

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038073**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.01

(21) Номер заявки
201992272

(22) Дата подачи заявки
2018.05.18

(51) Int. Cl. **A61K 38/28** (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)

(54) АЦИЛИРОВАННОЕ ИНСУЛИНОВОЕ СОЕДИНЕНИЕ

(31) 62/511,690

(32) 2017.05.26

(33) US

(43) 2020.03.31

(86) PCT/US2018/033418

(87) WO 2018/217573 2018.11.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Лю Вэнь, Мезо Адам Роберт,
Валенсуэла Франсиско Альсидес (US)**

(74) Представитель:
**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Лыу Т.Н., Строкова О.В. (RU)**

(56) I.B. JONASSEN ET AL.: "Design of the Novel Protraction Mechanism of Insulin Degludec, an Ultra-long-Acting Basal Insulin", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NL, vol. 29, no. 8, 7 April 2012 (2012-04-07), pages 2104-2114, XP035087058, ISSN: 1573-904X, DOI: 10.1007/S11095-012-0739-Z, abstract, page 2105; figure 1, compound octadecanodiolyl-g-L-Glu; page 2108; table 1, page 2112, right-hand column, paragraph 7 - page 2113, left-hand column, last line

PANDYARAJAN V. ET AL.: "Design of Non-Standard Insulin Analogs for the Treatment of Diabetes Mellitus", CURRENT DIABETES REPORTS, CURRENT SCIENCE INC, NEW YORK, vol. 12, no. 6, 16 September 2012 (2012-09-16), pages 697-704, XP035133532, ISSN: 1539-0829, DOI: 10.1007/S11892-012-0318-Z, abstract, page 699; table 1, page 700, left-hand column, last paragraph - page 701, left-hand column, paragraph 1

US-A1-2006183668
US-A1-2016058840
EP-B1-2178910
EP-B1-2254906

(57) Описанные в изобретении соединения относятся к лечению диабета и/или гипергликемии. Более конкретно, описанные соединения относятся к ацилированным инсулиновым соединениям, которые понижают уровень глюкозы в крови, к фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения, к терапевтическому применению таких соединений и к промежуточному соединению, применяемому для получения указанных ацилированных инсулиновых соединений.

B1**038073****038073****B1**

Изобретение относится к области лечения диабета и/или гипергликемии. Изобретение относится к соединениям, которые понижают уровень глюкозы в крови, к фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения, и к терапевтическому применению таких соединений.

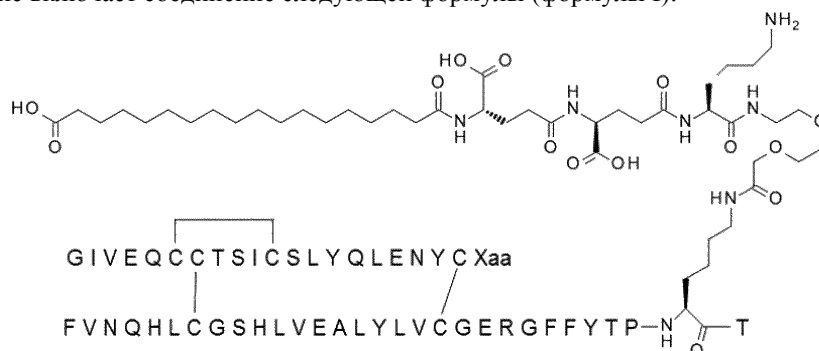
Заместительная инсулинотерапия для лечения диабетических пациентов в идеале должна максимально приближаться к модели эндогенной секреции инсулина у здоровых людей. Физиологическую потребность в инсулине можно разделить на две фазы: (а) фаза усвоения питательных веществ, требующая импульсного поступления инсулина для устранения всплеска глюкозы в крови, связанного с приемом пищи, который также известен как "прандиальный" инсулин, и (b) фаза после всасывания, требующая устойчивой доставки инсулина для регулирования выработки глюкозы печенью для поддержания оптимального уровня глюкозы в крови натощак, который также известен как "базальный" инсулин.

Эффективная инсулинотерапия для людей, страдающих от диабета, обычно может включать комбинированное применение двух типов экзогенных лекарственных форм инсулина: быстродействующий, прандиальный инсулин во время приема пищи и базальный инсулин длительного действия, который вводит один раз или два раза в сутки для регулирования уровня глюкозы в крови между приемами пищи. Одна или более характеристик эндогенного инсулина, которые могут быть желательными для имитации, включают связывающую аффинность к инсулиновым рецепторам человека, предпочтительное связывание с инсулиновыми рецепторами человека по сравнению с человеческим рецептором IGF-1, фосфорилирование инсулиновых рецепторов человека и понижение глюкозы в крови.

Пригодный экзогенный базальный инсулин также должен обеспечивать продолжительное время действия, т.е. он должен обеспечивать регулирование уровня глюкозы в крови в течение по меньшей мере 12 ч и предпочтительно в течение 24 ч или более без существенного риска гипогликемии. Некоторые препараты базального инсулина имеют продолжительность действия 24 ч или более. Соединение с профилем продолжительного действия, без существенного изменения эффективности в течение этого времени, может снижать риск ночной гипогликемии и обеспечивать возможность более свободного изменения времени суточного введения доз без увеличения риска гипогликемии у пациента. Характеристики экзогенного базального инсулина, которые могут быть желательными, включают сниженную скорость выведения из кровотока и химическую стабильность при различных концентрациях, что может способствовать обеспечению стабильности в течение более продолжительного срока годности.

Существует потребность в альтернативных способах лечения диабета и/или гипергликемии у пациентов, нуждающихся в этом. Известны некоторые ацилированные инсулиновые соединения, см., например, патент США № 6444641 и патент США № 7615532, но существует потребность в дополнительных альтернативных способах лечения. В данном изобретении предложено соединение, которое пригодно для лечения диабета, снижения уровня гемоглобина A1c и снижения уровня глюкозы в крови у пациентов, нуждающихся в этом. Предложенные соединения также получены с применением нового соединения, описанного ниже.

Изобретение включает соединение следующей формулы (формулы I):



где Xaa представляет собой аминокислоту глицин или аспарагин.

Соединение формулы I представляет собой инсулиновое соединение, состоящее из А-цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и В-цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, причем дисульфидная связь существует между цистеином в положении 6 SEQ ID NO: 1 и цистеином в положении 11 SEQ ID NO: 1, дисульфидная связь существует между цистеином в положении 7 SEQ ID NO: 1 и цистеином в положении 7 SEQ ID NO: 4, дисульфидная связь существует между цистеином в положении 20 SEQ ID NO: 1 и цистеином в положении 19 SEQ ID NO: 4, и лизин в положении 29 В-цепи (SEQ ID NO: 4) химически модифицирован посредством образования амидной связи между α -аминогруппой боковой цепи лизина и свободным карбоксилатом AEEA с помощью OH-C18- γ Glu- γ Glu-Lys-(AEEA)-, где OH-C18 представляет собой октадекандионовую кислоту, γ Glu представляет собой L-глутаминовую кислоту, связанную через ее γ -карбоксильную группу боковой цепи, и AEEA представляет собой 2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]уксусную кислоту. Приведенная выше структура, формула I, содержит стандартные однобуквенные аминокислотные коды для аминокислотных остатков А-цепи и В-цепи инсулина, за исключением остатка 29 В-цепи, который представляет собой лизин, и структура данного

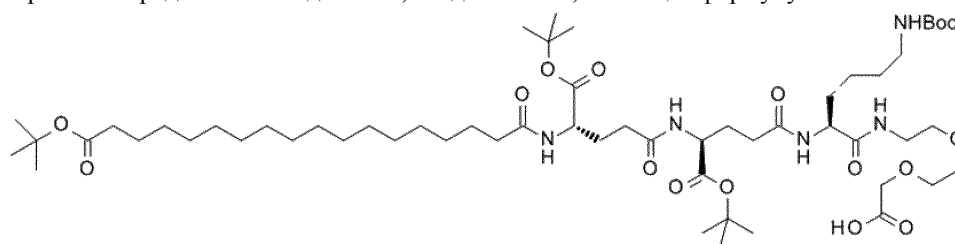
аминокислотного остатка приведена в подробном виде.

