

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291420** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.11.07

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

(22) Дата подачи заявки
2020.12.10

(54) **НОВЫЕ АНАЛОГИ ИНСУЛИНА И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 19215315.3

(32) 2019.12.11

(33) EP

(86) PCT/EP2020/085541

(87) WO 2021/116292 2021.06.17

(71) Заявитель:
НОВО НОРДИСК А/С (DK)

(72) Изобретатель:

Хубалек Франтишек, Норрман
Магиас, Ольсен Хелле Бирк (DK),
Мадсен Петер (умер), Кьельдсен
Томас Бёрглум, Стурис Йенне (DK)

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к области терапевтических лекарственных средств для лечения патологических состояний, связанных с диабетом. Более конкретно, настоящее изобретение относится к инсулиновым аналогам человеческого инсулина. В настоящем изобретении представлены фармацевтические композиции, содержащие такие аналоги инсулина, и варианты применения таких аналогов для лечения или предупреждения патологических состояний, связанных с диабетом.

202291420

A1

A1

202291420

НОВЫЕ АНАЛОГИ ИНСУЛИНА И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к новым аналогам человеческого инсулина, фармацевтическим композициям, содержащим такие аналоги инсулина, и применению
5 таких аналогов для лечения или предупреждения патологических состояний, связанных с диабетом.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Настоящая заявка подается с перечнем последовательностей в электронной
10 форме. Полное содержание перечня последовательностей включено в данный документ посредством ссылки.

СВЕДЕНИЯ О ПРЕДШЕСТВУЮЩЕМ УРОВНЕ ТЕХНИКИ

Инсулиноterapia для лечения диабета применялась в течение десятилетий. Одним из основных достижений в инсулинотерапии стало введение
15 быстродействующих аналогов инсулина.

Инсулин характеризуется свойствами самоассоциации, и основным фактором самоассоциации является его концентрация. При высоких концентрациях, в частности в фармацевтических композициях, инсулин будет самоассоциироваться в димер, гексамер, додекамер или более высокомолекулярные структуры. Однако
20 физиологически активной формой инсулина является мономер, который связывается с инсулиновым рецептором и вызывает биологический ответ. Снижение самоассоциации аналогов инсулина, в частности при высокой концентрации в фармацевтической композиции, является сложной задачей.

Скорость действия инсулина зависит от того, насколько быстро инсулин
25 всасывается из подкожной жировой клетчатки. Как правило, если коммерчески доступную композицию на основе инсулина вводят подкожно, композиция в основном состоит из гексамеров, содержащих два иона цинка. Хотя эти два иона цинка, расположенные внутри гексамера, способствуют стабилизации молекулы в отношении химической и физической деградации в композиции, и из-за своего размера

гексамерный инсулин характеризуется более низкой скоростью диффузии, поэтому скорость всасывания является более медленной, чем у соединений меньшего размера.

5 Патентные документы WO 2017/032795 и WO 2017/032798 относятся к ацилированным аналогам инсулина в композиции с низким содержанием цинка или композиции, не содержащей цинк.

Композиции на основе инсулина, не содержащего цинк, обеспечивают более быстрое подкожное всасывание, но химическая и физическая стабильность композиций, не содержащих цинк, является сложной задачей, в частности при высоких концентрациях.

10 Существует острая потребность в быстродействующих аналогах инсулина, которые в то же время достаточно физически и химически стабильны при высоких концентрациях в композиции, не содержащей цинк.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 В самом широком аспекте настоящее изобретение относится к быстродействующим аналогам человеческого инсулина.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, содержащим аминокислотную модификацию в положении A9 и дополнительно содержащим не более от 5 до 10 аминокислотных модификаций по сравнению с человеческим инсулином.

20 В одном аспекте настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином.

25 В одном аспекте настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином и/или дополнительно содержит по меньшей мере одно из B26Glu, B27Glu и/или B28Glu.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp и дополнительно содержит B3Glu

и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином и/или дополнительно содержит по меньшей мере одно из B26Glu, B27Glu и/или B28Glu и дополнительно содержит замену A21Ala.

5 В одном аспекте настоящее изобретение относится к аналогам инсулина, которые являются мономерными в фармацевтической композиции, не содержащей цинк.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлены физически и/или химически стабильные аналоги инсулина в фармацевтической композиции, не содержащей цинк.

10 В другом аспекте аналоги инсулина по настоящему изобретению являются мономерными, химически и физически стабильными даже при высокой концентрации в фармацевтической композиции, не содержащей цинк.

15 В одном аспекте настоящего изобретения представлены аналоги инсулина, которые всасываются быстрее после подкожного введения, за счет чего проявляется их потенциальная клиническая ценность в качестве быстродействующих инсулинов (также называемых болюсными или прандиальными инсулинами).

20 В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, не содержащей цинк, которая содержит аналоги инсулина по настоящему изобретению и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

В дополнительном аспекте аналоги инсулина по настоящему изобретению совместимы с системой доставки инсулина.

В дополнительном аспекте аналоги инсулина по настоящему изобретению совместимы с системой доставки инсулина с замкнутым контуром.

25 В еще одном аспекте аналоги инсулина по настоящему изобретению являются подходящими для применения в инсулиновых помпах.

Настоящее изобретение также может обеспечить решение дополнительных задач, которые будут очевидными из раскрытия иллюстративных вариантов осуществления.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

5 На фиг. 1 изображен PD-профиль аналогов инсулина из примера 1 и примера 2 в фармацевтической композиции С по настоящему изобретению после введения свиньям LYD по сравнению с Fiasp® (инсулин аспарт).

10 На фиг. 2 изображен РК-профиль аналогов инсулина из примера 1 и примера 2 в фармацевтической композиции С по настоящему изобретению после введения свиньям LYD по сравнению с Fiasp® (инсулин аспарт).

ОПИСАНИЕ

15 Настоящее изобретение относится к быстродействующим аналогам инсулина, которые являются мономерными, обеспечивают приемлемую химическую и физическую стабильность в фармацевтической композиции, не содержащей цинк, и более быстрое всасывание после подкожного введения, чем коммерчески доступный Fiasp® (инсулин аспарт).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если в описании не указано иное, термины, представленные в форме единственного числа, также включают множественное число.

