанными в примерах В2 и В11, представлены на фиг. 13. В соответствии с изобретением анализ этих кривых демонстрирует, что состав примера В11, содержащий соединение 2 и 9,3 мМ цитрата в качестве эксципиентов (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В11, $T_{\min}$ глюкозы - 32 ± 10 мин), позволяет получать более быстрое действие, чем действие коммерческого состава Humalog® примера В2 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В2, $T_{\min}$ глюкозы= 41 ± 21 мин).

Результаты фармакокинетики, получаемые с составами, описанными в примерах В2 и В11, представлены на фиг. 14. В соответствии с изобретением анализ этих кривых демонстрирует, что состав примера В11, содержащий соединение 2 и 9,3 мМ цитрата в качестве эксципиентов (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В11, $T_{\max}$ инсулина= 13 ± 5 мин), приводит к более быстрому всасыванию инсулина лизпро, чем коммерческий состав Humalog® примера В2 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В2, $T_{\max}$ инсулина= 22 ± 13 мин).

С8. Результаты фармакодинамики и фармакокинетики растворов инсулина примеров В1 и В38.

Пример	Инсулин	Соединение	Полианионное соединение	Число свиней
В1	Аспарт	-	-	37
В38	Человека	2	9,3 мМ цитрата	31

Результаты фармакодинамики, получаемые с составами, описанными в примерах В1 и В38, представлены на фиг. 15. Анализ этих кривых демонстрирует, что состав на основе инсулина человека примера В38, содержащий соединение 2 и 9,3 мМ цитрата в качестве эксципиентов, (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В102, $T_{\min}$ глюкозы= 47 ± 30 мин) позволяет получать действие, аналогичное действию коммерческого состава инсулина аспарт (Novolog®) примера В1 (кривая, постро-

енная с треугольниками, соответствующая примеру В1, $T_{\min}$ глюкозы= 47 ± 15 мин).

Результаты фармакокинетики, получаемые с составами, описанными в примерах В1 и В38, представлены на фиг. 16. Анализ этих кривых демонстрирует, что состав примера В38 содержащий соединение 2 и 9,3 мМ цитрата в качестве эксципиентов (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В38, $T_{\max}$ инсулина= 22 ± 21 мин), приводит к всасыванию инсулина человека, аналогичному всасыванию коммерческого состава инсулина аспарт (Novolog®) примера В1 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В1, $T_{\max}$ инсулина= 19 ± 12 мин).

Вследствие того, что параметры времени инсулина аспарт (Novolog®) в примерах С5 и С8 являются близкими, путем экстраполяции можно сделать вывод, что состав примера В38 приводит к увеличению скорости снижения гликемии и всасывания инсулина человека по сравнению с коммерческим составом инсулина человека (пример В3).

С9. Результаты фармакодинамики и фармакокинетики растворов инсулина примеров В1 и В53.

Пример	Инсулин	Соединение	Полианионное соединение	Число свиней
В1	Аспарт	-	-	12
В53	Человека	Соединение 8	9,3 мМ цитрата	8

Результаты фармакодинамики, получаемые с составами, описанными в примерах В1 и В53, представлены на фиг. 17. Анализ этих кривых демонстрирует, что состав на основе инсулина человека примера В53, содержащий соединение 8 и 9,3 мМ цитрата в качестве эксципиентов (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В53, $T_{\min}$ глюкозы= 63 ± 36 мин), позволяет получать действие почти такое же быстрое, как действие коммерческого состава инсулина аспарт (Novolog®) примера В1 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В1, $T_{\min}$ глюкозы= 53 ± 19 мин).

Результаты фармакокинетики, получаемые с составами, описанными в примерах В1 и В53, представлены на фиг. 18. Анализ этих кривых демонстрирует, что состав примера В53, содержащий соединение 8 и 9,3 мМ цитрата в качестве эксципиентов (кривая, построенная с квадратами, соответствующая примеру В53, $T_{\max}$ инсулина= 19 ± 12 мин), приводит к всасыванию инсулина человека, аналогичному всасыванию коммерческого состава инсулина аспарт (Novolog®) примера В1 (кривая, построенная с треугольниками, соответствующая примеру В1, $T_{\max}$ инсулина= 19 ± 6 мин).

Вследствие того, что параметры времени инсулина аспарт (Novolog®) в примерах С5 и С9 являются близкими, путем экстраполяции можно сделать вывод, что состав примера В53 приводит к увеличению скорости снижения гликемии и всасывания инсулина человека по сравнению с коммерческим составом инсулина человека (пример В3).

Д. Круговой дихроизм.

Д1. Состояние ассоциации инсулина лизпро, оцениваемое посредством кругового дихроизма в присутствии соединения 1.

Круговой дихроизм позволяет исследовать вторичную и четвертичную структуру инсулина. Мономеры инсулина самоорганизуются в димеры и гексамеры. Гексамер является наиболее физически и химически стабильной формой инсулина. Существует две гексамерные формы: форма R6 и форма Т6. Инсулин лизпро дает очень сильный сигнал CD при 251 нм, характерный для гексамерной формы R6 (наиболее стабильной формы). Потеря сигнала CD при 251 нм связана с дестабилизацией гексамера (и, таким образом, первым признаком преобразования гексамера в димер).

EDTA и смесь EDTA/цитрат полностью разрушают структуру формы R6 инсулина лизпро (фиг. 11). Таким образом, EDTA обладает заметным эффектом в отношении гексамера.

В противоположность этому один цитрат, одно соединение 1, а также смесь соединение 1/цитрат и соединение 1/полианионное соединение 1 практически не оказывают влияния на сигнал CD при 251 нм. Эти соединения практически не оказывают какого-либо влияния на структуру R6 гексамера и тем более на гексамерную структуру.

Д2. Состояние ассоциации инсулина человека, оцениваемое посредством кругового дихроизма в присутствии соединения 1.

Круговой дихроизм позволяет исследовать вторичную и четвертичную структуру инсулина. Мономеры инсулина самоорганизуются в димеры и гексамеры. Гексамер является наиболее физически и химически стабильной формой инсулина. Сигнал CD при 275 нм является характерным для гексамерной формы инсулина (сигнал гексамера около -300° , сигнал димера в диапазоне от -200 до -250° и сигнал мономера ниже -200°). Таким образом, потеря сигнала CD при 275 нм является характерной для дестабилизации гексамера до димеров или мономеров.

EDTA и комбинация EDTA/цитрата оказывают очень заметное влияние на гексамерную структуру инсулина человека (полная диссоциация гексамера до димеров, фиг. 12). В противоположность этому один цитрат, одно соединение 1, одно полианионное соединение 1, так же как и комбинации соединение 1/цитрат и соединение 1/полианионное соединение 1, не оказывают влияния на гексамерную структуру

инсулина человека. В отличие от EDTA для составов инсулина человека, содержащих соединение 1 и цитрат или полианионное соединение 1, не выявляют диссоциации гексамера инсулина человека.