Предложенные соединения дополнительно включают соединение 12, которое имеет структуру формулы I, и при этом Хаа представляет собой аминокислоту глицин. Предложенные соединения дополнительно включают соединение 19, которое имеет структуру формулы I, и при этом Хаа представляет собой аминокислоту аспарагин.

В изобретении предложена также фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы I, соединение 12 или соединение 19 и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. В данной заявке дополнительно предложен способ лечения диабета у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы I, соединения 12 или соединения 19, или фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы I, соединения 12 или соединения 19.

В изобретении предложен способ лечения гипергликемии у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы I, соединения 12 или соединения 19, или фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы I, соединения 12 или соединения 19. В данной заявке также предложено соединение формулы I, соединения 12 или соединения 19 для применения в терапии. В данной заявке дополнительно предложено соединение формулы I, соединения 12 или соединения 19 для применения при лечении диабета или при лечении гипергликемии.

В изобретении предложено соединение, соединение А, имеющее формулу



В изобретении также предложено применение соединения А в производстве лекарственного средства для лечения диабета и/или гипергликемии. В изобретении дополнительно предложено применение соединения А при получении или производстве соединения формулы I, соединения 12 или соединения 19.

Соединения по данному изобретению имеют более низкую скорость выведения, чем известные ацилированные инсулины, такие как инсулин деглудек, что может обеспечивать улучшение биодоступности, достижение более стабильного фармакокинетического профиля у людей в течение долгого времени и/или увеличение продолжительности действия соединения *in vivo*. Кроме того, соединения по данному изобретению демонстрируют низкую скорость химического разложения, что указывает на то, что они обладают повышенной химической стабильностью и могут иметь более продолжительный срок годности, чем известные препараты ацилированного инсулина, такие как инсулин деглудек.

Термин "лечить" или "лечение" в данном контексте относится к тактике ведения и уходу за пациентом, страдающим от диабета или гипергликемии, или другого патологического состояния, для которого показано введение инсулина, с целью борьбы или облегчения симптомов и осложнений указанных состояний. Пациент, подлежащий лечению, является животным, и предпочтительно человеком.

В данном контексте термин "эффективное количество" относится к такому количеству или дозе соединения по данному изобретению или фармацевтической композиции, содержащей соединение по данному изобретению, которое при однократном или многократном введении доз пациенту или субъекту обеспечивает биологический или медицинский ответ, или требуемый терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, который наблюдает исследователь, ветеринар, врач или другой клиницист. Доза может включать более высокую первоначальную насыщающую дозу с последующей более низкой дозой.

Термины "пациент", "субъект" и "индивидуум", использованные в данном контексте взаимозаменяемо, относятся к животному, предпочтительно указанные термины относятся к людям. В некоторых вариантах реализации пациент, предпочтительно человек, дополнительно характеризуется заболеванием, или расстройством, или патологическим состоянием, для которого снижение уровня глюкозы в крови имеет положительный результат.

Фармацевтические композиции, содержащие соединение по данному изобретению, можно вводить парентерально пациентам, нуждающимся в таком лечении. Парентеральное введение можно осуществлять подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекцией с помощью шприца, необязательно шприца-ручки, или инъектора механического действия. Альтернативно, парентеральное введение можно осуществлять с помощью инфузионной помпы.

В вариантах реализации данного изобретения предложены фармацевтические композиции, пригодные для введения пациенту, включая введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения по данному изобретению и одного или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Такие фармацевтические композиции могут быть получены любым из

множества способов с применением традиционных вспомогательных веществ для фармацевтических продуктов, которые хорошо известны в данной области техники. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 21-е издание, University of the Sciences in Philadelphia, Филадельфия, штат Пенсильвания, США (2006)).

Предложенные соединения можно использовать в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, пригодными для лечения диабета и/или патологических состояний, связанных с диабетом. Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических агентов, которые можно комбинировать с предложенными соединениями, включают инсулин или аналоги инсулина; бигуаниды; сульфонилмочевины; тиазолидиндионы; ингибиторы дипептидилпептидазы-4 ("DPP-4"); ингибиторы натрий-зависимого транспортера глюкозы (SGLT2); инкретиновые соединения, такие как глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1) или аналоги GLP-1, желудочный ингибиторный полипептид (GIP) или аналоги GIP, оксинтомодулин или аналоги оксинтомодулина; или комбинации любых вышеуказанных агентов. Предложенные соединения и дополнительный терапевтический агент(ы) можно вводить вместе, используя один и тот же способ и устройство доставки, такое как одна пилюля, капсула, таблетка или инъекционная лекарственная форма; или их можно вводить по отдельности либо в одно и то же время, используя различные устройства или способы доставки, либо последовательно.

Одно из предложенных ацилированных инсулиновых соединений, соединение 12, получали селективным ацилированием ипсилон-аминогруппы LysB29 A21G-инсулина (человеческого инсулина, в котором 21-я аминокислота А-цепи инсулина заменена на глицин, A21G-инсулин) с использованием промежуточной линкерной жирной кислоты: C18-OtBu- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)-Lys(Boc)-AEEA-OH, где C18-OtBu представляет собой 18-трет-бутоксип-18-оксо-октадекандионовую кислоту, γ Glu представляет собой L-глутаминовую кислоту, связанную через ее γ -карбоксильную группу боковой цепи, и AEEA представляет собой 2-[2-(2-аминоэтокс)этокс]уксусную кислоту.

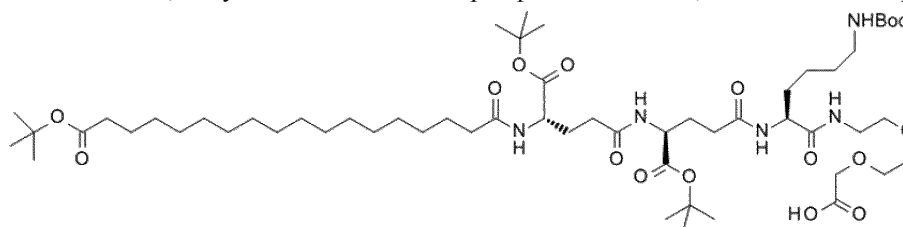
Образование молекулы происходит в три основные стадии: 1) получение A21G-инсулина, 2) синтез промежуточной линкерной жирной кислоты и 3) ацилирование, снятие защиты, очистка и солевой обмен для выделения соединения 12.