20 Выражения «изобретение» и «настоящее изобретение» используются взаимозаменяемо.

Выражение «приблизительно» используется в данном документе для обозначения плюс или минус 10%, например, плюс или минус 5%. Следовательно, выражение «приблизительно 100 ЕД» означает от 90 ЕД до 110 ЕД.

25 В следующей таблице приведены концентрации человеческого инсулина в мМ и соответствующие концентрации в (ЕД), эквивалентные человеческому инсулину:

Концентрация аналога инсулина (в мМ)	Концентрация аналога инсулина в (ЕД), эквивалентная человеческому инсулину
--------------------------------------	--

0,6	100 ЕД
1,2	200 ЕД
1,8	300 ЕД
2,4	400 ЕД
3,0	500 ЕД
3,6	600 ЕД

Термин «**аминокислота**» включает протеиногенные (или природные) аминокислоты (среди них 20 стандартных аминокислот), а также непротеиногенные (или неприродные) аминокислоты. Протеиногенными являются те аминокислоты, которые в естественных условиях входят в состав белков. Стандартными аминокислотами являются аминокислоты, кодируемые генетическим кодом. Непротеиногенные аминокислоты либо не обнаруживаются в белках, либо не синтезируются стандартным клеточным аппаратом (например, они могут быть подвергнуты посттрансляционной модификации).

Как правило, аминокислотные остатки (последовательности пептидов/белков), используемые в данном документе, можно идентифицировать по их полному названию, их однобуквенному коду и/или их трехбуквенному коду. Такие три способа являются полностью эквивалентными и взаимозаменяемыми. Например: Аспарагиновая кислота представлена Asp или D; глутаминовая кислота представлена Glu или E; аланин представлен Ala или A.

В дальнейшем следует понимать, что каждая аминокислота в составе пептидов по настоящему изобретению, для которой не указан оптический изомер, означает L-изомер (если не указано иное). Аминокислоты представляют собой молекулы, содержащие аминогруппу и группу карбоновой кислоты и необязательно одну или более дополнительных групп, часто называемых боковой цепью. В данном документе термин «аминокислотный остаток» представляет собой аминокислоту, в которой фактически гидроксигруппа была удалена из карбоксигруппы, и/или в которой фактически атом водорода был удален из аминогруппы.

Термин «**соединение**», используемый в данном документе, означает химическое соединение, и, таким образом, «соединения» могут содержать разные структурные элементы, помимо минимального элемента, определенного для каждого соединения или группы соединений. Подразумевается, что термин «соединение» также охватывает его фармацевтически подходящие формы, т. е. настоящее изобретение относится к

соединению, определенному в данном документе, или к его фармацевтически приемлемым соли, амиду или сложному эфиру.

Термин «**человеческий инсулин**», используемый в данном документе, означает гормон, представляющий собой человеческий инсулин, структура и свойства которого являются общеизвестными. Человеческий инсулин содержит две полипептидные цепи, называемые А-цепь и В-цепь. А-цепь представляет собой пептид из 21 аминокислоты, и В-цепь представляет собой пептид из 30 аминокислот, при этом две цепи связаны дисульфидными мостиками: первым мостиком между цистеином в положении 7 А-цепи и цистеином в положении 7 В-цепи, и вторым мостиком между цистеином в положении 20 А-цепи и цистеином в положении 19 В-цепи. Третий мостик расположен между цистеинами в положениях 6 и 11 А-цепи.

А-цепь человеческого инсулина характеризуется следующей последовательностью: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO: 1), в то время как В-цепь характеризуется следующей последовательностью: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2).

В организме человека гормон синтезируется в виде одноцепочечного предшественника проинсулина (препроинсулина), состоящего из препептида из 24 аминокислот, который в дальнейшем конвертируется в проинсулин, содержащий 86 аминокислот в конфигурации: препептид-В-Arg Arg-C-Lys Arg-А, где С представляет собой связывающий пептид из 31 аминокислоты. Arg-Arg и Lys-Arg представляют собой сайты расщепления, предназначенные для отщепления связывающего пептида от А- и В-цепей.

«**Инсулин**» в соответствии с настоящим изобретением в данном документе следует понимать как человеческий инсулин или инсулин от других видов, таких как свиной или бычий инсулин.

«**Быстродействующий инсулин**», используемый в данном документе, означает аналоги инсулина в соответствии с настоящим изобретением, которые начинают действовать через приблизительно 15 минут после инъекции, достигают пика через приблизительно 1 час и продолжают действовать в течение от 2 до 4 часов. Типы: Инсулин глулизин (Apidra), инсулин лизпро (Admelog, Humalog) и инсулин аспарт (Fiasp, NovoLog).

Термин «пептид инсулина», «соединение инсулина» или «инсулин», используемый в данном документе, обозначает пептид, который представляет собой либо человеческий инсулин, либо его аналог с активностью инсулина, т. е. который активирует рецептор инсулина.

5 Обозначение

Название аналогам инсулина по настоящему изобретению присваивают в соответствии со следующими принципами.

Например, аналог человеческого инсулина В3Е, В27Е, В28Е, desВ30 указывает на то, что аминокислота в положении В3, аспарагин (N), была заменена глутаминовой кислотой (E), аминокислота в положении В27, треонин (T) в человеческом инсулине была заменена глутаминовой кислотой (E), аминокислота в положении В28, пролин (P), в человеческом инсулине была заменена глутаминовой кислотой (E) и аминокислотой в положении В30, треонин, T, в человеческом инсулине был удален.

Аналог инсулина

15 Термин «аналог инсулина», используемый в данном документе, означает модифицированный человеческий инсулин, в котором один или более аминокислотных остатков инсулина заменены другими аминокислотными остатками, и/или где один или более аминокислотных остатков удалены из инсулина, и/или где один или более аминокислотных остатков добавлены и/или встроены в инсулин. Термины «аналог
20 инсулина» или «аналог человеческого инсулина» используются взаимозаменяемо.

Термин «аминокислотная модификация», используемый в данном документе, означает замену, делецию, добавление или вставку аминокислоты и любую их комбинацию по сравнению с человеческим инсулином.