D3. Состояние ассоциации инсулина лизпро, оцениваемое посредством кругового дихроизма в присутствии соединений 1-11.

Круговой дихроизм позволяет исследовать вторичную и четвертичную структуру инсулина. Мономеры инсулина самоорганизуются в димеры и гексамеры. Гексамер является наиболее физически и химически стабильной формой инсулина. Существует две гексамерные формы: форма R6 и форма T6. Инсулин лизпро дает очень сильный сигнал CD при 251 нм, характерный для гексамерной формы R6 (наиболее стабильной формы). Потеря сигнала CD при 251 нм связана с дестабилизацией гексамера (и, таким образом, первым признаком трансформации гексамера в димер). Получаемые результаты представлены на фиг. 19.

На этой фигуре:

по оси абсцисс описано:

- A: инсулин лизпро (100 МЕд./мл),
 - B: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 2,
 - C: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 2 + 9,3 мМ цитрата,
 - D: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 1,
 - E: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 1 + 9,3 мМ цитрата,
 - F: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 3,
 - G: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 3 + 9,3 мМ цитрата,
 - H: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 4,
 - I: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 4 + 9,3 мМ цитрата,
 - J: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 5,
 - K: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 5 + 9,3 мМ цитрата,
 - L: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 6,
 - M: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 6 + 9,3 мМ цитрата,
 - N: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 7,
 - O: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 7 + 9,3 мМ цитрата,
 - P: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 8,
 - Q: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 8 + 9,3 мМ цитрата,
 - R: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 9,
 - S: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 9 + 9,3 мМ цитрата,
 - T: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 10,
 - U: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 10 + 9,3 мМ цитрата,
 - V: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 11,
 - W: инсулин лизпро + 7,3 мг/мл соединения 11 + 9,3 мМ цитрата;
- по оси ординат сигнал кругового дихроизма при 21 нм (град·см²/дмоль).

Одни соединения 1-11, так же как и соединения 1-11 в сочетании с цитратом, не оказывают влияния на сигнал CD при 251 нм инсулина лизпро. Соединения 1-11 не оказывают какого-либо влияния на структуру R6 гексамера и тем более на гексамерную структуру инсулина лизпро.

D4. Состояние ассоциации инсулина человека, оцениваемое посредством кругового дихроизма в присутствии соединений 1-11.

Круговой дихроизм позволяет исследовать вторичную и четвертичную структуру инсулина. Мономеры инсулина самоорганизуются в димеры и гексамеры. Гексамер является наиболее физически и химически стабильной формой инсулина. Сигнал CD при 275 нм является характерным для гексамерной формы инсулина (сигнал гексамера около -300°, сигнал димера в диапазоне от -200 до -250° и сигнал мономера ниже -200°). Таким образом, потеря сигнала CD при 275 нм является характерной для дестабилизации гексамера до димеров или мономеров. Получаемые результаты представлены на фиг. 20.

На этой фигуре:

по оси абсцисс описано:

- A: инсулин человека (100 МЕд./мл),
- B: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 2,
- C: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 2 + 9,3 мМ цитрата,
- D: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 1,
- E: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 1 + 9,3 мМ цитрата,
- F: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 3,
- G: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 3 + 9,3 мМ цитрата,
- H: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 4,
- I: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 4 + 9,3 мМ цитрата,
- J: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 5,
- K: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 5 + 9,3 мМ цитрата,

L: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 6,
 M: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 6 + 9,3 мМ цитрата,
 N: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 7,
 O: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 7 + 9,3 мМ цитрата,
 P: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 8,
 Q: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 8 + 9,3 мМ цитрата,
 R: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 9,
 S: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 9 + 9,3 мМ цитрата,
 T: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 10,
 U: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 10 + 9,3 мМ цитрата,
 V: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 11,
 W: инсулин человека + 7,3 мг/мл соединения 11 + 9,3 мМ цитрата;
 по оси ординат:

сигнал кругового дихроизма при 275 нм (град·см²/дмоль).

Одни соединения 1-11, так же как и соединения 1-11 в сочетании с цитратом, не оказывают влияния на сигнал CD при 275 нм инсулина человека. Таким образом, соединения 1-11 не оказывают какого-либо влияния на гексамерную структуру инсулина человека.

Е. Растворение инсулина человека и инсулина-аналога в изоэлектрической точке.

Е1. Растворение инсулина человека в его изоэлектрической точке.

Изоэлектрическая точка инсулина человека составляет 5,3. При этом значении pH 5,3 инсулин человека выпадает в осадок. Проводили испытание, демонстрирующее образование комплекса инсулина человека с разными соединениями, в изоэлектрической точке. Если существует взаимодействие, то инсулин можно растворять в его изоэлектрической точке.

Получают раствор инсулина человека 200 МЕд./мл. Получают растворы соединений в разных концентрациях (8, 30 или 100 мг/мл) в воде. Получают эквимольную смесь (50/50) раствора инсулина человека и раствора соединения для того, чтобы приводить ее к раствору, содержащему 100 МЕд./мл инсулина человека, и с желаемой концентрацией соединения (4, 15 или 50 мг/мл). pH разных растворов доводят до pH 5,3 добавлением 200 мМ уксусной кислоты.

Документируют внешний вид раствора. Если раствор является мутным, соединение в тестируемой концентрации не обеспечивает солубилизацию инсулина человека. Если раствор является прозрачным, соединение обеспечивает солубилизацию инсулина человека в тестируемой концентрации. Таким образом, можно определять концентрацию соединения, необходимую для растворения инсулина человека в его изоэлектрической точке. Чем ниже концентрация, тем большую роль играет аффинность соединения к инсулину человека.

Получаемые результаты представлены в табл. 3. Результаты демонстрируют, что соединения и полисахариды не обладают одинаковыми свойствами в отношении растворения инсулина человека.

Таблица 3

Соединения (примеры) или полисахариды (противопоставительные примеры)	Растворение инсулина человека 100 МЕд./мл на 4 мг/мл соединения	Растворение инсулина человека 100 МЕд./мл на 15 мг/мл соединения	Растворение инсулина человека 100 МЕд./мл на 50 мг/мл соединения
Противопоставительные примеры			
Полисахарид 1	Да	Да	Да
Полисахарид 4	Да	Да	Да
Полисахарид 3	Да	Да	Да

Полисахарид 2	Да	Да	Да
Полисахарид 5	Да	Да	Да
Примеры			
Соединение 1	Нет	Нет	Да
Соединение 2	Нет	Нет	Да
Соединение 3	Нет	Нет	Да
Соединение 4	Нет	Нет	Да
Соединение 6	Нет	Нет	Да
Соединение 8	Нет	Нет	Да
Соединение 9	Нет	Нет	Да
Соединение 10	Нет	Нет	Да

E2. Растворение инсулина лизпро в его изоэлектрической точке.