Инсулиновая часть предложенных соединений может быть получена различными способами, известными специалистам в данной области техники, такими как получение молекулы белка-предшественника с использованием технологий рекомбинантной ДНК. ДНК, включая кДНК и синтетическую ДНК, может быть двухспиральной или односпиральной. Кодировочные последовательности, которые кодируют молекулу белка-предшественника, описанную в данном документе, могут варьироваться в результате избыточности или вырожденности генетического кода. ДНК можно внедрять в клетку-хозяина для получения белка-предшественника по данному изобретению. Пригодную клетку-хозяина временно или стабильно трансфицируют или трансформируют системой экспрессии для выработки белка-предшественника. Клетки-хозяева могут представлять собой бактериальные клетки, такие как штаммы K12 или B Escherichia coli, грибковые клетки, такие как дрожжевые клетки, или клетки млекопитающих, такие как клетки яичников китайских хомячков ("CHO").

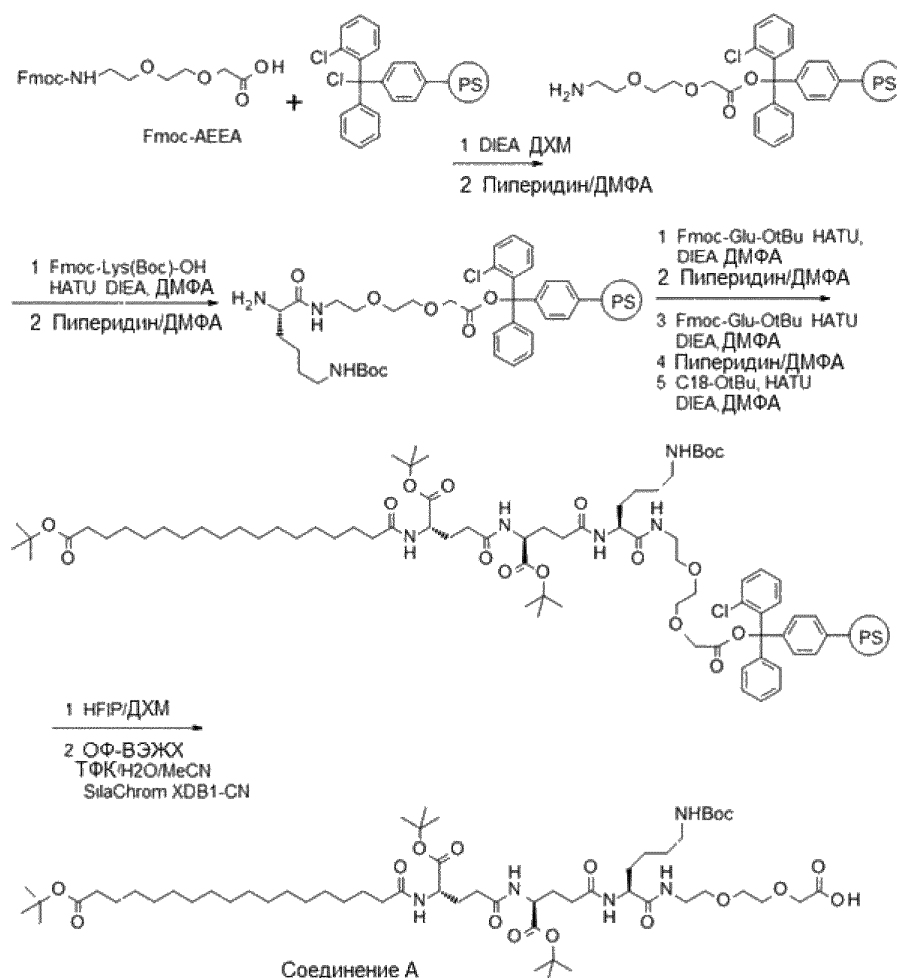
Векторы экспрессии обычно являются реплицируемыми в организме хозяина, либо как эписомы, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Как правило, векторы экспрессии содержат маркеры отбора, например тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктазу, для обеспечения возможности отбора тех клеток, которые трансформированы требуемыми последовательностями ДНК.

Предложенные соединения могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, а также способами, описанными ниже. Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных способов можно объединять различным образом с получением соединений, описанных в данном документе. Соединение 19 можно получать таким же образом, как соединение 12.

Часть молекулы линкерной жирной кислоты в соединениях 12 и 19, имеющих представленную ниже формулу, соединение А, получают с помощью твердофазного синтеза, как показано на фиг. 2



Соединение А



Схематическая иллюстрация синтеза соединения А ("PS" означает полимерную подложку).

Существует возможность получения соединения А с использованием только способов в фазе раствора или в комбинации с твердофазными способами, которые могут быть более масштабируемыми. Конъюгацию молекулы линкерной жирной кислоты с A21G-инсулином проводят в органическом растворителе (N-метил-2-пирролидон (NMP)/диметилсульфоксид (ДМСО)), что обусловлено растворимостью линкерной жирной кислоты на основе аминокислоты, защищенной трет-бутилоксикарбонильными "Boc"/трет-бутиловыми "tBu" сложными эфирами. Однако могут быть разработаны альтернативные схемы защиты/снятия защиты для обеспечения растворимости линкерной жирной кислоты в водном растворе для минимизации использования органических растворителей.

Таким же образом, последнее химическое превращение обеспечивает снятие защитных групп Boc/tBu с использованием трифторуксусной кислоты (ТФК). Может быть разработана альтернативная стратегия защиты/снятия защиты для более мягких условий расщепления.

Соединение А получали твердофазным синтезом пептида. Флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc)-Lys(Boc)-OH (1430 мг, 3 ммоль, 2 экв. относительно смолы; Novabiochem, кат. № 852012) смешивали с гексафторфосфатом 1-[бис(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридин-3-оксида (HATU) (1150 мг, 3 ммоль, 2 экв. относительно смолы; Oakwood Chemical, кат. № 023926) и N,N-диизопропилэтиламино (DIEA) (1333 мкл, 7,6 ммоль, 5 экв.) в 10 мл ДМФА в течение 2 мин и затем переносили в емкость, содержащую H-AEEA-2-хлортритил-хлоридную смолу (2,11 г, 0,72 ммоль/г, 1,52 ммоль; Peptides International, кат. № RHX-11074-PI), который подвергали предварительному набуханию в дихлорметане (ДХМ) и предварительно промывали диметилформамидом (ДМФА).

Суспензию перемешивали в течение 1,5 ч, фильтровали и тщательно промывали смолу ДМФА (отрицательный тест Кайзера). Защитную группу Fmoc удаляли обработкой смолы 20% смесью пиперидина/ДМФА (10 мл, 30 мин). После промывания смолы ДМФА (40 мл) тест Кайзера был положительным, получали H₂N-Lys(Boc)-AEEA-2-хлортритил-хлоридную смолу (теоретически 1,52 ммоль).

Fmoc-Glu-OtBu (1297 мг, 3,0 ммоль, 2,0 экв., Ark Pharma, кат. № АК-48532) предварительно активировали (2 мин.) с помощью HATU (1153 мг, 3 ммоль, 2 экв.), используя DIEA в качестве основания (1333 мкл, 7,7 ммоль, 5,0 экв.) в 10 мл ДМФА, затем переносили в смолу. Суспензию перемешивали в течение 3 ч, фильтровали и тщательно промывали смолу ДМФА (отрицательный тест Кайзера).