Модификации в молекуле инсулина обозначены с указанием цепи (А или В),
25 положения и одно- или трехбуквенного кода для аминокислотного остатка, заменяющего нативный аминокислотный остаток.

В одном варианте осуществления аналог инсулина содержит не более 10 аминокислотных модификаций (замещений, делеций, добавлений (в том числе вставки) и любую их комбинацию) по сравнению с человеческим инсулином, в качестве

альтернативы не более 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 модификации по сравнению с человеческим инсулином.

Аналоги, **«содержащие»** определенные указанные изменения, могут содержать дополнительные изменения по сравнению с А-цепью (SEQ ID NO: 1) и/или В-цепью человеческого инсулина (SEQ ID NO:2).

Под **«связывающим пептидом»** или **«С-пептидом»** понимают связывающий фрагмент «С» в полипептидной последовательности В-С-А одноцепочечной молекулы проинсулина. В цепи человеческого инсулина С-пептид связывает положение 30 В-цепи и положение 1 А-цепи, а его длина составляет 35 аминокислотных остатков. Связывающий пептид включает последовательность из двух концевых двухосновных аминокислот, например Arg-Arg и Lys-Arg, которые служат в качестве сайтов расщепления для отщепления связывающего пептида от А- и В-цепей с образованием двухцепочечной молекулы инсулина.

Под **«desB30»** или **«В(1-29)»** понимают природную В-цепь инсулина или ее аналог, в которых отсутствует аминокислота В30, а **«А(1-21)»** означает природную А-цепь инсулина. Так, например, человеческий инсулин desB30 представляет собой аналог человеческого инсулина, в котором аминокислота в положении 30 в В-цепи удалена.

Термин **«пептид»** или **«полипептид»**, например, при использовании в контексте настоящего изобретения, означает соединение, которое содержит ряд аминокислот, соединенных между собой амидными (или пептидными) связями. В конкретном варианте осуществления пептид состоит из аминокислот, соединенных между собой пептидными связями.

Термин **«химическая стабильность»** белкового препарата, используемый в данном документе, относится к изменениям в ковалентной структуре белка, приводящим к образованию продуктов химической деградации с потенциально меньшей биологической эффективностью и/или потенциально повышенными иммуногенными свойствами по сравнению с нативной структурой белка. В зависимости от типа и природы нативного белка и окружающей среды, воздействию которой подвергается белок, могут образовываться различные продукты химической деградации. Во время хранения и использования белкового препарата часто

наблюдается повышение количества продуктов химической деградации. Большинство белков склонны к дезамидированию, процессу, при котором амидная группа боковой цепи в глутаминильных или аспарагинильных остатках гидролизуется с образованием свободной карбоновой кислоты или аспарагинильных остатков с образованием производного isoAsp. Другие пути деградации включают образование высокомолекулярных продуктов (HMWP), где две или более белковых молекул ковалентно связаны друг с другом посредством, например, трансамидирования и/или дисульфидных взаимодействий, приводящих к образованию ковалентно связанных димерных, олигомерных и полимерных продуктов деградации (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern TJ & Manning MG, Plenum Press, New York 1992). В качестве еще одного варианта химической деградации можно упомянуть окисление. Химическая стабильность белкового препарата может быть оценена путем измерения количества продуктов химической деградации в различных временных точках после воздействия различными условиями окружающей среды (образование продуктов деградации часто может быть ускорено, например, за счет повышения температуры). Количество каждого отдельного продукта деградации часто определяют путем разделения продуктов деградации в зависимости от размера молекулы, гидрофобности и/или заряда с применением различных методик хроматографии (например, SEC-HPLC и/или RP-HPLC). Поскольку продукты HMWP являются потенциально иммуногенными и не характеризуются биологической активностью, предпочтительно, чтобы уровни HMWP были низкими.

Термин «**физическая стабильность**» препарата инсулина, используемый в данном документе, относится к склонности белка образовывать биологически неактивные и/или нерастворимые агрегаты белка в результате воздействия на белок термомеханических стрессов и/или взаимодействия с поверхностями раздела и поверхностями, которые являются дестабилизирующими, такими как гидрофобные поверхности и поверхности раздела. Физическую стабильность водных белковых препаратов оценивают посредством визуального осмотра и/или измерений мутности после воздействия на препарат, помещенный в подходящие контейнеры (например, картриджи или флаконы), механическим/физическим стрессом (например, встряхиванием) при различных температурах в течение различных периодов времени. Визуальный осмотр препаратов проводят при резком сфокусированном свете на темном фоне. Препарат классифицируют как физически нестабильный в отношении

агрегации белков, если он демонстрирует визуальную мутность при дневном свете. В качестве альтернативы мутность препарата может быть оценена с помощью простых измерений мутности, хорошо известных специалистам в данной области техники. Физическая стабильность водных белковых препаратов также может быть оценена с помощью спектроскопического средства или зонда конформационного статуса белка. Зонд предпочтительно представляет собой небольшую молекулу, которая предпочтительно связывается с ненативным конформером белка. Одним из примеров небольшого молекулярного спектроскопического зонда белковой структуры является тиофлавин Т. Тиофлавин Т представляет собой флуоресцентный краситель, который широко используется для обнаружения амилоидных фибрилл. В присутствии фибрилл и, возможно, других белковых конфигураций, тиофлавин Т приводит к образованию нового максимума возбуждения при приблизительно 450 нм и повышенного испускания при приблизительно 482 нм при связывании с фибриллярной формой белка. Несвязанный тиофлавин Т практически не флуоресцирует при этих длинах волн.

15 Термин «**высокая концентрация**» препарата инсулина, используемый в данном документе, относится к концентрации инсулина, которая составляет 200 ЕД или выше, 1,2 мМ или выше.

В одном варианте настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, содержащим аминокислотную модификацию в положении А9 и дополнительно содержащим от 1 до 10 аминокислотных модификаций по сравнению с человеческим инсулином.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к аналогам инсулина, содержащим аминокислотную модификацию в положении А9 по сравнению с человеческим инсулином и дополнительно содержащим аминокислотную модификацию в положении В3 и/или desВ30 по сравнению с человеческим инсулином.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит А9Glu или А9Asp.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит А9Glu или А9Asp и дополнительно содержит от 1 до 10 аминокислотных модификаций по сравнению с человеческим инсулином.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к аналогам инсулина, содержащим A9Glu или A9Asp по сравнению с человеческим инсулином и дополнительно содержащим аминокислотную модификацию в положении B3 и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином.

