

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039101**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.03

(21) Номер заявки
201891474

(22) Дата подачи заявки
2016.12.23

(51) Int. Cl. **A61K 38/28** (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(54) **КАПСУЛИРОВАНИЕ УЛЬТРАСТАБИЛЬНЫХ АНАЛОГОВ ИНСУЛИНА В ПОЛИМЕРНЫХ РАСПЛАВАХ**

(31) **62/387,459**

(32) **2015.12.23**

(33) **US**

(43) **2018.12.28**

(86) **PCT/US2016/068572**

(87) **WO 2017/112952 2017.06.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КЕЙС ВЕСТЕРН РИЗЕРВ
ЮНИВЕРСИТИ (US)**

(72) Изобретатель:
Вейсс Майкл, Покорски Джон (US)

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

(56) **WO-A1-2011161124**
WO-A1-2011161125
WO-A1-2015010927

VINTHER T.N. et al., "Insulin analog with additional disulphide bond has increased stability and preserved activity", Protein Science, 2013, Vol. 22,

pages 296-305 See the abstract; page 300, column 2, paragraph 2

VINTHER T.N. et al., "Additional disulphide bonds in insulin: Prediction, recombinant expression, receptor binding affinity, and stability", Protein Science, January 2015, Vol. 24, pages 779-788 See the abstract; Table II

WEISS M.A., "Design of ultra-stable insulin analogues for the developing world", Journal of Health Specialties, July 2013, Vol. 1, Issue 2, pages 59-70 See the abstract; Figures 5-6; the section entitled 'Next-generation insulin analogues' on pages 64-65

HUA, Q-X. et al., "Design of an Active Ultrastable Single-chain Insulin Analog", The Journal of Biological Chemistry, 2008, Vol. 283, No. 21, pages 14703-14716 See the abstract; page 14704, first complete paragraph; Figure 1

WO-A2-2010014946

WO-A2-2013010048

WO-A2-2007081824

WO-A2-2009132129

LEE P. et al., "PEGylation to Improve Protein Stability During Melt Processing", Macromolecular Bioscience, October 2015, Vol. 15, No. 10, pages 1332-1337 See the abstract

(57) Композиция инсулина включает аналог инсулина и полимерную смесь. Аналог инсулина содержит цистеиновые замены в положениях В4 и А10 (с образованием цистина В4-А10) и одну или несколько дополнительных замен, выбранных из группы, состоящей из соединяющего домена из 5-11 аминокислот между доменами А и В аналога инсулина; замены не являющейся β-разветвленной аминокислотой в положении, соответствующем положению А8 инсулина дикого типа; не являющейся β-разветвленной кислотной или полярной боковой цепи в положении, соответствующем положению А14 инсулина дикого типа; модификации галогеном ароматического кольца Phe в положении, соответствующем положению В24 инсулина дикого типа в орто-положении ароматической боковой цепи; и замены лизина в положении, соответствующем положению В29 инсулина дикого типа, аргинином, глутаминовой кислотой, аланином, валином, изолейцином, лейцином, аминокпропионовой кислотой, аминокислотой или норлейцином. Аналог инсулина совместим с процессом производства, который включает один или более этапов в интервале температур 90-120°C. Капсулированный аналог инсулина необязательно может содержать свободный ПЭГ или быть ПЭГилированным. Смесь капсулированного в полимер инсулина можно отливать в виде микроигольного пластыря для местного введения или в виде микропеллет для подкожной инъекции.

B1**039101****039101****B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка притязает на приоритет находящейся на рассмотрении предварительной заявки на патент США № 62/387459, поданной 23 декабря 2015 г.

Заявление о спонсированном федеральными органами исследовании или разработке

Настоящее изобретение создано при государственной поддержке грантов № DK040949 и DK074176, присужденных Национальными институтами здравоохранения, а также гранта № DMR0423914, выделенного Национальным научным фондом.

Правительство США обладает определенными правами на это изобретение.

Уровень техники

Настоящее изобретение относится к капсулированию в полимерах аналогов полипептидных гормонов с повышенной термостойкостью и термодинамической устойчивостью, включая повышенную устойчивость к связанной с агрегацией неправильной укладке (фолдингу) и образованию фибрилл при температурах выше комнатной. Такая улучшенная стабильность позволяет сохранять активность аналогов гормона после процесса производства, содержащего этапы, для осуществления которых необходимы температуры в диапазоне от 90 до 120°C. Более конкретно, это изобретение относится к капсулированию в полимерных расплавах ультрастабильных аналогов инсулина, состоящих из двух элементов, обеспечивающих более высокую стабильность, один из которых является дополнительным дисульфидным мостиком между остатками В4 и А10. Второй элемент состоит из одного или более элементов, выбранных из группы (a) укороченного соединения (С) доменов между доменами А и В; (b) замены не являющейся β-разветвленной аминокислотой в положении А8 α-спирального С-САР; (c) не являющейся β-разветвленной кислотой или полярной боковой цепи в А14; (d) модификации галогеном ароматического кольца Phe^{B24} в орто-положении (положение 2 6-членного кольца; галоген, выбранный из группы фтор, хлор или бром) ароматической боковой цепи; и/или (e) замены Lys^{B29} аргинином, глутаминовой кислотой или природной аминокислотой с нейтральной алифатической боковой цепью (выбранной из группы Ala, Val, Ile или Leu) или боковой цепью аминокислоты неприродного происхождения с нейтральной алифатической боковой цепью (аминопропионовая кислота, аминотрипановая кислота или норлейцин). Необязательно, либо в двухцепочечных, либо одноцепочечных аналогах N-концевые остатки (содержащие остаток В1, остатки В1 и В2 или остатки В1-В3) могут быть удалены из В-цепи (или В-домена), а также Asp^{A21} необязательно может быть замещен Asp, Ala, Gly или Ser. N-конец СС1, А-цепь или В-цепь необязательно может быть модифицирована ПЭГилированием для обеспечения более равномерного распределения в полимерной смеси, как описано в литературе (Lee, P., et al., *Macromol. Biosci.* 15:1332-7 (2015)).

Уже давно установлено, что введение инсулина является средством лечения сахарного диабета. Основной целью традиционной заместительной инсулиновой терапии у пациентов с сахарным диабетом является контроль концентрации глюкозы в крови для предотвращения ее отклонения в сторону повышения или понижения от нормального диапазона, характерного для здоровых людей. Отклонения в сторону понижения от нормального диапазона связаны с немедленными проявлениями адренергических или нейрогликозных симптомов, которые при тяжелых эпизодах приводят к судорогам, коме и смерти. Отклонения в сторону повышения от нормального диапазона связаны с увеличенным долговременным риском возникновения микрососудистых заболеваний, включая ретинопатию, слепоту и почечную недостаточность. Учитывая тот факт, что для лечения сахарного диабета типа 1 обычно требуется комбинация препарата базального инсулина (или препарата аналога инсулина длительного действия) и препарата прандиального инсулина (или препарата аналога инсулина быстрого действия), вводимых путем подкожной инъекции, во многих случаях сахарный диабет типа 2 можно лечить только препаратом базального инсулина (или препаратом аналога инсулина длительного действия). Настоящее изобретение относится к такой терапии базальным инсулином.