Изоэлектрическая точка инсулина человека составляет 5,3. При этом значении pH 5,3 инсулин человека выпадает в осадок. Проводили испытание, демонстрирующее образование комплекса инсулина человека с разными соединениями, в изоэлектрической точке. Если существует взаимодействие, то инсулин можно растворять в его изоэлектрической точке.

Коммерческий состав инсулина лизпро (Humalog®) подвергают диализу против 1 мМ буфера PO₄ (pH 7). После диализа концентрация инсулина лизпро составляет приблизительно 90 МЕд./мл. Взвешивают лиофилизат соединения и растворяют в растворе инсулина лизпро для того, чтобы приводить к составу, содержащему 90 МЕд./мл инсулина лизпро и соединения в желаемых концентрациях (4, 15 или 50 мг/мл). pH разных растворов доводят до pH 5,3 добавлением 200 мМ уксусной кислоты.

Документируют внешний вид раствора. Если раствор является мутным, соединение в тестируемой концентрации не обеспечивает солюбилизацию инсулина человека. Если раствор является прозрачным, соединение обеспечивает солюбилизацию инсулина человека в тестируемой концентрации. Таким образом, можно определять концентрацию соединения, необходимую для солюбилизации инсулина человека в его изоэлектрической точке. Чем ниже концентрация, тем большую роль играет аффинность соединения к инсулину человека.

Получаемые результаты представлены в табл. 4. Результаты демонстрируют, что соединения и полисахариды не обладают одинаковыми свойствами в отношении растворения инсулина лизпро.

Таблица 4

Соединения (примеры) или полисахариды (противопоставительные примеры)	Растворение инсулина лизпро 90 МЕд./мл на 4 мг/мл соединения	Растворение инсулина лизпро 90 МЕд./мл на 15 мг/мл соединения	Растворение инсулина лизпро 90 МЕд./мл на 50 мг/мл соединения
Противопоставительные примеры			
Полисахарид 1	Да	Да	Да
Полисахарид 3	Да	Да	Да
Полисахарид 2	Да	Да	Да
Примеры			
Соединение 1	Нет	Нет	Да
Соединение 2	Нет	Нет	Да
Соединение 3	Нет	Нет	Да

F. Взаимодействие альбумином.

F1. Для определения взаимодействий разных полисахаридов или соединений и модельного белка, такого как альбумин, проводили испытание на Centricon (мембране с порогом пропускания 50 кДа). 7,3 мг/мл раствор полисахарида или соединения разбавляли на одну треть в 20 мг/мл раствора BSA (альбумин телячьей сыворотки) в PBS (концентрация в смеси: 2,43 мг/мл полисахарида или соединения, 13,3 мг/мл альбумина и приблизительно 100 мМ солей).

Эту смесь центрифугировали на Centricon с последующим пропусканием приблизительно половины объема через мембрану. Альбумин количественно удерживается на мембране Centricon. Только анализируемые полисахариды и соединения в значительной степени проходят через мембрану (для полисахаридов, обладающих наибольшими молекулярными массами, приблизительно 20% полисахарида удерживается).

После центрифугирования полисахарид или соединение количественно определяют посредством УФ в фильтрате. Рассчитывают процент полисахарида или соединения, связанного с альбумином, по следующему уравнению:

$$(1 - [\text{полисахарид или соединение в фильтрате в присутствии альбумина}] / [\text{полисахарид или соединение в фильтрате в отсутствие альбумина}]) \times 100.$$

Получаемые результаты представлены в табл. 5. В этом испытании очень ясно наблюдают, что полисахариды с молекулярной массой 5-15 кДа в значительной степени удерживаются альбумином. В противоположность этому соединения по изобретению меньшей молекулярной массы заметно меньше удерживаются альбумином в этом испытании.

Таблица 5

Полисахарид или соединение	% полисахарида или % соединения, связанного с BSA
Противопоставительные примеры	
Полисахарид 4	97%
Полисахарид 1	95%
Полисахарид 3	77%
Полисахарид 5	86%
Полисахарид 2	82%
Примеры	
Соединение 2	21%
Соединение 1	20%
Соединение 3	27%
Соединение 4	24%
Соединение 5	24%
Соединение 6	26%
Соединение 7	27%
Соединение 8	27%
Соединение 9	43%
Соединение 11	35%

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водная композиция, содержащая инсулин в гексамерной форме и по меньшей мере одно анионное замещенное соединение и одно полианионное соединение, где замещенное соединение выбрано из анионных замещенных соединений в выделенной форме или в смеси, состоящих из остова, образованного дискретным числом n в диапазоне от 1 до 8 ($1 \leq n \leq 8$) одинаковых или разных сахаридных звеньев, связанных гликозидными связями, где указанные звенья выбраны из группы, состоящей из гексоз в циклической форме или открытой восстановленной форме, отличающихся тем, что они являются замещенными:

а) по меньшей мере одним заместителем общей формулы I



где заместители являются одинаковыми или разными, когда содержится по меньшей мере два заместителя,

радикал $-[AA]$ означает аминокислотный остаток,

радикал $-R_1$ является

связью, тогда $a=0$ и аминокислотный остаток $-[AA]$ непосредственно связан с остовом функциональной группой G, или

углеродной цепью C_2-C_{15} , тогда $a=1$, необязательно замещенной и/или содержащей по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и, по меньшей мере, кислотную функциональную группу до взаимодействия с аминокислотой, где указанная цепь образует с аминокислотным остатком $-[AA]$ функциональную амидную группу, и присоединенной к остову посредством функциональной группы F, что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы остова с функциональной группой предшественника радикала $-R_1$,

F представляет собой группу, выбранную из эфирной, сложноэфирной или карбаматной функцио-

нальных групп,

G представляет собой карбаматную функциональную группу,

m равно 1 или 2,

степень замещения сахаридных звеньев j в $-[R_1]_a-[AA]_m$ составляет строго больше 0 и меньше или равна 6, $0 \leq j \leq 6$; и

b) необязательно, одним или несколькими заместителями $-R'_1$,

где заместитель $-R'_1$ представляет собой углеродную цепь C_2-C_{15} , необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и по меньшей мере одну кислотную функциональную группу в форме соли катионов щелочных металлов, где указанная цепь связана с остовом посредством функциональной группы F', что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы или функциональной группы карбоновой кислоты, содержащейся на остове, и функциональной группы или заместителя, которого несет предшественник заместителя $-R'_1$,

F' представляет собой эфирную, сложноэфирную или карбаматную функциональную группу,

степень замещения сахаридных звеньев i в $-R'_1$ находится в диапазоне от 0 до 6-j, $0 \leq i \leq 6-j$, и

F и F' являются одинаковыми или разными,

F и G являются одинаковыми или разными,

$i+j \leq 6$,

$-R'_1$ является идентичным или отличным от $-R_1$,

свободные солеобразующие кислотные функциональные группы, которые несет заместитель $-R'_1$, находятся в форме солей катионов щелочных металлов,

указанные одинаковые или разные гликозидные связи выбраны из группы, состоящей из гликозидных связей типа (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) или (1,6), в альфа- или бета-положении.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что полианионное соединение выбирают из группы, состоящей из поликарбоновых кислот, фосфорных поликислот, соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом сахаридных звеньев, получаемых из дисахаридных соединений, выбранных из группы, состоящей из трегалозы, мальтозы, лактозы, сахарозы, целлобиозы, изомальтозы, мальтитола и изомальтитола, соединений, состоящих из сахаридного остова, образованного дискретным числом сахаридных звеньев, выбранных из группы, состоящей из карбоксиметилмальтотриозы, карбоксиметилмальтотетраозы, карбоксиметилмальтопентаозы, карбоксиметилмальтогексаозы, карбоксиметилмальтогептаозы, карбоксиметилмальтооктаозы и карбоксиметилизомальтотриозы и их солей Na^+ , K^+ , Ca^{2+} или Mg^{2+} .