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой смолы 20% смесью пиперидина/ДМФА (10 мл, 30 мин) с последующим промыванием смолы ДМФА (40 мл, положительный тест Кайзера). Второй Fmoc-Glu-

OtBu связывали со смолой, повторяя условия, описанные выше, и используя время связывания 1,5 ч.

После удаления последней защитной группы Fmoc 18-трет-бутокси-18-оксо-октадекандионовую кислоту (1,13 г, 3,0 ммоль, 2,0 экв.) предварительно активировали (2 мин) с помощью HATU (1,15 г, 3,0 ммоль, 2,0 экв.), используя DIEA в качестве основания (1333 мкл, 7,7 ммоль, 5,0 экв.) в 10 мл ДМФА, затем переносили в смолу. Суспензию перемешивали в течение 3 ч, фильтровали и тщательно промывали смолу сначала ДМФА, а затем ДХМ (отрицательный тест Кайзера). Защищенную линкерную жирную кислоту отделяли от смолы, смешивая ее с 30% HFIP/ДХМ (20 мл) в течение 1 ч. Смолу отфильтровывали и тщательно промывали ДХМ. Объединенные фильтраты упаривали до маслянистого вещества *in vacuo*. Остаточное маслянистое вещество разбавляли ацетонитрилом (15-20 мл) и снова упаривали *in vacuo* до маслянистого вещества.

Образец снова растворяли в ацетонитриле (15-20 мл) и упаривали *in vacuo* с получением маслянистого вещества. С помощью слабого потока азота выпаривали остаточный ацетонитрил с получением 2,6 г неочищенного аморфного вещества (теоретически = 1,7 г).

Очистку начинали с неочищенного образца, который растворяли в 5 мл ДМФА и 20 мл ацетонитрила (включая растворы для промывания колбы). Затем добавляли воду с получением 40 мл мутного раствора. После добавления еще 5 мл ацетонитрила получали прозрачный раствор (общий объем составлял 45 мл, 33% в воде). Очистку осуществляли, загружая образец на полупрепаративную обращенно-фазовую ВЭЖХ циано-колонку (SilaChrom XDB1-CN; 10 мкм, 100 Å; 2,1×25 см).

Затем образец элюировали, используя градиент 40-60% В в течение 72 мин, 15 мл/мин, 60°C (буфер А = 0,1% ТФК в воде, и буфер В = 0,1% ТФК в ацетонитриле). Фракции, которые, по данным аналитической ОФ-ВЭЖХ, содержали требуемый продукт, объединяли и лиофилизировали с получением 1,22 г продукта (соединения А) в виде белого аморфного вещества (72% от теоретического; чистота по ОФ-ВЭЖХ 91%; набл. ММ = 1114,6 дальтон (Да); теор. ММ = 1114,45 Да).

Ацилирование начинали, используя 404,9 мг; 0,363 ммоль; 1,32 экв. соединения А, синтез описан выше, и TSTU (тетрафторборат О-(N-сукцинимидил)-N,N,N',N'-тетраметилурия) (91,5 мг, 0,3039 ммоль; 1,1 экв.), которые растворяли в 2,5 мл N-метил-2-пирролидона (NMP). К полученному раствору добавляли диизопропилэтиламин (DIEA, 192 мкл; 1,102 ммоль; 4 экв.) и инкубировали полученную смесь при комнатной температуре в течение 30 мин с получением сложного эфира соединения А-OSu в NMP, и сразу его использовали.

При получении соединения 12 к раствору A21G-инсулина (или к раствору человеческого инсулина в случае соединения 19) (соль ТФК; 1,584 г; 0,276 ммоль), растворенного в 15 мл диметилсульфоксида (ДМСО), добавляли 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU; 495 мкл, 3,31 ммоль, 12 экв., Sigma-Aldrich, кат. № 33482). Затем сразу добавляли полученный выше сложный эфир соединения А-OSu в NMP.

После перемешивания реакционной смеси при комнатной температуре в течение 12 мин ее добавляли в смесь диэтилового эфира/ДХМ/ТФК (30:10:0,2 об./об.; объем 200 мл). Полученный белый осадок выделяли центрифугированием, а затем один раз растирали с диэтиловым эфиром.

Снятие защиты (удаление групп Boc и OtBu) начинали с полученного выше белого осадка, влажно-го от эфира, который обрабатывали смесью ТФК/триизопропилсилана (TIS; Aldrich)/воды (92,5:5,0:2,5 об./об.; 50 мл) в течение 20 мин. К полученной смеси добавляли диэтиловый эфир (200 мл) и собирали полученный осадок центрифугированием. Анализ ОФ-ВЭЖХ показал, что стадия снятия защиты завершена (12,4% непрореагировавшего A21G-инсулина, 56,7% B29-ацилированного продукта, 13% бис-ацилированного продукта).

Очистку начинали с полученного выше неочищенного продукта, который растворяли в смеси воды/ацетонитрила (1:1 об./об.; 20 мл). Остаточный эфир удаляли пропусканием слабого потока азота над поверхностью смеси до достижения объема около 20 мл. Полученный раствор разбавляли водой Milli-Q (200 мл) и загружали на препаративную ВЭЖХ колонку Zeosphere 120DRP, A10, C8 (5×25 см).

Образец элюировали из колонки градиентом ацетонитрила (20-35%) в воде (содержащей 0,1% об./об. ТФК) в течение 144 мин при 28 мл/мин, контролируя с помощью УФ при 225 и 280 нм. Фракции, содержащие требуемый продукт, идентифицировали с помощью ОФ-ВЭЖХ (колонка: Waters XSelect CSH C18, 4,6×50 мм) и объединяли (100 мл; 99,8% по ОФ-ВЭЖХ). ИЭР-МС: спектр после деконволюции: наблюдаемый: 6577,1 Да, расчетный: 6578,5 Да.

При преобразовании методом солевого обмена HCl (колоночный способ) объединенные выше фракции разбавляли водой до 200 мл и снова загружали на препаративную ВЭЖХ колонку Zeosphere. Затем меняли элюирующие буферы. Буфер А содержал 0,01% HCl в воде, и буфер В представлял собой ацетонитрил.

Затем колонку промывали тремя объемами колонки 5% буфера В, а затем элюировали образец, используя 70% буфер В, контролируя при 225 и 280 нм. Образец собирали в чистую банку для лиофилизации, замораживали и лиофилизировали с получением соединения 12 в виде белого порошка (620,5 мг, 0,094 ммоль; общий выход 34%). Чистоту подтверждали аналитической ОФ-ВЭЖХ, и она составляла 99,9%. ИЭР-МС: спектр после деконволюции: наблюдаемый: 6577,3 Да, расчетный: 6578,5 Да.