Инсулин представляет собой небольшой глобулярный белок, который играет центральную роль в обмене веществ позвоночных. Инсулин содержит две цепи, А-цепь, содержащую 21 остаток, и В-цепь, содержащую 30 остатков. Гормон хранится в β-клетках поджелудочной железы в виде стабилизированного ионами Zn²⁺ гексамера, но функционирует в кровотоке в виде мономера, не содержащего Zn²⁺. Инсулин является продуктом одноцепочечного предшественника, проинсулина, в котором соединяющий участок (35 остатков) связывает С-концевой остаток В-цепи (остаток В30) с N-концевым остатком А-цепи (фиг. 1А). Многочисленные данные свидетельствуют о том, что он состоит из инсулиноподобного ядра и разупорядоченного соединяющего пептида (фиг. 1В). Считается, что образование трех специфических дисульфидных мостиков (А6-А11, А7-В7 и А20-В19, фиг. 1А и 1В) связано с окислительной укладкой проинсулина в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме (ЭР, ER). Агрегация проинсулина происходит за счет образования растворимых координированных Zn²⁺ ионами гексамеров сразу после его экспорта из ER в аппарат Гольджи. Эндопроотеолитическое расщепление и превращение в инсулин происходит в незрелых секреторных гранулах с последующей морфологической конденсацией. Кристаллические агрегаты гексамеров связанного с цинком инсулина, хранящиеся в зрелых гранулах, были визуализированы с помощью электронной микроскопии (ЭМ). Последовательность инсулина схематично показана на фиг. 1С. Отдельные остатки обозначены идентификатором аминокислоты (обычно в виде

стандартного трехбуквенного кода), положением в цепи и последовательности (как правило, в виде верхнего индекса). В соответствии с настоящим изобретением предлагаются новые укороченные С-домены длиной 6-11 остатков вместо С-домена дикого типа из 36 остатков, характерного для человеческого проинсулина.

Инсулин и обычные аналоги инсулина в жидких или микрокристаллических составах восприимчивы как к физической, так и химической деградации. В то время как физическая деградация приводит к образованию фибрилл, химическая деградация связана с разрывом химических связей с потерей возможности перегруппировки атомов внутри молекулы или образования химических связей между различными молекулами инсулина. Физическая и химическая деградации заметно ускоряются при температурах выше комнатной и тем более выше 55°C. Такая деградация снижает биологическую активность. Восприимчивость инсулина и обычных аналогов инсулина в жидких или микрокристаллических составах к различным формам деградации в настоящее время препятствует их капсулированию в полимерные расплавы, производство которых содержит один или более этапов, для осуществления которых необходима температура в диапазоне 90-120°C. Примером такого полимерного расплава является сополимер молочной и гликолевой кислот (PL-GA; при различных молекулярных отношениях, включая, без ограничения, 50:50), который может быть измельчен в порошок в шаровой мельнице или с помощью ступы и пестика и смешан с лиофилизированным SCI (или обычными двухцепочечными аналогами инсулина) в твердом состоянии. Смешанный порошок (загруженный ультрастабильным аналогом инсулина) можно экструдировать из расплава в интервале температур 90-120°C в течение по меньшей мере 10 мин и отверждать при комнатной температуре. Такие полимерные расплавы могут быть отлиты в различные формы, включая листы, содержащие микроиглы для введения в кожу, и микрогранулы для подкожной инъекции. В данной области техники известно, что PL-GA является нетоксичным и медленно растворяется в нетоксичных продуктах распада в организме, что позволяет использовать его во множестве медицинских устройств и фармацевтических систем доставки (см. Ahmed, T. (2015); Ortega-Oiler, I., et al. (2015); и Rahimian, S., et al. (2015)). Таким образом, его применение в медицинских устройствах было одобрено Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США.

Настоящее изобретение было мотивировано медицинскими и социальными потребностями в разработке способов введения аналога базового инсулина раз в неделю, два раза в месяц или один раз в месяц с целью улучшения удобства, безопасности и эффективности заместительной инсулиновой терапии для лечения сахарного диабета.

Сущность изобретения

Таким образом, одним из аспектов настоящего изобретения является предоставление полимерного расплава двухцепочечного или одноцепочечного аналога инсулина, который обладает достаточной термостойкостью и термодинамической устойчивостью, что позволяет сохранить биологическую активность после производства способом, который включает один или более обязательных этапов, осуществляемых в диапазоне температур 90-120°C. Более конкретно, настоящее изобретение относится к капсулированию в полимерном расплаве ультрастабильных аналогов инсулина, состоящих из двух элементов, обеспечивающих более высокую стабильность, один из которых является дополнительным дисульфидным мостиком между остатками В4 и А10. Второй элемент состоит из одного или более элементов, выбранных из группы (а) укороченного соединения (С) доменов между доменами А и В; (b) замены не являющейся β-разветвленной аминокислотой в положении А8 α-спирального С-САР; (с) не являющейся β-разветвленной кислотой или полярной боковой цепи в А14; (d) модификации галогеном ароматического кольца Phe^{B24} в орто-положении (положение 2 6-членного кольца; галоген, выбранный из группы фтор, хлор или бром) ароматической боковой цепи; и/или (e) замены Lys^{B29} аргинином, глутаминовой кислотой или природной аминокислотой с нейтральной алифатической боковой цепью (выбранной из группы Ala, Val, Ile или Leu) или боковой цепью аминокислоты неприродного происхождения с нейтральной алифатической боковой цепью (аминопропионовая кислота, аминокислотная кислота или норлейцин). Необязательно, либо в двухцепочечных, либо одноцепочечных аналогах остатки В1 или В2 могут быть удалены из В-цепи (или В-домена), а также Asn^{A21} необязательно может быть замещен Asp, Ala, Gly или Ser.

Аналоги по настоящему изобретению содержат гистидин в положении В10 и поэтому позволяют избежать проблемы, связанные с канцерогенезом, связанным с кислотным замещением (аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой) в этом положении. Дополнительным аспектом настоящего изобретения является то, что абсолютные показатели сродства *in vitro* двухцепочечного или одноцепочечного аналога инсулина к IR-А и IR-В находятся в диапазоне 5-150% по сравнению с человеческим инсулином дикого типа и, следовательно, вряд ли время его удержания в гормон-рецепторном комплексе будет существенно более продолжительным.

Таким образом, настоящее изобретение предусматривает капсулирование в полимерном расплаве аналогов инсулина, которые состоят из двух полипептидных цепей (обозначенных А и В), соединенных тремя дисульфидными мостиками (нативными мостиками В7-А7, В19-А20, сконструированным мостиком В4-А10; и дополнительным цистеином А6-А11 в А-цепи), содержащих одну или более модификаций (b-e). Альтернативно, в объем настоящего изобретения также входит капсулирование в полимерном рас-

плаве одноцепочечных аналогов инсулина (SCI), содержащих четыре дисульфидных мостика (B4-A10, B7-A7, B19-A20 и A6-A11) и одну из модификаций (a-e). SCI содержат укороченный соединяющий домен длиной 5-11 остатков, два N-концевых остатка которых содержат по меньшей мере один кислотный остаток. Двухцепочечные или одноцепочечные аналоги инсулина, находящиеся в полимерных расплавах по настоящему изобретению, необязательно могут содержать стандартные или нестандартные аминокислотные замены в других участках в доменах А или В.