3. Композиция по любому из пп.1 или 2, отличающаяся тем, что поликарбоновая кислота выбрана из группы, состоящей из лимонной кислоты, винной кислоты и их солей Na^+ , K^+ , Ca^{2+} или Mg^{2+} .

4. Композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что полианионное соединение представляет собой лимонную кислоту и ее соли Na^+ , K^+ , Ca^{2+} или Mg^{2+} .

5. Композиция по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что полианионное соединение, состоящее из сахаридного остова, образованного дискретным числом сахаридных звеньев, выбирают из группы, состоящей из карбоксиметилмальтотриозы, карбоксиметилмальтотетраозы, карбоксиметилмальтопентаозы, карбоксиметилмальтогексаозы, карбоксиметилмальтогептаозы, карбоксиметилмальтооктаозы и карбоксиметилизомальтотриозы.

6. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что инсулин представляет собой инсулин человека.

7. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что инсулин представляет собой инсулин-аналог.

8. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что инсулин-аналог выбирают из группы, состоящей из инсулина лизпро (Humalog®), инсулина аспарт (Novolog®, Novorapid®) и инсулина глулизин (Apidra®).

9. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что инсулин-аналог представляет собой инсулин лизпро (Humalog®).

10. Композиция по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что массовое отношение замещенное анионное соединение/инсулин находится в диапазоне от 0,5 до 10.

11. Композиция по любому из пп.1-10, отличающаяся тем, что концентрация анионного замещенного соединения находится в диапазоне от 1,8 до 36 мг/мл.

12. Фармацевтический состав для снижения гликемии, содержащий композицию по любому из пп.1-10.

13. Фармацевтический состав по п.12, отличающийся тем, что концентрация инсулина находится в диапазоне от 240 до 3000 мкМ (от 40 до 500 МЕд./мл).

14. Анионное замещенное соединение, выбранное из анионных замещенных соединений, в выделенном состоянии или в смеси, состоящих из остова, образованного дискретным числом u в диапазоне от 1 до 8 ($1 \leq u \leq 8$) одинаковых или разных сахаридных звеньев, связанных гликозидными связями, причем указанные звенья выбраны из группы, состоящей из гексоз в циклической форме или открытой восстановленной форме, отличающихся тем, что они замещены:

а) по меньшей мере одним заместителем общей формулы I



где заместители являются одинаковыми или разными, когда содержится по меньшей мере два заместителя,

радикал $-[AA]$ - означает аминокислотный остаток,

радикал $-R_1$ - является

или связью G, тогда $a=0$ и аминокислотный остаток $-[AA]$ непосредственно связан с остовом функциональной группой G,

или углеродной цепью C_2-C_{15} , тогда $a=1$, необязательно замещенной и/или содержащей по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и, по меньшей мере, кислотную функциональную группу до взаимодействия с аминокислотой, где указанная цепь образует с аминокислотным остатком $-[AA]$ функциональную амидную группу, и присоединенной к остову посредством функциональной группы F, что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы остова с функциональной группой предшественника радикала $-R_1$ -,

F представляет собой группу, выбранную из эфирной, сложноэфирной или карбаматной функциональных групп,

G представляет собой карбаматную функциональную группу,

m равно 1 или 2,

степень замещения сахаридных звеньев j в $-[R_1]_a-[AA]_m$ составляет строго больше 0 и меньше или равна 6, $0 < j \leq 6$; и

б) необязательно, одним или несколькими заместителями $-R'_1$, где заместитель $-R'_1$ представляет собой углеродную цепь C_2-C_{15} , необязательно замещенную и/или содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, N и S, и по меньшей мере одну кислотную функциональную группу в форме соли катионов щелочных металлов, где указанная цепь связана с остовом посредством функциональной группы F', что приводит к взаимодействию функциональной гидроксильной группы или функциональной группы карбоновой кислоты, содержащейся на остове, и функциональной группы или заместителя, которого несет предшественник заместителя $-R'_1$,

F' представляет собой эфирную, сложноэфирную или карбаматную функциональную группу,

степень замещения сахаридных звеньев i в $-R'_1$ находится в диапазоне от 0 до 6-j, $0 \leq i \leq 6-j$,