5 В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu, или A9Asp, или A9Gln, и
10 дополнительно содержит B3Glu или B3Gln и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином.

Настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp, и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином, и дополнительно содержит от 5 до 10
15 аминокислотных модификаций по сравнению с человеческим инсулином.

Настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp, и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином, и дополнительно содержит не более 10 аминокислотных модификаций по сравнению с человеческим инсулином.

20 Настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp, и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином, и дополнительно содержит не более 8 аминокислотных модификаций по сравнению с человеческим инсулином.

Настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где
25 аналог содержит A9Glu или A9Asp, и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином, и дополнительно содержит не более 6 аминокислотных модификаций по сравнению с человеческим инсулином.

Настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp, и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по

сравнению с человеческим инсулином, и дополнительно содержит не более 4 аминокислотных модификаций по сравнению с человеческим инсулином.

Настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp, и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином, и дополнительно содержит не более 3 аминокислотных модификаций по сравнению с человеческим инсулином.

Настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp, и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином, и дополнительно содержит не более 2 аминокислотных модификаций по сравнению с человеческим инсулином.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp, и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином, и дополнительно содержит по меньшей мере одно из B26Glu, B27Glu и/или B28Glu.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu, или A9Asp, или A9Gln, и дополнительно содержит B3Glu или B3Gln и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином, и дополнительно содержит по меньшей мере одно из B26Glu, B27Glu и/или B28Glu.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu или A9Asp, и дополнительно содержит B3Glu и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином и/или дополнительно содержит по меньшей мере одно из B26Glu, B27Glu и/или B28Glu, и дополнительно содержит замену A21A.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к аналогам человеческого инсулина, где аналог содержит A9Glu, или A9Asp, или A9Gln, и дополнительно содержит B3Glu или B3Gln и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином и/или дополнительно содержит по меньшей мере одно из B26Glu, B27Glu и/или B28Glu, и дополнительно содержит замену A21A.

Показания для применения фармацевтического препарата

Диабет

Термин «диабет» или «сахарный диабет» включает диабет 1 типа, диабет 2 типа, гестационный диабет (во время беременности) и другие состояния, которые обуславливают гипергликемию. Термин используют для нарушения метаболизма, при котором поджелудочная железа продуцирует недостаточные количества инсулина, или при котором клетки организма не способны соответствующим образом отвечать на инсулин, что таким образом препятствует поглощению глюкозы клетками. В результате глюкоза накапливается в крови.

Диабет 1 типа, также называемый инсулинозависимым сахарным диабетом (IDDM) и ювенильным диабетом, обусловлен разрушением В-клеток, что обычно приводит к полному дефициту инсулина.

Диабет 2 типа, также известный как инсулинонезависимый сахарный диабет (NIDDM) и диабет зрелого возраста, связан с преобладающей резистентностью к инсулину и, как следствие, относительным дефицитом инсулина и/или преимущественно недостаточностью секреции инсулина с резистентностью к инсулину.

Способы синтеза

Аналоги инсулина по настоящему изобретению могут быть получены посредством обычных способов получения аналогов инсулина и, в частности, способов, описанных в рабочих примерах.

Биологическая активность

Аналоги инсулина по настоящему изобретению являются быстродействующими.

Все аналоги инсулина по настоящему изобретению характеризуются показателями аффинности к инсулиновому рецептору, достаточными для активации инсулинового рецептора с тем, чтобы вызывать требуемый гликемический ответ, т. е. они способны вызывать снижение уровня глюкозы в крови у животных и людей. В качестве показателя функциональной (агонистической) активности инсулинов по настоящему изобретению продемонстрирована липогенная активность в адипоцитах крысы.

Было обнаружено, что аналоги инсулина по настоящему изобретению характеризуются сбалансированным соотношением аффинности инсулинового рецептора (IR) и рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) (IR/IGF-1R).

5 В одном аспекте инсулин по настоящему изобретению характеризуется соотношением IR/IGF-1R, превышающим 1; превышающим 1,5; или превышающим 2.

В одном варианте осуществления аналог человеческого инсулина по настоящему изобретению характеризуется способностью к снижению уровня глюкозы в крови.

10 В одном варианте осуществления аналог человеческого инсулина по настоящему изобретению приводит к активации инсулинового рецептора.

В одном варианте осуществления аналог человеческого инсулина по настоящему изобретению вызывает снижение уровня глюкозы в крови.

В одном варианте осуществления аналог человеческого инсулина по настоящему изобретению характеризуется сниженными свойствами самоассоциации.

15 В одном варианте осуществления аналог человеческого инсулина по настоящему изобретению является мономерным.

В одном аспекте настоящего изобретения представлены новые аналоги инсулина для применения в качестве лекарственных препаратов или для применения в изготовлении лекарственных препаратов или фармацевтических композиций. Аналог 20 инсулина по настоящему изобретению может быть, в частности, применен в качестве лекарственных препаратов для лечения метаболических нарушений, в том числе диабета, в частности диабета 1 типа и диабета 2 типа.

Фармацевтические композиции

25 Настоящее изобретение относится к аналогам инсулина, применимым в качестве лекарственных препаратов, или применимым для изготовления фармацевтической композиции/лекарственного препарата.

Следовательно, в другом аспекте настоящего изобретения представлены новые фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество аналога инсулина по настоящему изобретению.

5 Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением необязательно содержит один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать другие вспомогательные вещества, обычно применяемые в фармацевтических композициях, например, консерванты, хелатообразующие средства, 10 средства, регулирующие тоничность, усилители всасывания.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой водный препарат, т. е. препарат, содержащий воду. Такой препарат обычно представляет собой раствор. В другом варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая 15 композиция представляет собой водный раствор.