Возможность наличия в активном SCI четвертого дисульфидного мостика как такового между положениями В4 и А10 (как определено в двухцепочечном инсулине дикого типа) не известна в данной области техники. Аналог инсулина, содержащий такой четвертый дисульфидный мостик, также не известен ни среди двухцепочечных, ни среди одноцепочечных аналогов, в комбинации с другим стабилизирующим элементом, предназначенным для капсулирования в полимерах.

Разработка нестандартных белков, включая терапевтические агенты и вакцины, может иметь широкие медицинские и социальные преимущества. Встречающиеся в природе белки, кодируемые в геномах человека, других млекопитающих, организмах позвоночных, организмах беспозвоночных или эукариотических клетках вообще, часто обладают многими видами биологической активности. Преимущество нестандартных белков может заключаться в достижении достаточной термостойкости и термодинамической устойчивости, позволяющих их капсулирование в полимерном расплаве без потери биологической активности способом производства, который содержит один или более этапов, осуществляемых в интервале температур 90-120°C. Еще одним примером общественной пользы может служить использование таких полимерных расплавов, содержащих аналог инсулина, что облегчает транспортировку, распределение и использование таких полимерных расплавов для лечения сахарного диабета у людей или других млекопитающих, таких как (без ограничения) собак или кошек с сахарным диабетом. Полимерные расплавы, содержащие аналог инсулина, могут быть изготовлены в виде микроигольных пластырей, наносимых на кожу, таких, что медленное растворение микроигл обеспечит длительное подкожное введение инсулина в течение по меньшей мере одной недели и, необязательно, до одного месяца. Альтернативно, полимерные расплавы, содержащие аналог инсулина, могут быть изготовлены в виде вводимых путем подкожной инъекции растворяемых микропеллет; их медленное растворение в подкожном пространстве также обеспечивало бы депо инсулина с медленным высвобождением в течение по меньшей мере одной недели и, возможно, до одного месяца.

Социальное преимущество настоящего изобретения является особенно значимым в развивающихся странах, в которых электричество и холодильное оборудование не всегда доступны. Проблема, связанная с физической деградацией жидких и микрокристаллических композиций инсулина и аналогов инсулина, была впервые признана в 1930-х гг. Эта проблема стала особенно острой в последнее десятилетие в связи с эпидемией сахарного диабета в Африке и Азии. Капсулирование в полимерах ультрастабильных двухцепочечных аналогов инсулина или ультрастабильных SCI, содержащих четвертый дисульфидный мостик между положениями В4 и А10 в комбинации по меньшей мере с одним другим стабилизирующим элементом, может повысить безопасность и эффективность заместительной инсулиновой терапии в таких сложных регионах.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А представляет собой схематическое представление последовательности человеческого проинсулина (SEQ ID NO:1), включающего А- и В-цепи, и соединяющий участок, показанный с фланкирующими сайтами расщепления, состоящими из двух оснований (закрашенные круги), и С-пептидом (открытые круги);

фиг. 1В - структурную модель проинсулина, состоящую из инсулиноподобного фрагмента и разупорядоченного соединяющего пептида (пунктирная линия);

фиг. 1С - схематическое представление последовательностей А-цепи (SEQ ID NO: 2) и В-цепи (SEQ ID NO: 3) человеческого инсулина дикого типа с указанием положения дисульфидных мостиков и положения остатка В24 в В-цепи;

фиг. 2 - 3D-модель SCI, стабилизированного четвертым дисульфидным мостиком. Звездочка указывает дисульфидный мостик В4-А10. Соответствующий искусственно введенный цистин в двухцепочечном аналоге инсулина (т.е. между положениями В4 и А10 в двух отдельных полипептидных цепях) может быть объединен по меньшей мере с одной дополнительной стабилизирующей модификацией в положениях А8, А14, В24 или В29;

фиг. 3А - фотографию флакона, содержащего полоски белково-полимерных смесей модифицированного инсулина, включая SCI, с четвертым дисульфидным мостиком (большой палец/указательный пальцы внизу показаны для масштаба);

фиг. 3В - график, показывающий уровни глюкозы в крови крыс в ответ на восстановленный SCI, не содержащий четвертый дисульфидный мостик, из белково-полимерных смесей, показанных на фиг. 3А;

фиг. 3С - график, показывающий уровни глюкозы в крови крыс в ответ на восстановленный модифицированный SCI, содержащий четвертый дисульфидный мостик, из белково-полимерных смесей, показанных на фиг. 3А;

фиг. 4 - график, показывающий элюцию ультрастабильного одноцепочечного аналога (SCI) из

PLGA полимера (50-50%) в забуференном фосфатом физиологическом растворе (pH 7,4 и 37°C). Горизонтальная ось обозначает время выдержки. Вертикальная ось обозначает наногаммы аналога инсулина (темно-серые треугольники) или относительно активный по Брэдфорду материал в контрольных полимерах, содержащих лизоцим куриного яичного белка (светло-серые квадраты) или не содержащих белок (темно-серые ромбы). Последний представляет собой фоновый сигнал в анализе по Брэдфорду виду наличия небелкового материала. Горизонтальное плато в дни 10-15 свидетельствует об отсутствии дальнейшей элюции белка из полимеров. Образцы изготавливали с 5% ПЭГ (средняя молекулярная масса 8 кДа) для оптимизации практически линейной скорости элюирования SCI в течение 1-10 дней. Мгновенное "взрывное" высвобождение части материала не показано;

фиг. 5 - график зависимости уровней глюкозы в крови от времени для 57-мерных SCI, содержащего (квадраты, SEQ ID NO: 15) и не содержащего (серые ромбы, SEQ ID NO: 16) четвертый дисульфидный мостик (между остатками B4 и A10), после подкожной инъекции самцам крыс линии Льюис (Lewis) с диабетом.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим полимерные расплавы двухцепочечного или одноцепочечного аналога инсулина, который демонстрирует настолько заметное увеличение теплостойкости и термодинамической устойчивости, что это позволяет подвергать его воздействию полимерного расплава способом, осуществляемым в интервале температур 90-120°C в течение по меньшей мере 10 мин (а) без потери биологической активности при растворении полимера в слое дермы или подкожном пространстве млекопитающего, или (б) без потери биологической активности при растворении полимера *in vitro* в физиологическом буфере или при разбавлении в кислом растворе во время инкубации при легком перемешивании при 37°C.

Особенностью настоящего изобретения является то, что изоэлектрическая точка аналогов инсулина может либо (i) находиться в диапазоне 3,0-6,0, обеспечивая растворимое промежуточное соединение в виде раствора при нейтральном pH, либо (ii) находиться в диапазоне 6.5 и 8.0, позволяя получить растворимый препарат в кислых условиях (pH 3,0-5,5). Предполагается, что такие последние аналоги, высвобождаемые в организме из полимерного расплава, будут осаждаться в изоэлектрических условиях в подкожном депо из-за сдвига pH практически до нейтрального значения. Такое осаждение может повысить безопасность полимерного устройства в случае внезапного или более быстрого растворения одной или более микроигл или микрогранул по сравнению с предполагаемым, исходя из объемных свойств расплавов исходных полимеров.