При преобразовании методом солевого обмена HCl (способ с использованием смолы), соединение 12 (соль ТФК; 102,9 мг) растворяли в смеси воды/ацетонитрила (1:1 об./об.; 20 мл) и добавляли к хлоридной ионообменной смоле (4,05 г; 248 ммоль смолы/ммоль инсулина; Bio-Rad 1-х8 (кат. № 140-1431); 50-100 меш; хлоридная форма; 2,08 мэкв./г сухого вещества; влажность 46%; четвертичный аммоний; контрольный номер 2100011742), которую предварительно промывали, используя по 20 мл метанола, ацетонитрила и смеси воды/ацетонитрила (1:1 об./об.).

Смолу и инсулин смешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего отфильтровывали смолу и промывали смесью воды/ацетонитрила (1:1 об./об., 20 мл). Фильтрат и промывочные растворы объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением соединения 12 в виде белого порошка (89,9 мг; 87% на стадии выделения). Чистоту подтверждали аналитической ОФ-ВЭЖХ, и она составляла 99,9%. ИЭР-МС: спектр после деконволюции: наблюдаемый: 6576,7 Да, расчетный: 6578,5 Да. Также можно использовать дополнительные методы солевого обмена, такие как диализ.

Ацилирование LysB29 для соединений по данному изобретению подтверждали посредством расщепления с помощью эндопротеазы Glu-C. Около 300 мкл соединения 12 или 19 растворяли в 50 мМ буфере Tris, pH 8 (1 мг/мл) и затем обрабатывали 20 мкг эндопротеазы Glu-C (Worthington Biochemical, кат. № LS003605). После инкубации при комнатной температуре в течение 17,5 ч аликвоту (200 мкл) реакционной смеси гасили 0,1н. раствором HCl (300 мкл).

Полученную смесь (80 мкл) анализировали с помощью ЖХ/МС (колонок Waters XBridge C8, 4,6×150 мм, 5 мкм, 130 Å). Установлено, что диагностический фрагмент, B22-30 + соединение А, имеет размер 1944,4 Да (по сравнению с расчетным = 1944,3 Да). Все остальные фрагменты, образованные при расщеплении Glu-C соединений 12 или 19, были свободны от ацилирования.

In Vitro аффинность к рецептору.

Соединения 12 и 19, а также контрольные соединения (биосинтетический человеческий инсулин и инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1)) испытывали в скрининговом анализе сближения (SPA) человеческого рецептора инсулина (hIR) и человеческого рецептора IGF-1 (hIGF-1R), в анализах конкурентного радиолигандного связывания с использованием мембран, полученных при помощи стадий дифференциального центрифугирования из стабильно трансфицированных клеток 293НЕК, сверхэкспрессирующих рекомбинантный hIR-A, hIR-B или hIGF-1R.

Использовали условия с аналитическим буфером, состоящим из 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 0,003% (мас./об.) NP-40 и содержащим либо человеческий рекомбинантный (3-[¹²⁵I]-йодтирозил-А¹⁴)-инсулин, либо человеческий рекомбинантный [¹²⁵I]-IGF-1. Значения отсчетов в минуту (СРМ) нормализовали по контрольным образцам человеческого инсулина или IGF-1 без метки и наносили на график как процентное ингибирование по оси y в зависимости от log концентрации соединения по оси x. Значения IC₅₀ определяли с помощью анализа 4-параметрической логистической нелинейной регрессии (GeneData, версия 12), и они представляют собой концентрацию, при которой специфическое связывание ингибировано на 50%. При необходимости параметры в верхней или нижней части кривой фиксировали при 100 или 0% соответственно для построения полной кривой.

Константу аффинности (K_i) рассчитывали по значению IC₅₀ на основании уравнения

$$K_i = IC_{50} / (1 + L^* / K_d),$$

где L* равен концентрации радиолиганда, использованного в эксперименте, и K_d равен равновесной константе связывающей аффинности радиолиганда к соответствующему рецептору, определенной с помощью анализа насыщающего связывания.

Расчетные значения K_i для соединения 12: K_i = 7,11 нМ для hIR-A и K_i = 7,56 нМ для hIR-B (табл. 1). Соединение 12 и человеческий инсулин обладают связывающей аффинностью к hIR-A и hIR-B, которая составляет менее 10 нМ, и соединение 12 является высокоселективным для hIR-A и hIR-B по сравнению с hIGF-1R (>500-кратная селективность для обоих), что подобно коэффициенту селективности человеческого инсулина в таких же анализах.

Расчетные значения K_i для соединения 19: K_i = 3,40 нМ для hIR-A и K_i = 3,45 нМ для hIR-B (табл. 1). Соединение 19 и человеческий инсулин обладают связывающей аффинностью к hIR-A и hIR-B, которая составляет менее 4 нМ, и соединение 19 является высокоселективным для hIR-A и hIR-B по сравнению с hIGF-1R (>700-кратная селективность для обоих), что превышает коэффициент селективности человеческого инсулина в таких же анализах.

Таблица 1. Аффинность связывания человеческого рецептора инсулина подтипов А и В (hIR-A и hIR-B) и человеческого рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (hIGF-1R), значения K_i и стандартной ошибки среднего (COC) представляют собой геометрические средние значения, выраженные до 3-значных цифр

Название	K_i , нМ (геом. COC, n)		
	IR-A	IR-B	IGF-1R
Соединение 12	7,11 (0,48, n=3)	7,56 (0,72, n=3)	4060 (582, n=3)
Соединение 19	3,40 (1,44, n=6)	3,45 (0,479, n=3)	2540 (462, n=3)
Человеческий инсулин	0,197 (0,012, n=3)	0,257 (0,030, n=3)	97,8 (10,3, n=3)
IGF-1	5,40 (0,59, n=3)	65,9 (8,8, n=3)	0,157 (0,010, n=3)

Функциональная активация рецептора.

Инсулиновый рецептор содержит внутриклеточный домен тирозинкиназы, который при связывании с лигандом аутофосфорилирует собственные тирозиновые остатки, обеспечивая возможность рекрутинга адаптерных белков, которые возбуждают инсулиновые пути передачи сигналов. Функциональную клеточную активность для стимуляции аутофосфорилирования рецептора на тирозиновых остатках определяли после обработки лигандом клеток 293НЕК, сверхэкспрессирующих hIR-A, hIR-B или hIGF-1R, каждый из которых имеет С-концевой эпитоп C9 (TETSQVAPA, SEQ ID NO: 5).

После стимуляции клеток различными концентрациями лиганда в среде, не содержащей альбумина, при 37°C в течение 60 мин (анализы hIR-A и hIR-B) или в течение 30 мин (анализ hIGF-1R) определяли уровень аутофосфорилирования тирозина киназным доменом каждого рецептора с помощью иммуноферментного твердофазного анализа; при этом активированный рецептор захватывается антителом (RHO 1D4) к метке эпитопа C9, после чего определяли уровень фосфорилирования тирозина с помощью универсального конъюгата антифосфотирозина с пероксидазой хрена, антитела 4G10TM-HRP.

Функциональную эффективность записывали как концентрацию, вызывающую полумаксимальный ответ (EC50) относительно максимально эффективной концентрации (100 нМ) положительного контрольного образца, человеческого инсулина (анализы фосфорилирования hIR-A и hIR-B), или 10 нМ положительного контрольного образца hIGF-1 (анализ фосфорилирования hIGF-1R). Значения EC50 определяли с помощью анализа 4-параметрической логистической нелинейной регрессии (NGR Screener 13). При необходимости параметры в верхней или нижней части кривой устанавливали на 100 или 0 соответственно.