F и F' являются одинаковыми или разными,

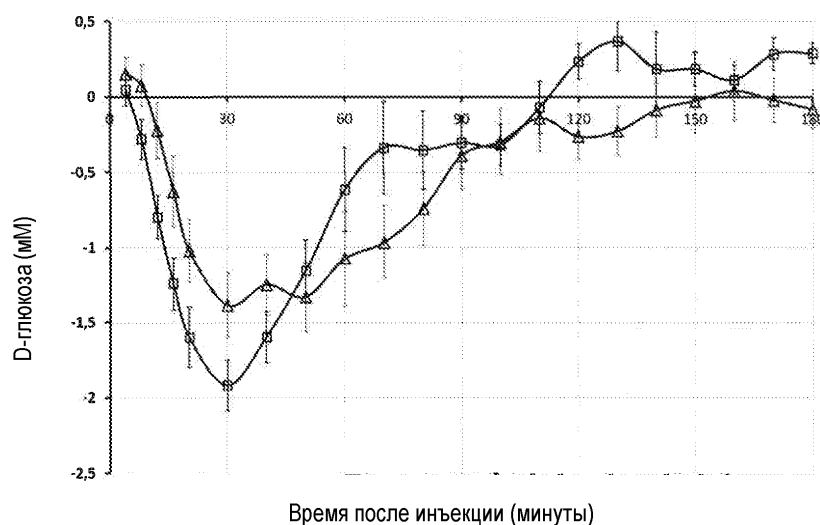
F и G являются одинаковыми или разными,

$i+j \leq 6$,

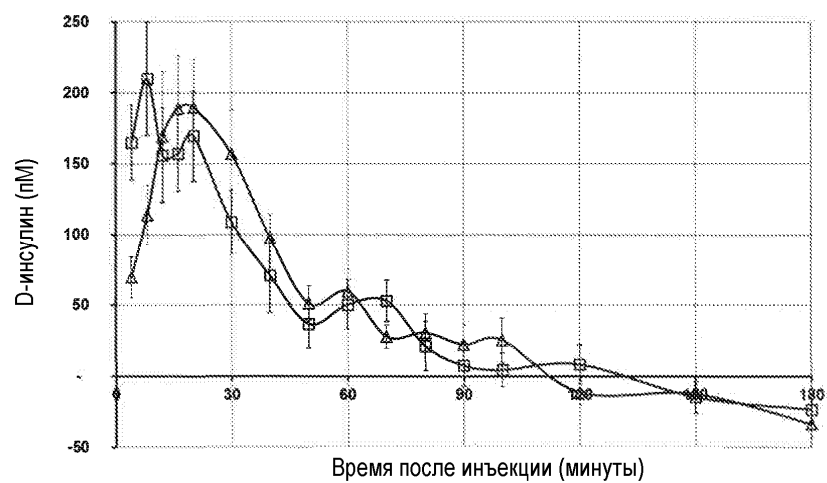
$-R'_1$ является идентичным или отличным от $-R_1$ -,

свободные солеобразующие кислотные функциональные группы, которые несет заместитель $-R'_1$, находятся в форме солей катионов щелочных металлов,

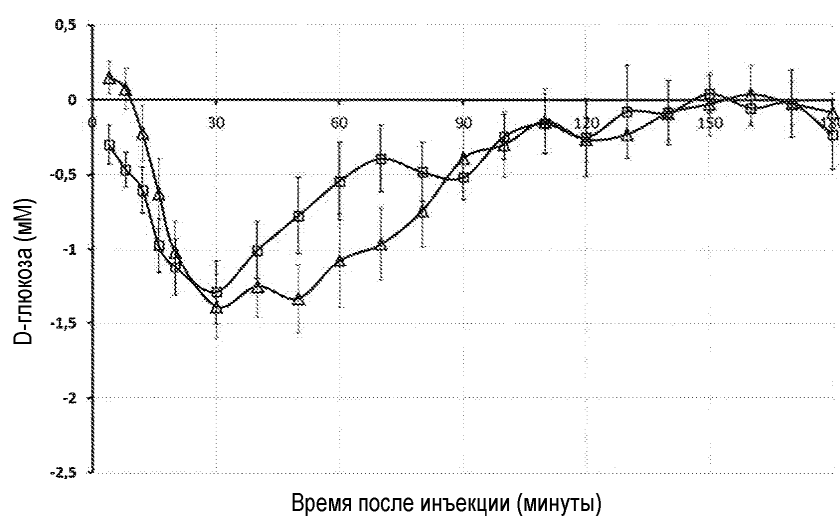
указанные одинаковые или разные гликозидные связи выбраны из группы, состоящей из гликозидных связей типа (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) или (1,6), в альфа- или бета-положении.