В одном из вариантов осуществления полимер может быть выбран из группы, состоящей из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), поли(капролактона), полимолочной кислоты, полигликолевой кислоты, поли(гидроксимасляной кислоты), хитозана, поли(себаценовой кислоты), полиангидридов, полифосфазенов, полиортоэфиров, сополимера молочной кислоты с капролактоном, сополимера гидроксипропаноата с валератом и их смесей и сополимеров. Кроме того, в качестве альтернативы также необязательно могут присутствовать порогены, такие как полиэтиленгликоль, NaCl и/или сахара, для регулирования скорости высвобождения инсулина из полимерной композиции.

Молекулярная масса полимера может быть выбрана в соответствии с требованиями конкретного применения и желаемой скоростью высвобождения инсулина. В одном из вариантов осуществления молекулярная масса полимера, такая как молекулярная масса полиэтиленгликоля, может иметь среднюю молекулярную массу менее 200 Да, от 200 до 1000 Да, от 1000 до 4500 Да, между 4500 и 9000 Да, между 9000 и 15000 Да, между 15000 Да и 25000 Да или более 25000 Да. В одном конкретном варианте осуществления может использоваться ПЭГ массой 8000 Да.

Предполагается, что одноцепочечные или двухцепочечные аналоги инсулина могут быть получены из последовательностей A- и B-цепей инсулина животных, таких как, без ограничения, свиного, бычьего, лошадиного и собачьего инсулина. В дополнение или в качестве альтернативы аналог инсулина по настоящему изобретению может содержать делецию остатка B1, остатков B1-B2 или остатков B1-B3 или может быть объединен с вариантом B-цепи, не содержащей лизин, чтобы избежать Lys-направленного протеолиза полипептида-предшественника в биосинтезе дрожжей в *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* или экспрессии других видов или штаммов дрожжей. Не ограничиваясь какой-либо теорией, было выдвинуто предположение, что замены, не являющиеся β -разветвленными, в положении A8 защищают двухцепочечные аналоги инсулина и SCI как от физической, так и от химической деградации благодаря их более оптимальным свойствам в α -спирали и/или в C-концевом положении α -спирали. Примеры стабилизирующих замен в A8 представлены, без ограничения, аргинином, глутаминовой кислотой и гистидином. Не ограничиваясь какой-либо теорией, было выдвинуто предположение, что заряженные или полярные замещения, не являющиеся β -разветвленными, в положении A14 будут защищать двухцепочечные аналоги инсулина и SCI как от физической, так и от химической деградации из-за уменьшения эффекта обратной зависимости от гидрофобности, связанного с воздействием растворителя $\text{H}_2\text{O}^{\text{A14}}$ на человеческий инсулин дикого типа. Также было высказано предположение, что среди предусмотренного набора стабилизирующих элементов модификация галогеном в положении 2 кольца Phe^{B24} (т.е. орто-F-

Phe^{B24}, орто-Cl-Phe^{B24} или орто-Br-Phe^{B24}, предназначенных для повышения термодинамической устойчивости и устойчивости к образованию фибрилл) обеспечивает молекулярный механизм, защищающий как от химической деградации, так и от физической деградации. Также было высказано предположение, что удаление имеющегося в нормальных условиях положительного заряда в положении B29 (обеспечиваемого Lys^{B29}) позволит постепенно повысить устойчивость двухцепочечного аналога инсулина, содержащего B4-A10 цистин, или SCI, содержащего B4-A10 цистин, к образованию фибрилл при повышенных температурах. Замена в положении B29 может представлять собой глютаминовую кислоту или нейтральную алифатическую стандартную или нестандартную аминокислоту. Стандартный нейтральный алифатический остаток выбирают из группы, состоящей из Ala, Val, Ile или Leu; указанный нестандартный остаток выбирают из группы аминокпропионовой кислоты, аминокислоты или норлейцина.

Кроме того, учитывая сходство между инсулинами человека и животных и введение в прошлом пациентам с сахарным диабетом инсулинов животных, также предполагается возможность наличия других незначительных модификаций в последовательности инсулина, в частности, замен, которые считаются "консервативными". Например, без отступления от объема настоящего изобретения могут быть введены дополнительные замены аминокислот в пределах групп аминокислот со сходными боковыми цепями. К ним относятся нейтральные гидрофобные аминокислоты аланин (Ala или A), валин (Val или V), лейцин (Leu или L), изолейцин (Ile или I), пролин (Pro или P), триптофан (Trp или W), фенилаланин (Phe или F) и метионин (Met или M). Аналогично, нейтральные полярные аминокислоты могут быть заменены другими в пределах своей группы глицин (Gly или G), серин (Ser или S), треонин (Thr или T), тирозин (Tyr или Y), цистеин (Cys или C), глутамин (Glu или Q) и аспарагин (Asn или N). К основным аминокислотам относятся лизин (Lys или K), аргинин (Arg или R) и гистидин (His или H). Кислые аминокислоты представляют собой аспарагиновую кислоту (Asp или D) и глютаминовую кислоту (Glu или E). Если не указано иное или там, где это очевидно из контекста, указанные в настоящем описании аминокислоты следует рассматривать как L-аминокислоты. Стандартные аминокислоты также могут быть замещены нестандартными аминокислотами, принадлежащими к тому же химическому классу. В качестве неограничивающего примера основная боковая цепь Lys может быть замещена основными аминокислотами с более короткой боковой цепью (орнитин, диаминомасляная кислота или диаминопропионовая кислота). Lys также может быть замещен нейтральным алифатическим изостером норлейцином (Nle), который, в свою очередь, может быть замещен аналогами, содержащими более короткие алифатические боковые цепи (аминомасляная кислота или аминокпропионовая кислота).

В качестве примера были получены белок-PG-LA полимерные смеси, содержащие инсулин лизпро (SEQ ID NO: 2 и 13), аналог инсулина лизпро (Lys^{B28}, Pro^{B29}-человеческий инсулин), дополнительно содержащий замены Cys^{A10}, Cys^{B4} (SEQ ID NO: 2 и 14), соответствующий SCI, состоящий из 59 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 9), и соответствующий 59-мерный SCI, модифицированный заменами Cys^{A10}, Cys^{B4}, для обеспечения четвертого дисульфидного мостика между остатками B4 и A10 (SEQ ID NO: 10). Эти SCI содержали C-домен последовательности EEGSRRSR. Домен A был модифицирован в положении A8 таким образом, чтобы он содержал аргинин вместо треонина. Домен B был модифицирован таким образом, чтобы он содержал аргинин вместо лизина, с тем, чтобы избежать протеазное расщепление в дрожжах *Pichia pastoris*. Таким образом, изоэлектрическая точка этого SCI находится в диапазоне 6,5-7,5, при этом он легко растворяется в диапазоне pH 2-4. Его сродство к A- и B-изоформам рецептора инсулина лежит в пределах 10-150% по сравнению с человеческим инсулином дикого типа, тогда как его сродство к рецептору IGF типа 1 в десять раз ниже, чем у инсулина дикого типа. Трехмерная модель этого SCI и предсказанное положение цистеина B4-A10 показаны на фиг. 2.