Термином «водный препарат» определяют препарат, содержащий по меньшей мере 50% вес/вес воды. Подобным образом, термином «водный раствор» определяют раствор, содержащий по меньшей мере 50% вес/вес воды.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения препарат инсулина 20 содержит водный раствор аналога инсулина по настоящему изобретению, где указанный аналог инсулина присутствует в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 20,0 мМ; более конкретно, от приблизительно 0,2 мМ до приблизительно 6,0 мМ; от приблизительно 0,3 мМ до приблизительно 4,0 мМ; от приблизительно 0,6 мМ до приблизительно 3,6 мМ. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации от 25 приблизительно 0,6 мМ до приблизительно 3,0 мМ. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей приблизительно 0,6 мМ. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей 30 приблизительно 1,2 мМ. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей приблизительно

1,8 мМ. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей приблизительно 2,4 мМ. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей приблизительно 3 мМ. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей приблизительно 3,6 мМ.

В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации от приблизительно 100 ЕД до приблизительно 600 ЕД. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей приблизительно 100 ЕД. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей приблизительно 200 ЕД. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей приблизительно 300 ЕД. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей приблизительно 400 ЕД. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей приблизительно 500 ЕД. В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению представлен в концентрации, составляющей приблизительно 600 ЕД.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать буферную систему. В одном варианте осуществления концентрация буфера находится в диапазоне от приблизительно 0,1 мМ до 20 мМ. В еще одном варианте осуществления концентрация указанного буфера находится в диапазоне от 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ или от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 8 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 8 мМ, или от приблизительно 2 мМ до приблизительно 8 мМ, или от 3 мМ до 7 мМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения буфер представляет собой фосфатный буфер. В одном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация фосфатного буфера составляет 3 мМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения буфер представляет собой трис. В одном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация трис-буфера составляет 7 мМ.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может не содержать буфер.

Показатель рН фармацевтической композиции для инъекций по настоящему изобретению находится в диапазоне от 3 до 8,5. Предпочтительно, чтобы фармацевтическая композиция для инъекций в соответствии с настоящим изобретением характеризовалась показателем рН в диапазоне от приблизительно 7,0 до приблизительно 8,0. В одном варианте осуществления настоящего изобретения показатель рН находится в диапазоне от приблизительно 7,2 до приблизительно 7,8 или от 7,4 до 7,6. В одном варианте осуществления настоящего изобретения показатель рН составляет 7,0. В одном варианте осуществления настоящего изобретения показатель рН составляет 7,2. В одном варианте осуществления настоящего изобретения показатель рН составляет 7,4. В одном варианте осуществления настоящего изобретения показатель рН составляет 7,6. В одном варианте осуществления настоящего изобретения показатель рН составляет 7,8. В одном варианте осуществления настоящего изобретения показатель рН составляет 8,0.

Препараты инсулина по настоящему изобретению могут дополнительно содержать средство, регулирующее тоничность.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения средство, регулирующее тоничность, представляет собой глицерин, и/или пропиленгликоль, и/или хлорид натрия, и может присутствовать в концентрации от 0 до приблизительно 250 мМ, от 0 до приблизительно 200 мМ или от 0 до приблизительно 100 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей приблизительно 230 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей 233 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей 230 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей приблизительно 200 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей 200 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей приблизительно 195 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее

тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей 195 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей приблизительно 185 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей 185 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей приблизительно 165 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей 163 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей 130 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей приблизительно 100 мМ. В одном варианте осуществления средство, регулирующее тоничность, может присутствовать в концентрации, составляющей 103 мМ.

Препараты инсулина по настоящему изобретению могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый консервант. Консервант может присутствовать в количестве, достаточном для достижения консервирующего эффекта. Количество консерванта в фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть определено, например, из литературных источников в данной области и/или известного(известных) количества(количеств) консерванта, например, в коммерческих продуктах. Каждый из этих конкретных консервантов или их смесей представляет собой альтернативный вариант осуществления настоящего изобретения. Применение консерванта в фармацевтических препаратах описано, например, в справочнике Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция для инъекций содержит по меньшей мере одно фенольное соединение в качестве консерванта. В одном варианте осуществления фенольное соединение для применения в соответствии с настоящим изобретением может присутствовать в концентрации не более приблизительно 6 мг/мл конечной фармацевтической композиции для инъекций, в частности, не более приблизительно 4 мг/мл конечной фармацевтической композиции для инъекций. В одном варианте осуществления фенольное соединение для применения в соответствии с настоящим изобретением может присутствовать в количестве не более приблизительно 4,0 мг/мл конечной

фармацевтической композиции для инъекций; в частности, от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 4,0 мг/мл или от приблизительно 0,6 мг/мл до приблизительно 4,0 мг/мл. В одном варианте осуществления настоящего изобретения консервант представляет собой фенол. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция для инъекций содержит смесь фенола и м-крезола в качестве консерванта. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция для инъекций содержит приблизительно 16 мМ фенола (1,5 мг/мл) и приблизительно 16 мМ м-крезола (1,72 мг/мл). В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция для инъекций содержит приблизительно 19 мМ фенола (1,79 мг/мл) и приблизительно 19 мМ м-крезола (2,05 мг/мл).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать хелатообразующее средство. В одном аспекте фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может не содержать хелатообразующее средство. Применение хелатообразующего средства в фармацевтических препаратах хорошо известно специалисту в данной области техники. Для удобства ссылаются на справочник Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать усилитель всасывания. Группа усилителей всасывания может включать без ограничения никотиновые соединения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит никотиновое соединение. В одном варианте осуществления никотиновое соединение представляет собой никотинамид и/или никотиновую кислоту и/или ее соль. В другом варианте осуществления никотиновое соединение представляет собой никотинамид. В другом варианте осуществления настоящего изобретения никотиновое соединение присутствует в количестве от приблизительно 0 мМ до приблизительно 200 мМ; в частности, в количестве от приблизительно 10 мМ до приблизительно 200 мМ, например, приблизительно 10 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 170 мМ.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не содержит никотиновое соединение.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит цитрат в концентрации от 1 мМ до 50 мМ. Следует понимать, что термин цитрат включает цитратную соль, а также лимонную кислоту. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит цитрат в концентрации от 5 мМ до 20 мМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения цитрат присутствует в концентрации, составляющей 5 мМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения цитрат присутствует в концентрации, составляющей 10 мМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения цитрат присутствует в концентрации, составляющей 15 мМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения цитрат присутствует в концентрации, составляющей 20 мМ.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит никотинамид и цитрат. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит комбинацию никотинамида и цитрата, где никотинамид присутствует в количестве от приблизительно 5 мМ до приблизительно 200 мМ, в частности, в количестве от приблизительно 20 мМ до приблизительно 200 мМ, например, приблизительно 10 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 170 мМ, и цитрат присутствует в диапазоне концентраций от 5 мМ до 20 мМ, в частности, в концентрации, составляющей приблизительно 5 мМ, приблизительно 10 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно 20 мМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 5 мМ никотинамида и 5 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 10 мМ никотинамида и 5 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 20 мМ никотинамида и 5 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 40 мМ никотинамида и 5 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 60 мМ никотинамида и 5 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция

содержит 80 мМ никотинамида и 5 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 100 мМ никотинамида и 5 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 120 мМ никотинамида и 5 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 140 мМ никотинамида и 5 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 160 мМ никотинамида и 5 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 170 мМ никотинамида и 5 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 5 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 10 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 20 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 40 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 60 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 80 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 100 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 120 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 140 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 160 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит 170 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 0,6 до приблизительно 3,6 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30 или А9Е, В3Е, В27Е, В28Е, desВ30 и дополнительно содержит от приблизительно 0,6 мг/мл до приблизительно 4 мг/мл фенола, от приблизительно 0,6 мг/мл до приблизительно 4 мг/мл м-крезола, от приблизительно 0 до приблизительно

250 мМ глицерина, от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 20 мМ трис или фосфата, приблизительно 0 мМ никотинамида, и характеризуется значением рН от приблизительно 7,0 до приблизительно 8,0.

5 В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 0,6 до приблизительно 3,6 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30 или А9Е, В3Е, В27Е, В28Е, desВ30 и дополнительно содержит от приблизительно 0,6 мг/мл до приблизительно 4 мг/мл фенола, от приблизительно 0,6 мг/мл до приблизительно 4 мг/мл м-крезола, от приблизительно 0 до приблизительно 250 мМ глицерина, от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 20 мМ трис или 10 фосфата, приблизительно 40 мМ никотинамида, и характеризуется значением рН от приблизительно 7,0 до приблизительно 8,0.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 0,6 до приблизительно 3,6 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30 или А9Е, В3Е, В27Е, В28Е, desВ30 и дополнительно содержит от 15 приблизительно 0,6 мг/мл до приблизительно 4 мг/мл фенола, от приблизительно 0,6 мг/мл до приблизительно 4 мг/мл м-крезола, от приблизительно 20 до приблизительно 250 мМ глицерина, от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 20 мМ трис или фосфата, приблизительно 20 мМ никотинамида, приблизительно 10 мМ цитрата, и характеризуется значением рН от приблизительно 7,0 до приблизительно 8,0.

20 Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать аминокислотное основание в количестве, достаточном для снижения образования агрегатов полипептидом или белком во время хранения композиции. Термин «аминокислотное основание» относится к аминокислоте или комбинации аминокислот, где каждая отдельно взятая аминокислота присутствует либо 25 в форме своего свободного основания, либо в форме соли.

Настоящее изобретение также относится к способу получения таких препаратов инсулина.

Препараты инсулина по настоящему изобретению могут быть получены с применением любого из ряда общепризнанных способов. Например, препараты могут 30 быть получены путем смешивания водного раствора вспомогательных веществ с

водным раствором аналога инсулина, после чего рН доводят до требуемого уровня и смесь доводят до конечного объема водой с последующей стерильной фильтрацией.

В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является мономерным в фармацевтической композиции.

5 В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению характеризуется сниженными свойствами самоассоциации в фармацевтической композиции.

В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является химически стабильным в фармацевтической композиции.

10 В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является физически стабильным в фармацевтической композиции.

В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является химически и физически стабильным в фармацевтической композиции.

15 В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является мономерным и физически стабильным в фармацевтической композиции.

В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является мономерным и химически стабильным в фармацевтической композиции.

20 В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является мономерным и химически и физически стабильным в фармацевтической композиции.

В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является мономерным и химически и физически стабильным в фармацевтической композиции даже при высокой концентрации.

25 В одном варианте осуществления скорость всасывания аналогов инсулина по настоящему изобретению выше по сравнению с Fiasp®.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения это отличие позволит дополнительно улучшить алгоритм введения дозы инсулина для системы с замкнутым

контуром с тем, чтобы увеличить время в диапазоне (т. е. время, в течение которого уровень глюкозы в крови пациента находится в нормальном диапазоне).

Фармацевтические композиции, не содержащие цинк

5 Препараты инсулина традиционно содержат цинк, добавленный, например, в виде соли хлорида или ацетата для получения приемлемой стабильности фармацевтического препарата. Однако неожиданным образом было обнаружено, что аналоги инсулина по настоящему изобретению, сохраняя сниженную самоассоциацию, достаточную химическую и физическую стабильность, могут быть составлены в фармацевтические композиции с высокой концентрацией инсулина, но без добавления цинка, за счет чего обеспечивается более быстрое начало действия, чем у сопоставимых аналогов инсулина, которым необходимы ионы Zn^{2+} для поддержания достаточной химической и физической стабильности. Композиции, не содержащие цинк, быстрее всасываются из подкожной жировой клетчатки, что позволяет их прандиальное применение.

15 Однако при условии, что могут быть предусмотрены вспомогательные вещества, не содержащие цинк, аналоги инсулина по настоящему изобретению фактически позволяют получать фармацевтические композиции, не содержащие цинк. Таким образом, в одном аспекте в настоящем изобретении представлены «фармацевтические композиции, не содержащие цинк», содержащие аналог инсулина по настоящему изобретению и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, не содержащих цинк вообще или не содержащих добавленных ионов цинка.

25 Аналог инсулина по настоящему изобретению приводит к повышению как химической, так и физической стабильности фармацевтических композиций, составленных без добавления ионов цинка и без добавления поверхностно-активных веществ.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не содержит цинк.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая аналог инсулина по настоящему изобретению, не содержит цинк.