Записанные значения EC50 представлены как геометрические средние значения и геометрическая стандартная ошибка среднего значения (геом. COC) с количеством независимых измерений, указанных как "n" (табл. 2).

Соединение 12 демонстрирует активацию изоформ IR-A и IR-B человека. Эффективность соединения 12 и человеческого инсулина в отношении изоформ IR-A и IR-B составляет менее 40 нМ. Соединение 12 является примерно в 1300 раз более эффективным в отношении hIR-A и hIR-B, чем IGF-1R, что превышает коэффициент селективности человеческого инсулина в таких же анализах.

Соединение 19 демонстрирует активацию изоформ IR-A и IR-B человека. Эффективность соединения 19 и человеческого инсулина в отношении изоформ IR-A и IR-B составляет менее 25 нМ. Соединение 19 является примерно в 400 раз более эффективным в отношении hIR-A и hIR-B, чем IGF-1R, что превышает коэффициент селективности человеческого инсулина в таких же анализах. Для сравнения, селективность человеческого инсулина в отношении IR-A и IR-B по сравнению с IGF-1R является примерно 200-кратной.

Таблица 2. Активация подтипов А и В человеческого рецептора инсулина (hIR-A и hIR-B) и человеческого рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (hIGF-1R)

	EC ₅₀ , нМ (геом. СОС, n)		
Название	IR-A	IR-B	IGF-1R
Соединение 12	34,1 (2,5, n=7)	37,9 (3,2, n=3)	49900 (17300, n=4)
Соединение 19	23,4 (6,34, n=7)	13,7 (1,47, n=3)	7170 (1940, n=7)
Человеческий инсулин	1,53 (0,11, n=7)	1,83 (0,07, n=3)	351 (110, n=4)
IGF-1	116 (11, n=3)	427 (29, n=3)	0,939 (0,146, n=4)

Оценка in vivo эффективности на крысиной модели диабета 1 типа.

Эффект соединений 12 и 19 изучали в модели диабета у крыс, получавших стрептозотоцин (STZ). Самцов крыс Спрага-Дуули с массой тела 400-425 г приобретали у компании Envigo, Индианаполис, штат Индиана. После акклиматизации в течение примерно одной недели крыс анестезировали изофлураном и вводили однократную инъекцию Zanosar® (преп. № 89256, Teva Parenteral Medicines, 40 мг/кг, IV). Крыс использовали в исследованиях через 3 дня после инъекции Zanosar; в исследованиях использовали только тех животных, у которых уровень сахара в крови после приема пищи составлял 400-550 мг/дл.

Крыс разделяли на группы с получением сопоставимой дисперсии по содержанию глюкозы в крови и массе тела; крыс разделяли случайным образом. Глюкозу в крови измеряли глюкометром Accu-Chek Aviva (Roche).

Крысам, обработанным STZ, вводили однократную подкожную (SC) дозу экспериментального препарата или носителя (стерильный нормальный солевой раствор, 0,9% мас./об. раствор хлорида натрия). Образцы крови для измерения глюкозы собирали посредством надреза хвоста. Во время эксперимента животные имели свободный доступ к пище и воде. Образцы плазмы из указанных исследований направляли на анализ содержания экспериментальных соединений. Как показано в табл. 3, соединение 12 обеспечивает эффективное снижение уровня глюкозы в течение по меньшей мере 24 ч в дозе 100 нмоль/кг. В табл. 3 показаны значения для соединения 19 в различных временных точках во время проведения оценки. Соединение 19 также обеспечивает эффективное снижение уровня глюкозы в течение по меньшей мере 24 ч в дозе 100 нмоль/кг.

Таблица 3. In vivo эффективность соединения 12

Время (часы)	Группа Ср. концентрация глюкозы, мг/дл $\pm$ СОС (n = 5)				
	Носитель	Соединение 12 (12,5 нмоль/кг)	Соединение 12 (25 нмоль/кг)	Соединение 12 (50 нмоль/кг)	Соединение 12 (100 нмоль/кг)
0	490 $\pm$ 2,78	508 $\pm$ 19,8	486 $\pm$ 16,4	501 $\pm$ 13,3	489 $\pm$ 6,10
1	504 $\pm$ 26,0	535 $\pm$ 25,9	499 $\pm$ 31,1	501 $\pm$ 21,8	414 $\pm$ 7,15
2	480 $\pm$ 16,3	496 $\pm$ 25,7	360 $\pm$ 48,1	384 $\pm$ 66,3	123 $\pm$ 9,29
4	512 $\pm$ 35,1	450 $\pm$ 21,0	249 $\pm$ 91,3	122 $\pm$ 33,8	84,9 $\pm$ 10,4
6	500 $\pm$ 34,3	393 $\pm$ 67,9	209 $\pm$ 82,6	74,5 $\pm$ 8,92	70,5 $\pm$ 6,36
8	498 $\pm$ 16,6	473 $\pm$ 45,5	308 $\pm$ 62,5	95,9 $\pm$ 20,7	73,0 $\pm$ 6,13
10	561 $\pm$ 18,5	527 $\pm$ 36,4	412 $\pm$ 55,3	121 $\pm$ 12,9	73,9 $\pm$ 11,3
12	584 $\pm$ 7,53	586 $\pm$ 12,0	513 $\pm$ 39,6	261 $\pm$ 36,3	84,9 $\pm$ 12,5
18	553 $\pm$ 18,3	532 $\pm$ 34,4	499 $\pm$ 25,9	420 $\pm$ 42,6	114 $\pm$ 15,8
24	488 $\pm$ 13,0	539 $\pm$ 18,2	481 $\pm$ 38,4	344 $\pm$ 66,2	162 $\pm$ 37,3
36	601* $\pm$ 0	591 $\pm$ 10	589 $\pm$ 8,41	598 $\pm$ 3,0	591 $\pm$ 8,80
48	508 $\pm$ 11,3	551 $\pm$ 18,4	517 $\pm$ 29,1	510 $\pm$ 25,7	504 $\pm$ 22,9
72	553 $\pm$ 8,79	564 $\pm$ 15,5	557 $\pm$ 23,6	555 $\pm$ 20,5	550 $\pm$ 23,4
AUC за 36 часов	19300 $\pm$ 197	19100 $\pm$ 358	16500 $\pm$ 1096	12400 $\pm$ 831	7480 $\pm$ 488

*значения выше 601 не измеряли, поскольку это максимальное значение на глюкометре.