Вышеуказанные три полимерные смеси были отлиты в полоски (фиг. 3A). Полимеры растворяли в течение 2 дней в 0,01% трифторуксусной кислоте при 20°C для оценки потенциального восстановления функционального гормона. В то время как активный лизпро не восстанавливался, тесты на крысах показали 40% восстановление SCI (фиг. 3B) и, по существу, полное восстановление функционально модифицированного SCI, содержащего четвертый дисульфидный мостик (фиг. 3C). Устойчивость этого "гиперстабильного" аналога инсулина во время экструзии смеси полимера с белком, устойчивым к высоким температурам, является многообещающей перспективой в разработке технологии, позволяющей получать терапевтическую полимерную смесь для лечения сахарного диабета, которая растворяется в течение длительного времени. Следует отметить, что в этом примере используется одноцепочечный аналог инсулина, который имеет изоэлектрическую точку, равную примерно pH 7,4. Это указывает на возможные преимущества, получаемые от использования PK/PD свойств базального инсулина в качестве будущего механизма безопасности: если раскрошить микроиглу и быстро растворить подкожно, высвобожденный аналог образует осадок, не приводя к острой гипогликемии.

Также изучали элюцию белка-аналога инсулина из полимерного расплава в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) при pH 7,4. Тестируемые цилиндрические полимеры получали, используя 50%-50% PLGA, содержащий 25% по массе одноцепочечного аналога инсулина (SCI), стабилизированного четвертым дисульфидным мостиком между остатками B4 и A10. Аналог (обозначенный 4SS-81-06; SEQ ID NO: 12) содержит состоящий из шести остатков линкер с последовательностью EEGPRR, две замены в домене A (замена Thr^{A8} гистидином (His) и замена Tyr^{A14} глутамином (Glu)) и одну

замену в домене В (замена Lys^{B29} глутамином (Glu)). Смешанный порошок нагревали до 95°C в течение 10 мин, а затем быстро экструдировали с помощью специального шприца-экструдера. Экструдированные полимерные цилиндры (диаметром 1 мм и длиной 8 мм, 10 мг) получали, используя смеси порошков PL, GA и SCI, содержащих 0, 5 или 10% полиэтиленгликоля (ПЭГ, средняя молекулярная масса 8 кДа). Чтобы проверить влияние свободной молекулы ПЭГ на скорость высвобождения SCI из полимера, цилиндры помещали в забуференный фосфатом физиологический раствор при pH 7,4 и 37°C при слабом покачивании, с ежедневной заменой буфера. 500 мкл раствора ежедневно отбирали и заменяли 500 мкл свежего PBS с (0,1%) азидом натрия. Полимер помещали в раствор во второй половине дня 0, и образцы собирали через примерно 24 ч. Образец дня 0 собирали сразу (<5 мин) после погружения полимера в раствор.

В то время как в отсутствие ПЭГ (0%) за 10 дней высвободилось небольшое количество белка, добавление 10% ПЭГ привело к значительному высвобождению белка в течение 1-2 дней. Добавление 5% ПЭГ приводило к практически линейному высвобождению примерно половины загруженного белка в течение 10-дневного периода (треугольники на фиг. 4, измеренные с помощью анализа по Брэдфорду концентрации аналогов инсулина, откалиброванные с помощью анализа по Брэдфорду концентрации аналогов инсулина, откалиброванные с помощью анализа по Брэдфорду, содержащего вместо аналога инсулина лизоцим куриного яичного белка (квадраты на фиг. 4, произвольные единицы). В обоих случаях горизонтальное плато наблюдалось в течение 10-15 дней, что указывало на отсутствие дальнейшего высвобождения белка из полимера. Кумулятивные количества выделяемого белка также приведены ниже в табл. 1. В этой таблице микрограммы инсулина, соответствующие анализу по Брэдфорду, проверяли методом ELISA, тогда как результаты для лизоцима не калибровали независимым анализом.

Таблица 1

Кумулятивное количество высвобождаемого белка в день

День	<u>А (Чистый - PLGA)</u>	<u>В (Лизоцим+5%ПЭГ)</u>	<u>С (8106-4SS+5%ПЭГ)</u>
0	0,0104	0,0432	0,024
1	-0,0071	0,135	0,1766
2	0,0036	0,2289	0,2504
3	0,0127	0,2759	0,2896
4	0,0213	0,3104	0,3184
5	0,0365	0,3383	0,3574
6	0,0546	0,3978	0,4316
7	0,0482	0,3987	0,455
8	0,0574	0,44	0,5197
9	0,0679	0,5212	0,6054
10	0,0809	0,6783	0,7418
11	0,0828	0,7366	0,7452
12	0,0795	0,7297	0,7185
13	0,0802	0,7556	0,7246
14	0,0802	0,7556	0,7246
15	0,0915	0,7718	0,7387

Биологическую активность высвобожденного аналога гормона SCI (в полимерных расплавах, полученных с 5% ПЭГ) протестировали на самцах крыс линии Льюис с диабетом (средний вес - примерно 300 г; диабет вызывали стрептозотоцином со средней гликемией примерно 400 мг/дл); активность природного SCI по снижению уровня глюкозы в крови сравнивали с активностью белка, элюированного через день 1 и день 5. Биологическая активность этих трех образцов была неразличимой, что свидетельствует о том, что процесс экструзии терморасплава и окончательное высвобождение в физиологическом буфере при температуре тела не связаны с потерей удельной активности.

Таблица 2

Исулин	Дельта/час в течение первого получаса	SE	Дельта/час в течение первого часа	SE	Количество животных
С-1 (PLGA+25% 4SS-81-06+5% ПЭГ; 20 мкг)	-320,10	48,90	-315,11	6,96	2
С-5 (PLGA+25% 4SS-81-06+5% ПЭГ; 5 мкг)	-312,60	22,20	-224,36	2,36	2
Инсулин	Процент от базовой линии через 30 мин	SE	Процент от базовой линии через 60 мин	SE	Количество животных
С-1 (PLGA+25% 4SS-81-06+5% ПЭГ; 20 мкг)	0,6296	0,050	0,2964	0,0014	2
		4			
С-5 (PLGA+25% 4SS-81-06+5% ПЭГ; 5 мкг)	0,950	0,005	0,814	0,043	2

Сравнивали биологическую активность 57-мерного SCI (указанного в настоящем описании как 81-04, SEQ ID NO: 16) и биологическую активность его производного, содержащего четвертый дисульфидный мостик (4SS 81-04, SEQ ID NO: 15). При дозе 20 мкг на 300-граммовую крысу биологические активности были, по существу, идентичными (см. фиг. 5). Последовательность 81-04 аналогична последовательности SEQ ID NO: 12, за исключением отсутствия Cys^{A10}, Cys^{B4}; также остаток В28 представляет собой аспарагиновую кислоту, а остаток В29 представляет собой пролин. Это свидетельствует о том, что введение четвертого дисульфидного мостика в одноцепочечную молекулу аналога инсулина не изменяет основную биологическую активность SCI. С точки зрения предшествующего уровня техники удивительным оказалось то, что после введения четвертого дисульфидного мостика у двухцепочечных аналогов наблюдали заметное удлинение фармакодинамического ответа.