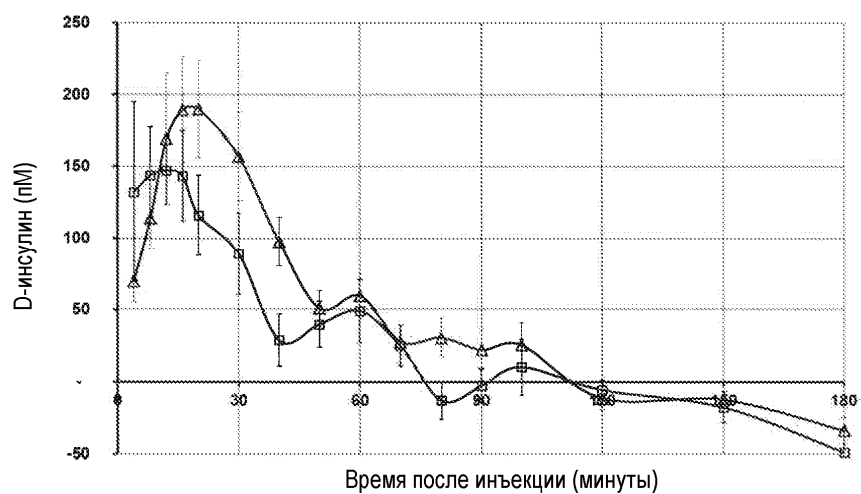
Фиг. 1



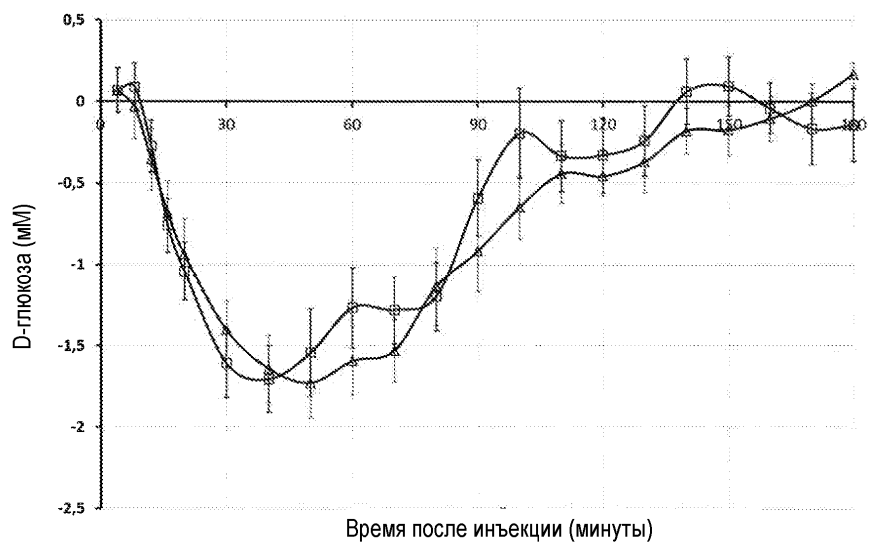
Фиг. 2



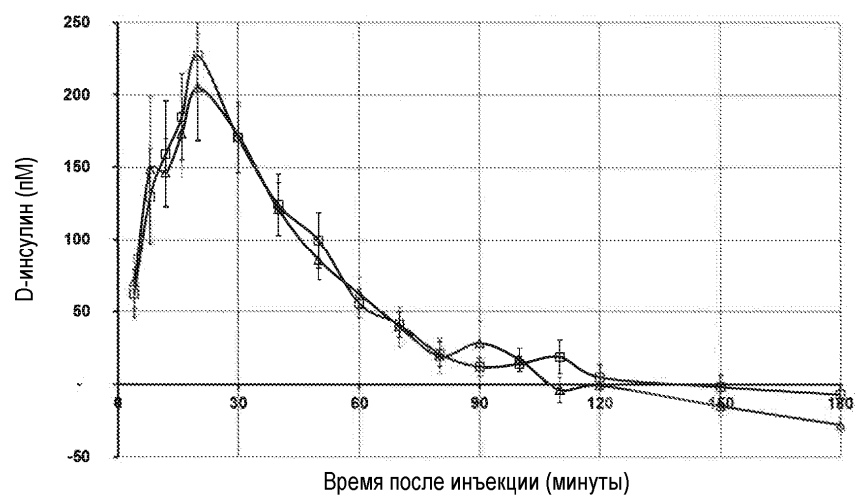
Фиг. 3



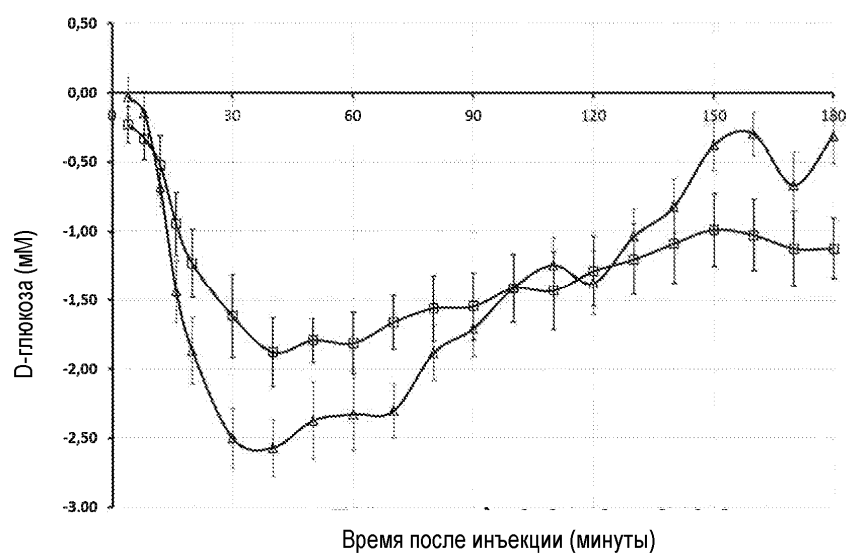
Фиг. 4



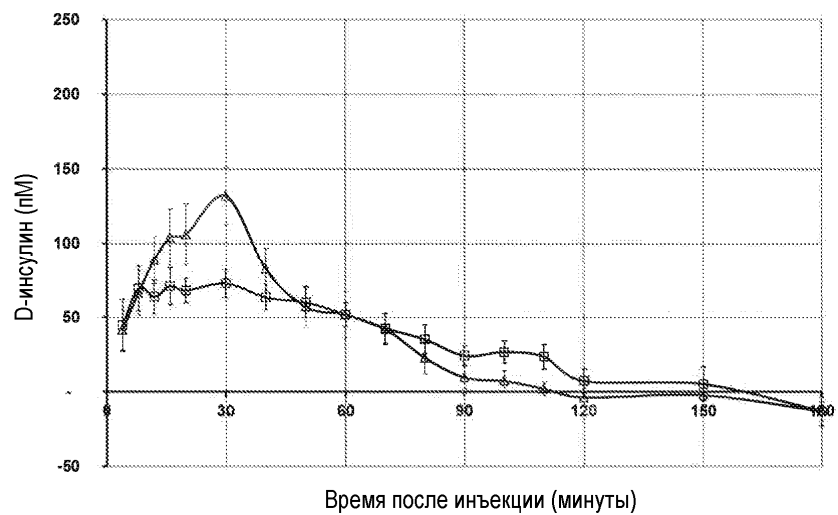
Фиг. 5



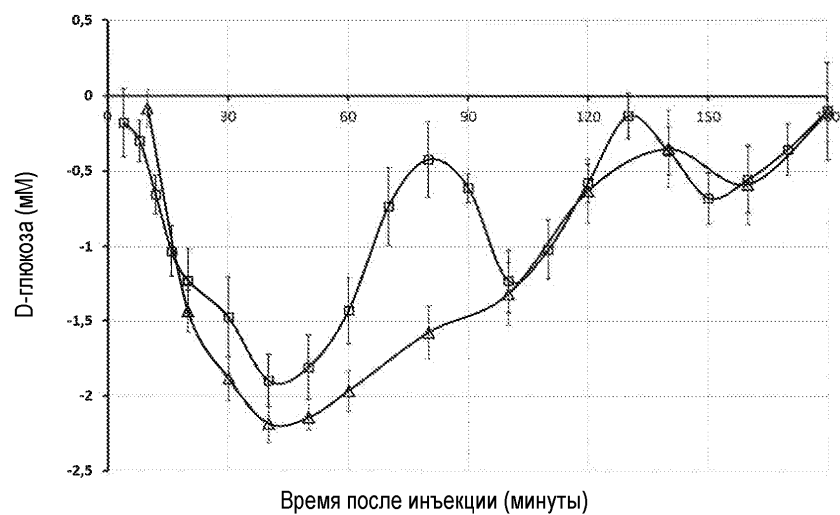
Фиг. 6