Таблица 4. In vivo эффективность соединения 19

Время (часы)	Группа				
	Ср. концентрация глюкозы, мг/дл $\pm$ СОС (n = 5)				
	Носитель	Соединение 19 (12,5 нмоль/кг)	Соединение 19 (25 нмоль/кг)	Соединение 19 (50 нмоль/кг)	Соединение 19 (100 нмоль/кг)
0	510 $\pm$ 28,6	513 $\pm$ 10,0	520 $\pm$ 20,8	530 $\pm$ 15,1	546 $\pm$ 16,8
1	500 $\pm$ 24,5	545 $\pm$ 17,8	517 $\pm$ 25,5	544 $\pm$ 11,8	541 $\pm$ 23,1
2	522 $\pm$ 21,9	518 $\pm$ 21,2	367 $\pm$ 38,0	302 $\pm$ 58,4	242 $\pm$ 30,7
4	442 $\pm$ 26,4	292 $\pm$ 77,9	109 $\pm$ 25,7	100 $\pm$ 21,0	74,2 $\pm$ 4,00
6	404 $\pm$ 18,6	204 $\pm$ 67,6	81,8 $\pm$ 4,79	63,8 $\pm$ 7,15	59,7 $\pm$ 6,06
8	418 $\pm$ 36,9	230 $\pm$ 73,3	113 $\pm$ 14,5	73,0 $\pm$ 10,7	69,1 $\pm$ 5,59
10	443 $\pm$ 39,2	324 $\pm$ 77,9	224 $\pm$ 13,2	150 $\pm$ 46,5	63,8 $\pm$ 5,32
12	548 $\pm$ 27,6	595 $\pm$ 6,40	386 $\pm$ 30,1	157 $\pm$ 80,5	93,5 $\pm$ 20,3
18	546 $\pm$ 36,3	573 $\pm$ 9,04	513 $\pm$ 23,3	356 $\pm$ 102	97,7 $\pm$ 5,38
24	519 $\pm$ 24,8	553 $\pm$ 21,1	536 $\pm$ 24,4	503 $\pm$ 26,9	190 $\pm$ 59,8
36	600 $\pm$ 1	601* $\pm$ 0	590 $\pm$ 9,63	566 $\pm$ 30,9	576 $\pm$ 11,6
48	498 $\pm$ 20,4	550 $\pm$ 20,2	510 $\pm$ 19,3	537 $\pm$ 17,4	499 $\pm$ 27,5
72	549 $\pm$ 22,2	566 $\pm$ 18,0	566 $\pm$ 18,5	579 $\pm$ 16,2	591 $\pm$ 10,1
AUC за 36 часов	18700 $\pm$ 471	18100 $\pm$ 718	154000 $\pm$ 240	12700 $\pm$ 1240	7840 $\pm$ 557

*Значения выше 601 не измеряли, поскольку это максимальное значение на глюкометре.

Оценка выведения лекарственного средства на модели диабета 1 типа у свиней.

Кастрированных самцов юкатанских миниатюрных свиней с диабетом (вызванным аллоксаном), которым предварительно устанавливали устройство для сосудистого доступа, помещали в стропы для ограничения подвижности и открывали доступ к точкам сосудистого доступа (предусмотренным для отбора образцов крови) и проверяли на проходимость. Животных случайным образом разделяли на экспериментальные группы и возвращали в загон. После отбора двух образцов крови в исходном состоянии (-30 и 0 мин) животным вводили инъекцию экспериментального препарата в дозе 1,8 нмоль/кг, подкожно в бок (0 мин) с помощью инсулинового шприца (0,3 мл, игла 5/16"). Все экспериментальные животные имели свободный доступ к чистой пресной воде в течение всего оставшегося периода сбора крови.

Собирали серийные образцы крови (по 2,0 мл каждый) у каждого животного в следующие моменты времени: -30, 0 (непосредственно перед введением дозы), через 1,5, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 42, 48, 54, 60 и 72 ч после подкожного введения дозы. Затем всех экспериментальных животных выдерживали без доступа к пище в течение ночи и снова не кормили до момента сбора образца через 24 ч. В это время животным давали 300 г корма S-9 и вводили 0,2 Е/кг хумалога. Их снова выдерживали без доступа к пище до момента сбора образца через 60 ч и затем им давали 300 г корма S-9 и 0,2 Е/кг хумалога. После сбора образца через 72 ч животных возвращали к нормальному питанию и поддерживающей схеме введения инсулина.

Образцы крови (антикоагулянт: нет [сыворотка]) выдерживали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 мин, но не более 2 ч для обеспечения свертывания. Определяли концентрации глюкозы в сыворотке с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава AU480. Аликвоту для ФК направляли на анализ.

Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения (СОС), если не указано иное. Изменение содержания глюкозы относительно исходного уровня рассчитывали вычитанием концентрации глюкозы в каждый момент времени из исходной концентрации глюкозы. Исходное значение рассчитывали на основании среднего значения концентрации глюкозы при -0,5 и 0 мин. Образ-

цы для ФК/ФД собирали до 72 ч после введения дозы.

Концентрации соединения 12 в плазме свиней (КЗ-ЭДТА) измеряли с помощью ЖХ/МС в компании Q2 Solutions (Итака, штат Нью-Йорк). Соединение 12 подвергали иммунопреципитации (IP) из 100 мкл аликвот плазмы/сыворотки, используя анти-инсулин-биотиновое моноклональное антитело (Fitzgerald № 10R-I134E) и магнитные гранулы со стрептавидиновым покрытием (Invitrogen M-280). После стадий промывания инсулиновые варианты элюировали из комплексов IP кислотным ацетонитрилом (5:20:80 муравьиная кислота/ацетонитрил/вода).

После элюирования 10 мкл элюента вводили в масс-спектрометр для анализа ЖХ/МС. Система ЖХ/МС состояла из 2D-наноСВЭЖХ жидкостного хроматографа Dionex (NCS-3500RS) и масс-спектрометра Thermo Q/Exactive Plus. Разрешения достигали с помощью двухмерной хроматографии с использованием серийных предколонок, состоящих из микропредколонки Thermo (160454) и колонки Acclaim PepMap-100 C18 (0,3×5 мм, диаметр частиц 5 мкм), и аналитической колонки Thermo Easy Spray PepMap C18 (75 мкм × 15 см, диаметр частиц 5 мкм), и обе колонки эксплуатировали при 60°C.

Масс-спектрометр работал в режиме положительных ионов, нано-ИЭР (Easy Spray), и для соединения 12 наблюдали следующие ионные переходы предшественника/продукта: 1316,600 → 586,854. Анализ верифицировали для измерения концентраций вариантов инсулина в диапазоне от 0,25 до 50 нг/мл.

Фармакокинетику (ФК) соединения 12 оценивали у самцов юкатанских свиней с индуцированным диабетом после однократного подкожного (SC) введения 1,8 нмоль/кг соединения 12. Образец инсулина деглудека получали таким же образом, как соединение 12, и использовали в данном исследовании в качестве препарата сравнения.

Некоторые ФК параметры соединения 12 и инсулина деглудека представлены в табл. 5. Скорость выведения соединения 12 в 2-3 раза меньше скорости выведения инсулина деглудека, и это может обуславливать более плоский ФК профиль и увеличенную продолжительность действия соединения 12 in vivo у людей.

Таблица 5. Средние ФК параметры соединения 12 и инсулина деглудека у самцов юкатанских свиней с индуцированным диабетом после введения однократных подкожных доз

Соединения	Доза (нмоль/кг г)	Стат.	T _{1/2} (ч.)	T _{max} (ч.)	C _{max} (пмоль/ л)	AUC _{0-inf} (ч.*нмоль/л)	CL/F (мл/ч/кг г)
Соединение 12	1,8	Среднее CO	15 3	10 8	2510 692	78,3 17,4	23,8 4,64
инсулин деглудек	1,8	Среднее CO	13 3	12 10	881 314	23,5 8,30	87,8 39,8

Сокращения: T_{1/2} - период полувыведения; T_{max} - время до максимальной концентрации; C_{max} - максимальная концентрация в плазме; AUC_{0-inf} - площадь под кривой от 0 до бесконечности; CL/F - клиренс/биодоступность (N=5 для соединения 12, N=6 для инсулина деглудека).