Также было определено сродство связывания аналога 81-04 и аналога 4SS 81-04 с рецептором. Было определено, что сродство 4SS 81-04 к изоформе А рецептора инсулина составляет 120±20% по сравнению с человеческим инсулином (и на самом деле может быть таким же, как у человеческого инсулина дикого типа с учетом данной ошибки; данные не показаны). Его сродство к изоформе В рецептора инсулина снижается в пять-десять раз по сравнению с человеческим инсулином дикого типа. Это предпочтение изоформы А аналогично предпочтению, наблюдаемому у исходного аналога 81-04. Кроме того, сродство 4SS 81-04 к митогенному рецептору IGF типа I (IGF-1R) снижается в пять-десять раз по сравнению с человеческим инсулином дикого типа (данные не показаны). Такое уменьшенное связывание с IGF-1R желательно с точки зрения потенциального канцерогенеза при длительном применении.

Последовательности описанных в настоящей заявке полипептидов представлены ниже. Аминокислотная последовательность человеческого проинсулина представлена в SEQ ID NO: 1 для сравнения.

SEQ ID NO:1 (человеческий проинсулин)

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

Аминокислотная последовательность А-цепи человеческого инсулина представлена в SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 2 (человеческая А-цепь)

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

Аминокислотная последовательность В-цепи человеческого инсулина представлена в SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 3 (человеческая В-цепь)

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

Аминокислотная последовательность одноцепочечных аналогов инсулина по настоящему изобретению представлена в SEQ ID NO: 4, содержащих четвертый цистеин в положениях В4 и А10 и соответствующих полипептидам длиной 56, 57, 57, 58, 59, 60, 61 и 62, таких, что SCI содержит по меньшей мере одну другую стабилизирующую модификацию в одном или более указанных положениях.

SEQ ID NO: 4

Phe-Val-Asn-Cys-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-
Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa₁-Phe-Tyr-Thr-Pro-
Xaa₂-Thr-[укороченный домен C]-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa₃-
Ser-Cys-Cys-Ser-Leu-Xaa₄-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa₅,

где Xaa₁ означает Phe или модификацию Phe атомом галогена (F, Cl или Br) в орто-положении или положении 2 кольца; Xaa₂ означает Glu, Ala, Ile, Leu, Val, норлейцин, аминопропионовую кислоту или аминокислотную кислоту; где Xaa₃ представляет собой His, Glu, Lys, Arg или другую не являющуюся β-разветвленной полярную или заряженную аминокислоту; где Xaa₄ представляет собой Tyr (как в инсулине дикого типа), Glu или другую не являющуюся β-разветвленной полярную или заряженную аминокислоту; и необязательно, где Xaa₅ представляет собой Gly, Ala, Asp или Ser. Термин "[укороченный C-домен]" в квадратных скобках означает соединяющий пептидный домен длиной 5-11 остатков, который содержит кислотный остаток либо в первом (N-концевом), либо в другом положении пептида (т.е. остатках 31 или 32 одноцепочечного аналога инсулина). Необязательно, Phe^{B1} может быть удален с получением аналога des-B1, или оба Phe^{B1} и Val^{B2} могут отсутствовать с получением аналога des-[B1,B2].

Аминокислотная последовательность двухцепочечных аналогов инсулина по настоящему изобретению представлена SEQ ID NO: 5-8, соответствующая В-цепи, содержащей цистеин в положении В4 (SEQ ID NO: 5, 7 и 8), и А-цепи, содержащей цистеин в положении А10 (SEQ ID NO: 6), с тем, чтобы интактный аналог инсулина содержал четвертый дисульфидный мостик между положениями В4 и А10 и, по меньшей мере, одну другую стабилизирующую модификацию в указанных положениях.

SEQ ID NO: 5 (вариант В-цепи):

Phe-Val-Asn-Cys-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-
Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa₁-Phe-Tyr-Thr-Pro-
Xaa₂-Thr,

где Xaa₁ означает Phe или модификацию Phe атомом галогена (F, Cl или Br) в орто-положении или положении 2 кольца; Xaa₂ означает Glu, Ala, Ile, Leu, Val, норлейцин, аминопропионовую кислоту или аминокислотную кислоту;

SEQ ID NO: 6 (вариант А-цепи):

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa₃-Ser-Cys-Cys-Ser-Leu-
Xaa₄-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa₅,

где Xaa₃ представляет собой His, Glu, Lys, Arg или другую не являющуюся β-разветвленной полярную или заряженную аминокислоту; где Xaa₄ представляет собой Tyr (как в инсулине дикого типа), Glu или другую не являющуюся β-разветвленной полярную или заряженную аминокислоту; и необязательно, где Xaa₅ представляет собой Gly, Ala, Asp или Ser.

SEQ ID NO: 7 (вариант des-[B1]-В цепи):

Val-Asn-Cys-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-
Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa₁-Phe-Tyr-Thr-Pro-Xaa₂-Thr

где Xaa₁ означает Phe или модификацию Phe атомом галогена (F, Cl или Br) в орто-положении или положении 2 кольца; Xaa₂ означает Glu, Ala, Ile, Leu, Val, норлейцин, аминопропионовую кислоту или аминокислотную кислоту.

SEQ ID NO: 8 (вариант des-[B1,B2]-В цепи):

Asn-Cys-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-
Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa₁-Phe-Tyr-Thr-Pro-Xaa₂-Thr

где Xaa₁ означает Phe или модификацию Phe атомом галогена (F, Cl или Br) в орто-положении или

положении 2 кольца; Хаа₂ означает Glu, Ala, Ile, Leu, Val, норлейцин, аминопропионовую кислоту или аминокислоту.

Одноцепочечные аналоги инсулина (SCI) представлены в SEQ ID NO: 9-12, 15 и 16.

SEQ ID NO: 9

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

SEQ ID NO: 10

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

SEQ ID NO: 11

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

SEQ ID NO: 12 (81-066-4SS)

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

SEQ ID NO: 13 (человеческая В-цепь, КР)

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

SEQ ID NO: 14 (человеческая В-цепь, Cys^{B4}, КР)

Phe-Val-Asn-Cys-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-
Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Lys-Pro-Thr

SEQ ID NO: 15 (4SS 81-04; 57-мерный)

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

SEQ ID NO: 16 (81-04; 57-мерный)

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

Исходя из вышесказанного, очевидно, что представленные одноцепочечные аналоги инсулина будут выполнять изложенные выше задачи. А именно, эти аналоги инсулина проявляют повышенную устойчивость к образованию фибрилл, сохраняя при этом желательные фармакокинетические и фармакодинамические особенности (обеспечение пролонгированного действия) и сохраняя по меньшей мере часть биологической активности инсулина дикого типа. Поэтому следует понимать, что любые очевидные изменения подпадают в объем заявленного изобретения и, таким образом, выбор конкретных компонентов может быть определен без отклонения от сущности раскрытого и описанного в настоящей заявке изобретения.

Приведенные ниже источники литературы даны для демонстрации того, что описанные в настоящей заявке методы тестирования и анализа будут понятны специалисту в данной области техники.