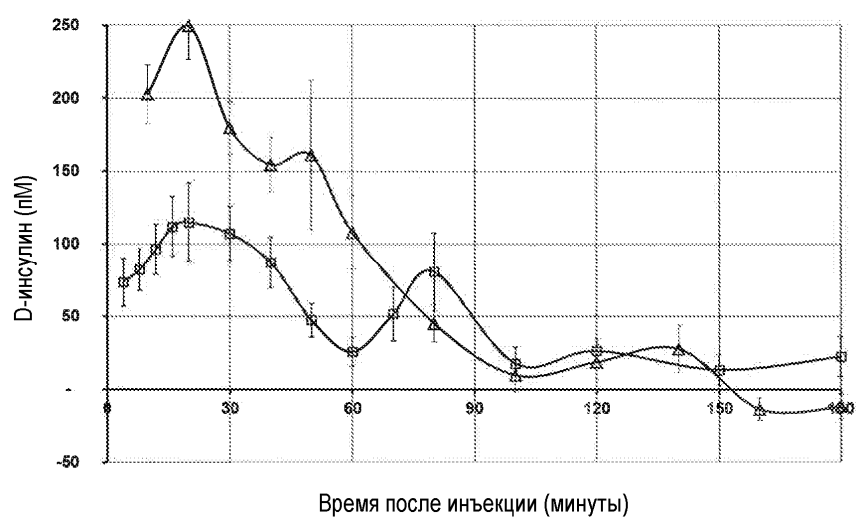
Фиг. 7



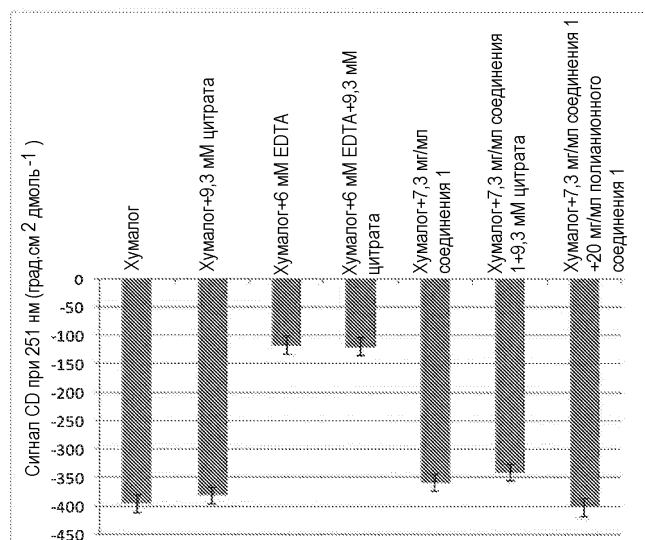
Фиг. 8



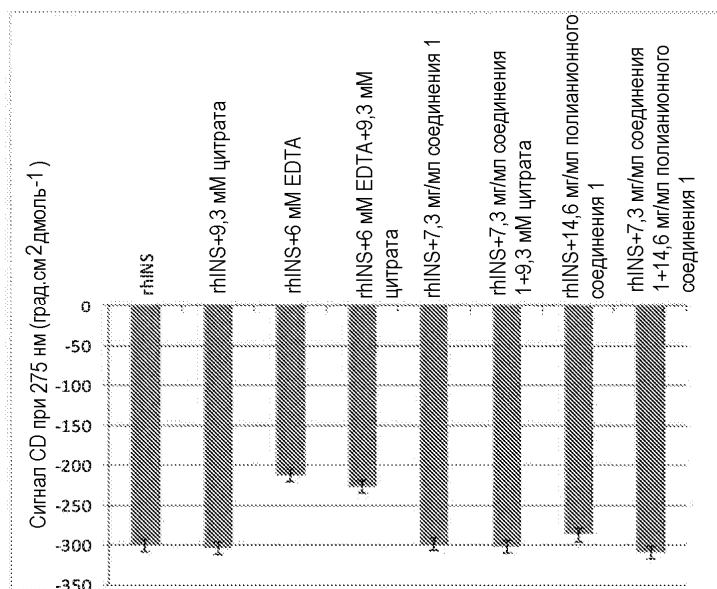
Фиг. 9



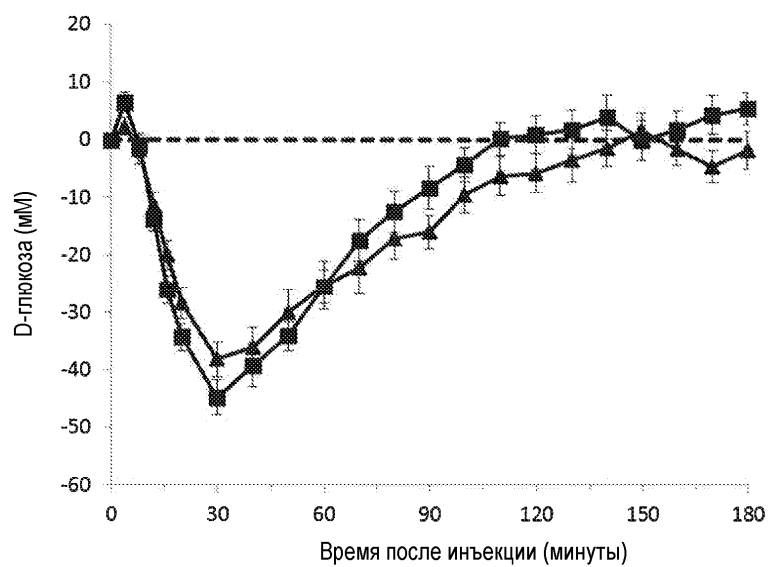
Фиг. 10



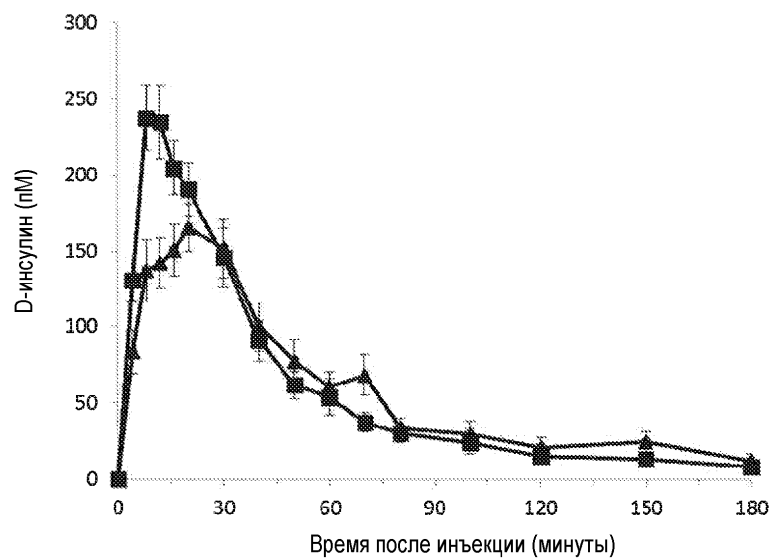
Фиг. 11



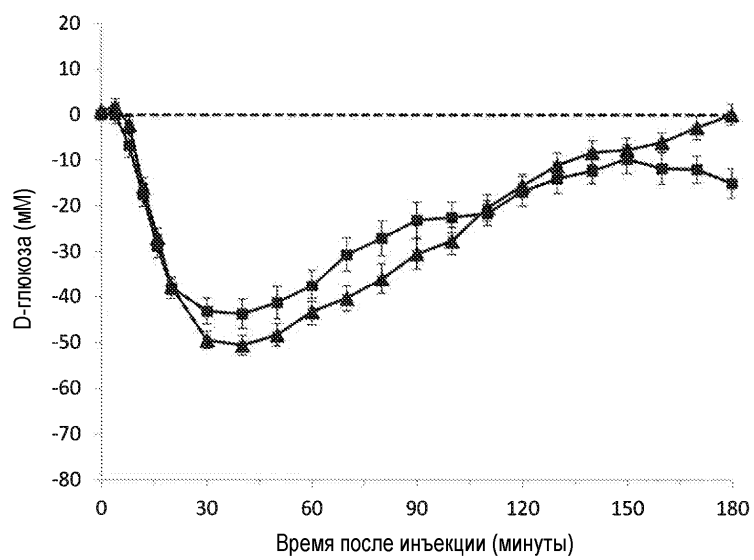
Фиг. 12