Оценка химической стабильности.

Образцы получали растворением высушенного замораживанием порошка соединений 12 и 19 в 20 mM NaOH при целевой концентрации около 6 mM. Затем полученный раствор подвергали диализу против 10 mM Tris с получением исходной концентрации 5,6 mM. Полученный исходный раствор затем использовали для получения растворов с целевыми концентрациями, содержащих 10 mM Tris, 19 мг/мл глицерина, 3,15 мг/мл м-крезола и 4 атома цинка на один гексамер инсулина (в молярном выражении) при pH 7,5. Целевые концентрации составляли U200 (200 ед./мл, что эквивалентно 1,2 mM), U400 (2,4 mM), U600 (3,6 mM) и U800 (4,8 mM). Фактические концентрации растворов находились в пределах 0,1 mM от целевых значений концентрации. Образцы препарата сравнения, инсулина деглудека, получали таким же образом, как образцы соединений 12 и 19 для исследований стабильности.

Для исследований стабильности при применении образцы вводили в силиконизированные картриджи объемом 3 мл с объемом наполнения около 1,5 мл. Поршни картриджей устанавливали в такое положение, чтобы в картридже над раствором не было свободного пространства. Затем картриджи выдерживали при 30°C. Образцы подвергали условиям "при применении", присоединяя иглу и выдавливая 5-10 мкл примерно каждые 2 дня. Анализ образцов проводили обращенно-фазовой хроматографией (ОФ-ВЭЖХ) и эксклюзионной хроматографией (ЭХ) в начальный момент времени и через различное количество дополнительных дней хранения, как подробно указано в следующих таблицах.

Для исследований стабильности при статическом хранении образцы вводили в картриджи объемом 3 мл с объемом наполнения 1,5 мл или в стеклянные ампулы объемом 0,3 мл с объемом наполнения около 0,2 мл. Затем картриджи или ампулы выдерживали при 30°C. Анализ образцов проводили обращенно-фазовой хроматографией (ОФ-ВЭЖХ) и эксклюзионной хроматографией (ЭХ) в начальный момент времени и через различное количество дополнительных дней хранения, как подробно указано в следующих таблицах.

Ниже приведены параметры ОФ-ВЭЖХ: (1) прибор: ЖХ с УФ-датчиком и колоночным термоста-

том; (2) колонка: SymmetryShield RP18 3,5 мкм, PN186000179 SN01593532014028; (3) температура колонки: 60°C; (4) 4. подвижная фаза: А = 0,085% ТФК в воде, В = 0,085% ТФК в ацетонитриле; и (5) градиент при скорости потока 0,9 мл/мин представлен ниже

Время (мин.)	%А	%В
0	90,0	10,0
3,00	90,0	10,0
3,10	70,0	30,0
6,10	70,0	30,0
36,10	40,0	60,0
36,20	5,0	95,0
38,20	5,0	95,0
38,30	90,0	10,0
41,30	90,0	10,0

Концентрация соединения 12 от U200 до U800 не оказывала заметного влияния на стабильность, которую определяли с помощью ОФ-ВЭЖХ или ЭХ. Химическая стабильность соединения 12 в испытании стабильности при применении при 30°C (данные за 110 дней) представлена в табл. 6. Химическая стабильность соединения 12, соединения 19 и препарата сравнения инсулина деглудека, все в концентрации U200, в исследовании статической стабильности, представлена в табл. 7. Химическая стабильность инсулина деглудека при 30°C в исследовании статической стабильности представлена в табл. 8.

Средняя скорость разложения главного пика соединения 12 при четырех различных концентрациях составляет 0,064% в неделю, как показано в табл. 6. Указанная скорость в 7-8 раз меньше скорости разложения главного пика инсулина деглудека, которая составляет 0,49%, как показано в табл. 8. В табл. 7 представлено прямое сравнение лекарственных форм соединения 12, соединения 19 и инсулина деглудека при U200 в одни и те же моменты времени. При прямом сравнении, представленном в табл. 7, скорость разложения соединения 12 более чем в четыре раза ниже скорости разложения инсулина деглудека, а скорость разложения соединения 19 более чем в два раза ниже скорости разложения инсулина деглудека. Меньшая скорость химического разложения, которую демонстрируют соединения 12 и 19, может обеспечивать увеличенный срок годности предложенных соединений.

Таблица 6. Процент главного пика соединения 12 при 30°C по результатам ОФ-ВЭЖХ

Время (дни)	U200	U400	U600	U800
0	98,3	98,3	98,3	98,3
7	97,9	98,4	98,3	98,3
18	97,8	98,2	98,2	98,3
27	97,9	98,2	98,1	98,0
41	97,8	98,0	98,2	98,2
53	97,6	97,8	98,0	98,0
83	97,0	97,3	97,5	97,7
110	97,2	97,4	97,4	97,5
Средняя скорость разложения (%/нед.)	0,064			

Таблица 7. Процент главного пика соединения 12, соединения 19 и инсулина деглудека при 30°C по результатам ОФ-ВЭЖХ

Время (дни)	Соединение 12 U200	Соединение 19 U200	инсулин деглудек U200
0	98,3	98,9	97,8
7	97,4	97,9	96,9
28	97,3	98,3	95,4
Скорость разложения (%/нед.)	0,145	0,255	0,602

Таблица 8. Процент главного пика инсулина деглудека при 30°C по результатам ОФ-ВЭЖХ

Время (дни)	Инсулин деглудек, U200
0	94,4
7	93,2
14	93,5
21	92,6
28	91,8
42	90,1
56	90,9
Средняя скорость разложения (%/нед.)	0,49

Последовательности.

Общая структура А-цепи (SEQ ID NO:1)

GIVEQCCTSI~~C~~SLYQLENYC~~X~~aa

где Xaa в положении 21 SEQ ID NO: 1 представляет собой G или N.

А-Цепь соединения 12 (SEQ ID NO:2)

GIVEQCCTSI~~C~~SLYQLENYC~~G~~

А-Цепь соединения 19 (SEQ ID NO:3)

GIVEQCCTSI~~C~~SLYQLENYC~~N~~

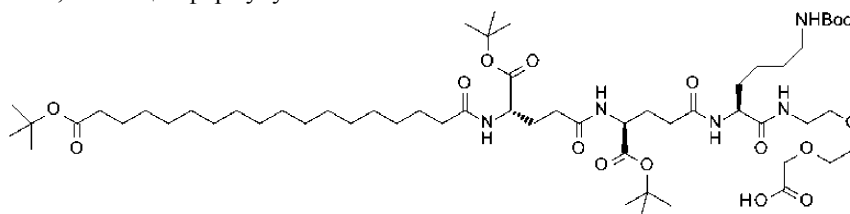
В-Цепь соединений 12 и 19 (SEQ ID NO:4)

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF~~F~~YTPKT

С-концевой эпитоп C9 (SEQ ID NO: 5)

TETSQVAP~~A~~

9. Соединение, имеющее формулу



12. Применение соединения по п.9 при получении соединения по любому из пп.1-3.