- Ahmed, T. 2015. Review: approaches to develop PLGA based in situ gelling system with low initial burst. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28:657-65.
- Hohsaka, T., & Sisido, M. 2012. Incorporation of non-natural amino acids into proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 809-15.
- Hua, Q.X., Nakagawa, S.H., Jia, W., Huang, K., Phillips, N.B., Hu, S. & Weiss, M.A. (2008) Design of an active ultrastable single-chain insulin analog: synthesis, structure, and therapeutic implications. *J. Biol. Chem.* 283, 14703-14716.
- Kristensen, C., Andersen, A.S., Hach, M., Wiberg, F.C., Schäffer, L., & Kjeldsen, T. 1995. A single-chain insulin-like growth factor I/insulin hybrid binds with high affinity to the insulin receptor. *Biochem. J.* 305, 981-6.
- Lee, H.C., Kim, S.J., Kim, K.S., Shin, H.C., & Yoon, J.W. 2000. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 408, 483-8. Retraction in: Lee HC, Kim KS, Shin HC. 2009. *Nature* 458, 600.
- Lee, P, Towslee J, Maia J, and Pokorski J. 2015. PEGylation to Improve Protein Stability During Melt Processing. *Macromol. Biosci.* 15:1332-7.
- Ortega-Oller, I, Padial-Molina M, Galindo-Moreno P, O'Valle F, Jódar-Reyes AB, and Peula-García JM. 2015. Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles. *Biomed. Res. Int.* 2015:415289.
- Phillips, N.B., Whittaker, J., Ismail-Beigi, F., & Weiss, M.A. (2012) Insulin fibrillation and protein design: topological resistance of single-chain analogues to thermal degradation with application to a pump reservoir. *J. Diabetes Sci. Technol.* 6, 277-288.
- Rahimian, S., Fransen MF, Kleinovink JW, Amidi M, Ossendorp F, and Hennink WE. 2015. Particulate Systems Based on Poly(Lactic-co-Glycolic)Acid (pLGA) for Immunotherapy of Cancer. *Curr. Pharm. Des.* 21:4201-16.
- Vinther TN, Pettersson I, Huus K, Schlein M, Steensgaard DB, Sørensen A, Jensen KJ, Kjeldsen T, and Hubalek F. 2015. Additional disulfide bonds in insulin: Prediction, recombinant expression, receptor binding affinity, and stability. *Protein Sci.* 24:779-88.

Vinther TN, Norrman M, Ribel U, Huus K, Schlein M, Steensgaard DB, Pedersen TÅ, Pettersson I, Ludvigsen S, Kjeldsen T, Jensen KJ, and Hubálek F. 2013. Insulin analog with additional disulfide bond has increased stability and preserved activity. *Protein Sci.* 22:296-305.

Wang, Z.X. 1995. An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule *FEBS Lett.* 360: 111-114.

Whittaker, J., and Whittaker, L. 2005. Characterization of the functional insulin binding epitopes of the full-length insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 280: 20932-20936.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция инсулина, содержащая аналог инсулина и полимерную смесь, где аналог инсулина содержит цистеиновые замены в положениях, соответствующих остаткам В4 и А10, относительно инсулина дикого типа, соединяющий домен из 5-11 аминокислот между доменами А и В аналога инсулина и одну или более дополнительных замен, выбранных из группы, состоящей из

(a) замены не являющейся β-разветвленной аминокислотой в положении, соответствующем положению А8 инсулина дикого типа;

(b) не являющейся β-разветвленной кислотной или полярной боковой цепи в положении, соответствующем положению А14 инсулина дикого типа;

(c) модификации галогеном ароматического кольца Phe в положении, соответствующем положению В24 инсулина дикого типа в орто-положении ароматической боковой цепи; и

(d) замены лизина в положении, соответствующем положению В29 инсулина дикого типа, аргинином, глутаминовой кислотой, аланином, валином, изолейцином, лейцином, аминокпропионовой кислотой, аминокмасляной кислотой или норлейцином;

где аналог инсулина и полимерная смесь комбинируются в процессе производства, который включает один или более этапов в интервале температур 90-120°C, для обеспечения композиции инсулина.

2. Композиция инсулина по п.1, где полимер состоит из сополимера молочной и гликолевой кислот (PL-GA).

3. Композиция инсулина по п.2, в которой полимер состоит из сополимера молочной и гликолевой кислот (PL-GA), такого, что процентное содержание PL составляет от 25 до 75%.

4. Композиция инсулина по п.3, в которой полимер состоит из сополимера молочной и гликолевой кислот (PL-GA), такого, что процентное содержание PL составляет 50%.

5. Композиция инсулина по п.2, дополнительно содержащая полиэтиленгликоль.

6. Композиция инсулина по любому из пп.1-5, где аналог инсулина представляет собой одноцепочечный аналог инсулина, который содержит по меньшей мере одно из следующего:

замену аланином, гистидином, глутаминовой кислотой или аргинином в положении, соответствующем положению А8 инсулина дикого типа, и

замену аланином, глутаминовой кислотой или аргинином в положении, соответствующем положению А14 инсулина дикого типа.

7. Композиция инсулина по п.6, где аналог инсулина включает глутаминовую кислоту по меньшей мере в одном из первых двух положений соединяющего домена.

8. Композиция инсулина по п.7, где аналог инсулина имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 12 и 15.

9. Композиция инсулина по любому из пп.1-5, где аналог инсулина содержит SEQ ID NO: 5.

10. Композиция инсулина по п.9, дополнительно содержащая SEQ ID NO: 6.

11. Композиция инсулина, содержащая аналог инсулина и полимерную смесь, где аналог инсулина содержит полипептид А-цепи инсулина, содержащий цистеиновую замену в положении, соответствующем остатку А10, относительно инсулина дикого типа, и полипептид В-цепи инсулина, содержащий цистеиновую замену в положении, соответствующем остатку В4, относительно инсулина дикого типа, и одну или более дополнительных замен, выбранных из группы, состоящей из

(a) замены не являющейся β-разветвленной аминокислотой в положении, соответствующем положению А8 инсулина дикого типа;

(b) не являющейся β-разветвленной кислотной или полярной боковой цепи в положении, соответствующем положению А14 инсулина дикого типа;

(с) модификации галогеном ароматического кольца Phe в положении, соответствующем положению В24 инсулина дикого типа в орто-положении ароматической боковой цепи; и

(d) замены лизина в положении, соответствующем положению В29 инсулина дикого типа, аргинином, глутаминовой кислотой, аланином, валином, изолейцином, лейцином, аминокпропионовой кислотой, аминокмасляной кислотой или норлейцином;

где аналог инсулина и полимерная смесь комбинируются в процессе производства, который включает один или более этапов в интервале температур 90-120°C, для обеспечения композиции инсулина.

12. Композиция инсулина по любому из пп.1-5, где композиция инсулина содержится в микроигльном пластыре для местного применения.

13. Композиция инсулина по любому из пп.1-5, где композиция инсулина содержится в суспензии микросфер для подкожной инъекции.

14. Способ лечения сахарного диабета у человека или млекопитающего, включающий введение композиции инсулина по любому из пп.1-13.