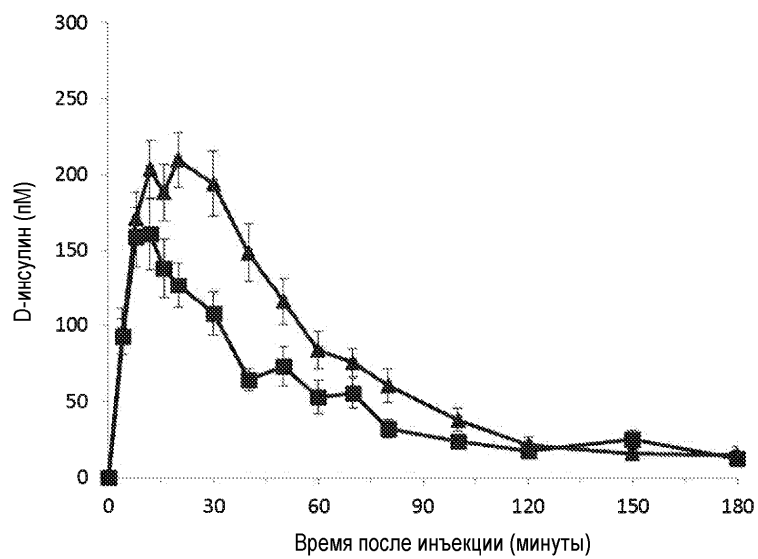
Фиг. 13



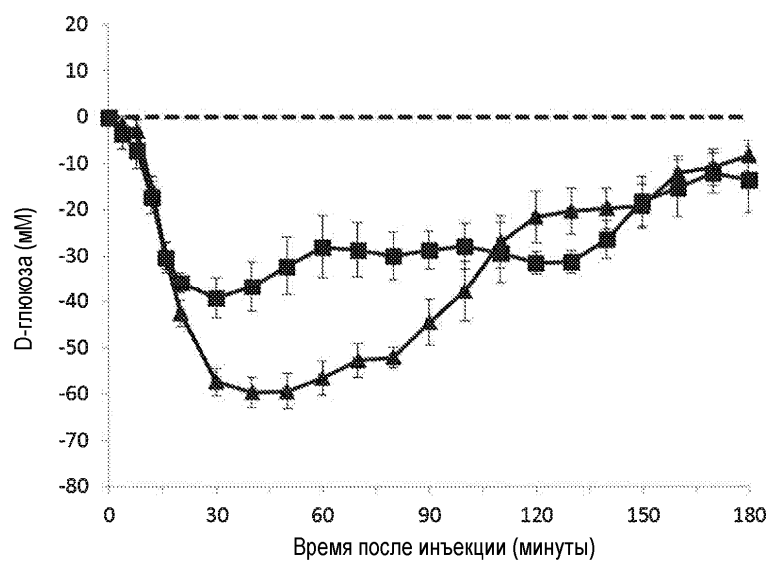
Фиг. 14



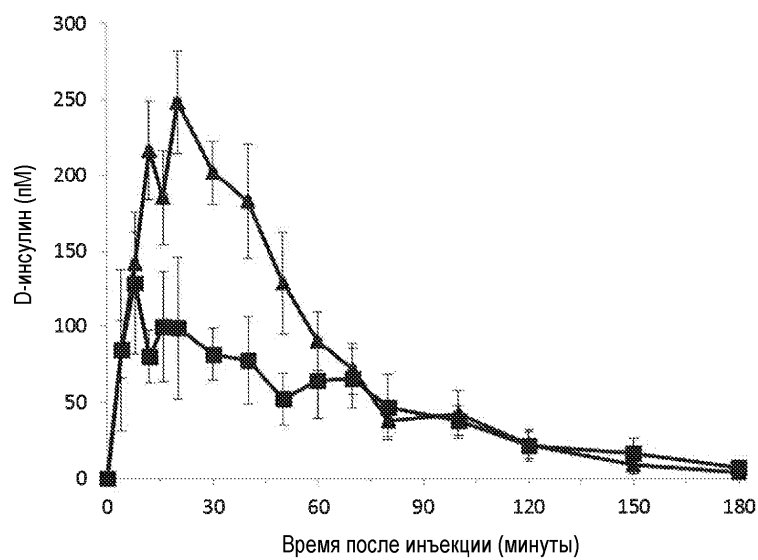
Фиг. 15



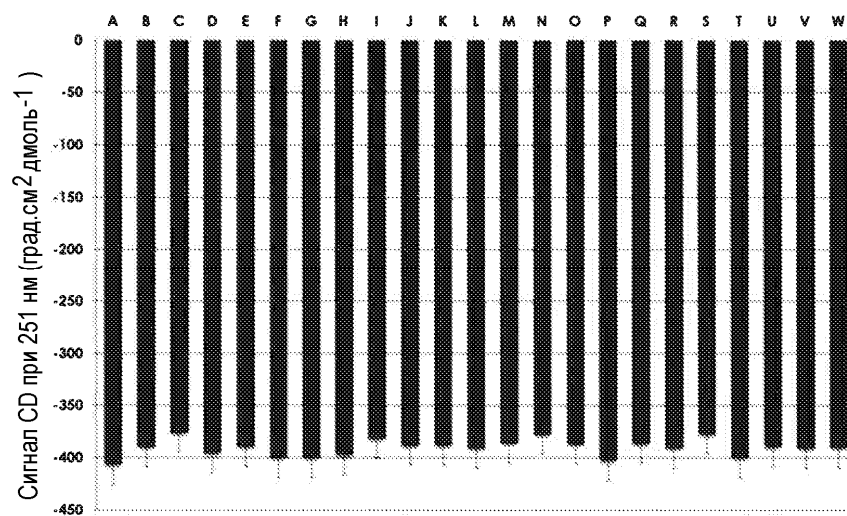
Фиг. 16



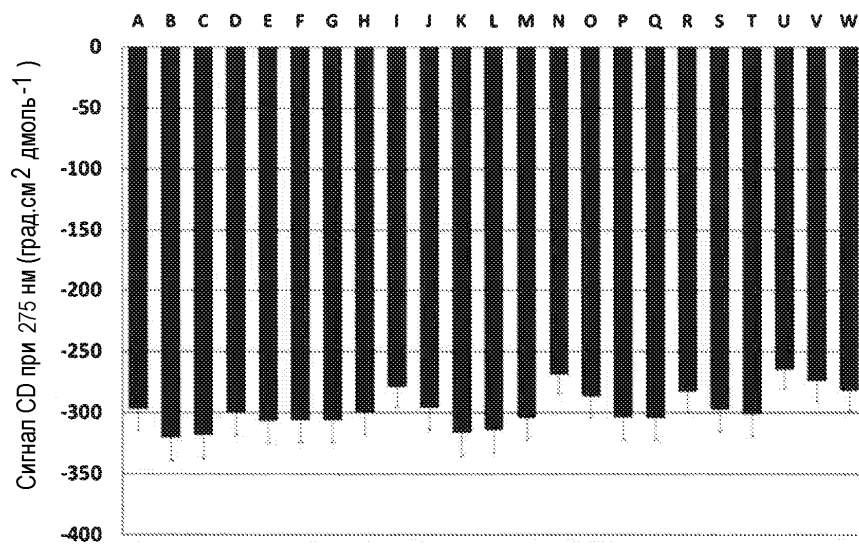
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2