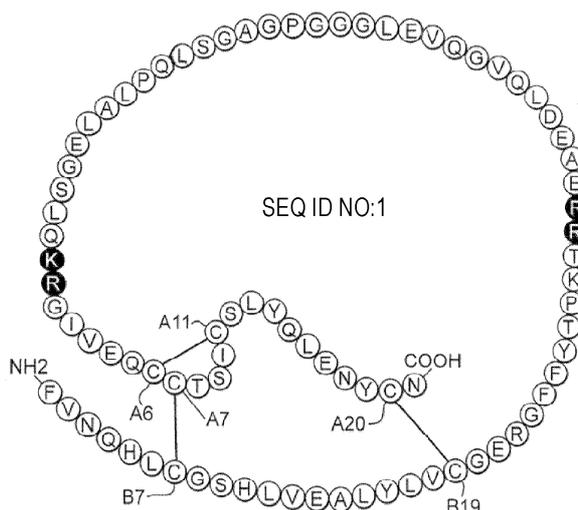
15. Способ по п.14, где композицию инсулина вводят с помощью устройства, прикрепленного к коже.

16. Способ по п.14, в котором композицию инсулина вводят путем подкожной инъекции или имплантации.

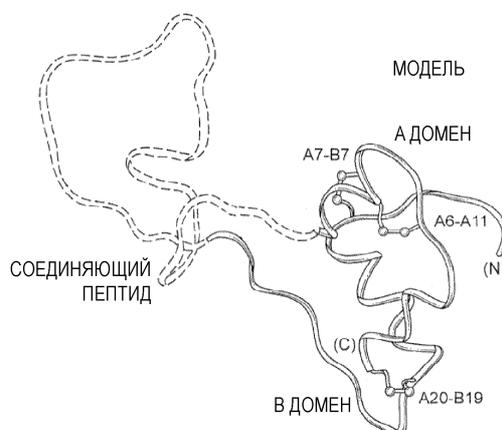
17. Применение композиции инсулина по любому из пп.1-5 в качестве лекарственного средства для снижения уровня глюкозы в крови у пациента.

18. Применение композиции инсулина по любому из пп.1-5 для изготовления лекарственного средства для лечения сахарного диабета у пациента или другого млекопитающего.

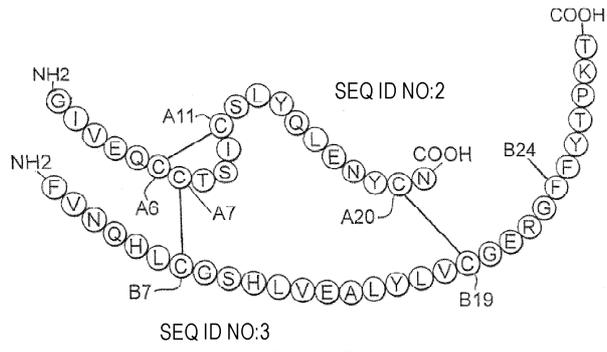
19. Применение композиции инсулина по любому из пп.1-5 для лечения сахарного диабета.



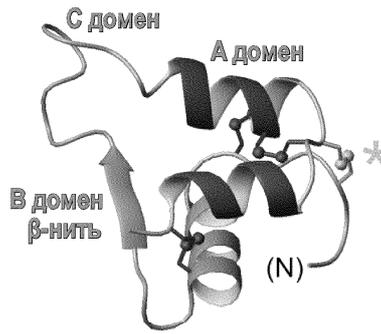
Фиг. 1А
Пролинсулин
(Предшествующий уровень техники)



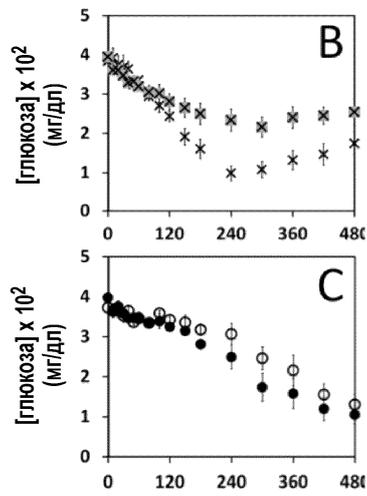
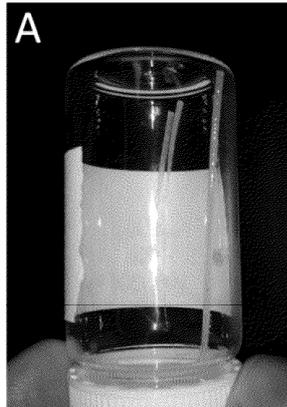
Фиг. 1В
(Предшествующий уровень техники)



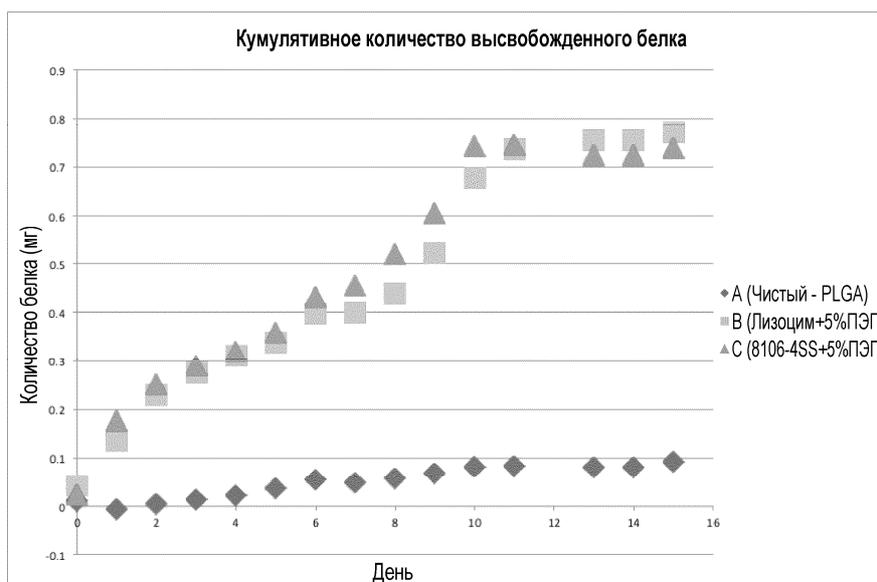
Фиг. 1С
(Предшествующий уровень техники)



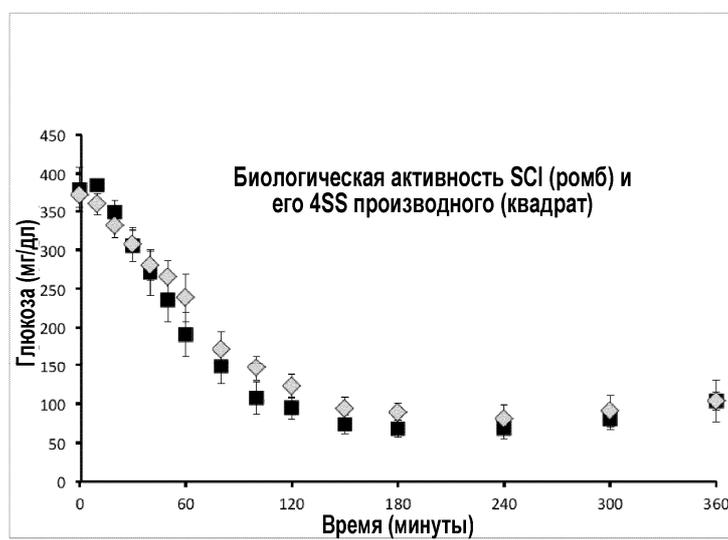
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2