В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является мономерным в фармацевтической композиции, не содержащей цинк.

5 В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является химически стабильным в фармацевтической композиции, не содержащей цинк.

В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является физически стабильным в фармацевтической композиции, не содержащей цинк.

10 В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является химически и физически стабильным в фармацевтической композиции, не содержащей цинк.

В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является мономерным и химически и физически стабильным в фармацевтической композиции, не содержащей цинк.

15 В одном варианте осуществления аналог инсулина по настоящему изобретению является мономерным и химически и физически стабильным даже при высокой концентрации в фармацевтической композиции, не содержащей цинк.

Способы введения

20 Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить посредством стандартных способов.

Парентеральное введение можно осуществлять путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или внутривенной инъекции посредством шприца, необязательно шприца в виде ручки. В качестве альтернативы парентеральное введение можно осуществлять посредством инфузионной помпы. В качестве
25 дополнительной возможности препараты инсулина, содержащие соединение инсулина по настоящему изобретению, также могут быть адаптированы для трансдермального введения, например, путем безыгольной инъекции или из пластыря с микроиглами, необязательно из пластыря для ионофореза или посредством чрезслизистого, например буккального введения.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить пациенту, нуждающемуся в таком лечении, в несколько мест, например, в места для местного введения, например, на кожу и слизистые оболочки, в места, в которых не происходит всасывание, например, введение в артерию, в вену, в сердце, и в места, которые предусматривают всасывание, например, введение в кожу, под кожу, в мышцу или в брюшную полость.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может применяться для лечения диабета путем парентерального введения. Фактическая доза зависит от природы и тяжести заболевания, подлежащего лечению, и находится в рамках компетенции врача, при этом она может варьироваться путем титрования дозы в отношении конкретных обстоятельств по настоящему изобретению для получения необходимого терапевтического эффекта. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут быть получены для применения в различных медицинских устройствах, обычно используемых для введения инсулина, в том числе устройствах в виде ручек, используемых для инсулинотерапии путем инъекции, непрерывной подкожной инфузии инсулина с использованием помп.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению составляют в устройстве в виде ручки для применения в инсулинотерапии путем инъекции.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию составляют во внешней помпе для введения инсулина.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению составляют в инсулиновой помпе для введения инсулина.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению является подходящей для инсулиновой помпы для введения инсулина.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению является подходящей для инсулиновой помпы, которая может содержать аналоги инсулина, эквивалентные 100–600 ЕД человеческого инсулина.

Способы терапии

Настоящее изобретение относится к лекарственным средствам для терапевтического применения. Более конкретно, настоящее изобретение относится к применению аналогов инсулина по настоящему изобретению для лечения или предупреждения патологических состояний, связанных с диабетом.

5 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения или облегчения заболевания, или нарушения, или патологического состояния
живого организма, относящегося к животным, в том числе человека, при этом
заболевание, нарушение или патологическое состояние может быть выбрано из
заболевания, нарушения или патологического состояния, относящегося к диабету,
10 диабету 1 типа, диабету 2 типа, нарушению толерантности к глюкозе, гипергликемии,
дислипидемии, ожирению, метаболическому синдрому (метаболическому синдрому X,
синдрому инсулинорезистентности), гипертензии, когнитивным расстройствам, при
этом способ предусматривает стадию введения нуждающемуся в этом субъекту
терапевтически эффективного количества аналога человеческого инсулина по
15 настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ
лечения или облегчения заболевания, или нарушения, или патологического состояния
живого организма, относящегося к животным, в том числе человека, при этом
заболевание, нарушение или патологическое состояние может быть выбрано из
20 заболевания, нарушения или патологического состояния, относящегося к диабету,
диабету 1 типа, диабету 2 типа, нарушению толерантности к глюкозе, гипергликемии,
дислипидемии, ожирению или метаболическому синдрому (метаболическому синдрому
X, синдрому инсулинорезистентности).

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ
25 лечения или облегчения заболевания, или нарушения, или патологического состояния
живого организма, относящегося к животным, в том числе человека, при этом
заболевание, нарушение или патологическое состояние может быть выбрано из
заболевания, нарушения или патологического состояния, относящегося к диабету, в
частности диабету 1 типа или диабету 2 типа.

30 В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к
медицинскому применению аналога инсулина по настоящему изобретению и, в

частности, к применению таких аналогов инсулина для лечения, предупреждения или облегчения заболеваний, нарушений или патологических состояний, связанных с диабетом, диабетом 1 типа, диабетом 2 типа, нарушением толерантности к глюкозе, гипергликемией, дислипидемией, ожирением, метаболическим синдромом (метаболическим синдромом X, синдромом инсулинорезистентности), артериальной гипертензией, когнитивными расстройствами, при этом способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества аналога инсулина по настоящему изобретению.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению таких аналогов инсулина для лечения, предупреждения или облегчения заболеваний, нарушений или патологических состояний, связанных с диабетом, диабетом 1 типа, диабетом 2 типа или нарушением толерантности к глюкозе, при этом способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества аналогов инсулина по настоящему изобретению.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению таких аналогов инсулина для лечения, предупреждения или облегчения заболеваний, нарушений или патологических состояний, связанных с диабетом, и, в частности, с диабетом 1 типа или диабетом 2 типа.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ:

Настоящее изобретение дополнительно описано следующими неограничивающими вариантами осуществления:

1. Аналог инсулина, где аналог содержит A9E или A9D и дополнительно содержит B3E и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином.

2. Аналог инсулина по варианту осуществления 1, где аналог содержит A9E или A9D и дополнительно содержит B3E по сравнению с человеческим инсулином.

3. Аналог инсулина по варианту осуществления 1, где аналог содержит A9E или A9D и дополнительно содержит desB30 по сравнению с человеческим инсулином.

4. Аналог инсулина по варианту осуществления 1, где аналог содержит A9E или A9D и дополнительно содержит B3E и desB30 по сравнению с человеческим инсулином.

5 5. Аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 2–4, где аналог дополнительно содержит по меньшей мере одно из B26E, B27E и/или B28E.

6. Аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 2–4, где аналог дополнительно содержит B26E.

7. Аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 2–4, где аналог дополнительно содержит B27E.

10 8. Аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 2–4, где аналог дополнительно содержит B28E.

9. Аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 2–4, где аналог дополнительно содержит B26E и B27E.

15 10. Аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 2–4, где аналог дополнительно содержит B26E и B28E.

11. Аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 2–4, где аналог дополнительно содержит B27E и B28E.

12. Аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 2–4, где аналог дополнительно содержит B26E, B27E и B28E.

20 13. Аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 5–12, где аналог дополнительно содержит замену A21A.

14. Аналог инсулина по любому из предыдущих вариантов осуществления, где аналог представляет собой

A9D, B3E;

25 A9E, B3E;

A9D, desB30;

A9E, desB30;

A9D, B3E, desB30;

A9E, B3E, desB30;

A9D, B3E, B26E;

5 A9E, B3E, B26E;

A9D, B26E, desB30;

A9E, B26E, desB30;

A9D, B3E, B26E, desB30;

A9E, B3E, B26E, desB30;

10 A9D, A21A, B3E, B26E;

A9E, A21A, B3E, B26E;

A9D, A21A, B26E, desB30;

A9E, A21A, B26E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, desB30;

15 A9E, A21A, B3E, B26E, desB30;

A9D, B3E, B27E;

A9E, B3E, B27E;

A9D, B27E, desB30;

A9E, B27E, desB30;

20 A9D, B3E, B27E, desB30;

A9E, B3E, B27E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B27E;

A9E, A21A, B3E, B27E;

A9D, A21A, B27E, desB30;

A9E, A21A, B27E, desB30;

5 A9D, A21A, B3E, B27E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B27E, desB30;

A9D, B3E, B28E;

A9E, B3E, B28E;

A9D, B28E, desB30;

10 A9E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B28E;

15 A9D, A21A, B28E, desB30;

A9E, A21A, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E;

20 A9E, B3E, B26E, B27E;

A9D, B26E, B27E, desB30;

A9E, B26E, B27E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E;

5 A9E, A21A, B3E, B26E, B27E;

A9D, A21A, B26E, B27E, desB30;

A9E, A21A, B26E, B27E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;

10 A9D, B3E, B27E, B28E;

A9E, B3E, B27E, B28E;

A9D, B27E, B28E, desB30;

A9E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B27E, B28E, desB30;

15 A9E, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B27E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B27E, B28E;

A9D, A21A, B27E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B27E, B28E, desB30;

20 A9D, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B28E;

A9E, B3E, B26E, B28E;

A9D, B26E, B28E, desB30;

A9E, B26E, B28E, desB30;

5 A9D, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B28E;

A9D, A21A, B26E, B28E, desB30;

10 A9E, A21A, B26E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9E, B3E, B26E, B27E, B28E;

15 A9D, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;

20 A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9D, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30 или

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30.

5 15. Аналог инсулина по варианту осуществления 14, где аналог представляет собой

A9D, B3E, B26E;

A9E, B3E, B26E;

A9D, B26E, desB30;

A9E, B26E, desB30;

10 A9D, B3E, B26E, desB30;

A9E, B3E, B26E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E;

A9E, A21A, B3E, B26E;

A9D, A21A, B26E, desB30;

15 A9E, A21A, B26E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, desB30;

A9D, B3E, B27E;

A9E, B3E, B27E;

20 A9D, B27E, desB30;

A9E, B27E, desB30;

A9D, B3E, B27E, desB30;

A9E, B3E, B27E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B27E;

A9E, A21A, B3E, B27E;

A9D, A21A, B27E, desB30;

5 A9E, A21A, B27E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B27E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B27E, desB30;

A9D, B3E, B28E;

A9E, B3E, B28E;

10 A9D, B28E, desB30;

A9E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B28E;

15 A9E, A21A, B3E, B28E;

A9D, A21A, B28E, desB30;

A9E, A21A, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B28E, desB30;

20 A9D, B3E, B26E, B27E;

A9E, B3E, B26E, B27E;

A9D, B26E, B27E, desB30;

A9E, B26E, B27E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B27E, desB30;

5 A9D, A21A, B3E, B26E, B27E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E;

A9D, A21A, B26E, B27E, desB30;

A9E, A21A, B26E, B27E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;

10 A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9D, B3E, B27E, B28E;

A9E, B3E, B27E, B28E;

A9D, B27E, B28E, desB30;

A9E, B27E, B28E, desB30;

15 A9D, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B27E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B27E, B28E;

A9D, A21A, B27E, B28E, desB30;

20 A9E, A21A, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B28E;

A9E, B3E, B26E, B28E;

A9D, B26E, B28E, desB30;

5 A9E, B26E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B28E;

10 A9D, A21A, B26E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B26E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, B28E;

15 A9E, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9D, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;

20 A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9D, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30 или

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30.

- 5 16. Аналог инсулина по варианту осуществления 15, где аналог представляет собой

A9D, B3E, B26E;

A9E, B3E, B26E;

A9D, B26E, desB30;

- 10 A9E, B26E, desB30;

A9D, B3E, B26E, desB30;

A9E, B3E, B26E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E;

A9E, A21A, B3E, B26E;

- 15 A9D, A21A, B26E, desB30;

A9E, A21A, B26E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B28E, desB30;

- 20 A9E, A21A, B3E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E;

A9E, B3E, B26E, B27E;

A9D, B26E, B27E, desB30;

A9E, B26E, B27E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B27E, desB30;

5 A9D, A21A, B3E, B26E, B27E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E;

A9D, A21A, B26E, B27E, desB30;

A9E, A21A, B26E, B27E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;

10 A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9D, B3E, B27E, B28E;

A9E, B3E, B27E, B28E;

A9D, B27E, B28E, desB30;

A9E, B27E, B28E, desB30;

15 A9D, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B27E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B27E, B28E;

A9D, A21A, B27E, B28E, desB30;

20 A9E, A21A, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B28E;

A9E, B3E, B26E, B28E;

A9D, B26E, B28E, desB30;

5 A9E, B26E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B28E;

10 A9D, A21A, B26E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B26E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, B28E;

15 A9E, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9D, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;

20 A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9D, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30 или

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30.

- 5 17. Аналог инсулина по варианту осуществления 16, где аналог представляет собой

A9D, B3E, B26E;

A9E, B3E, B26E;

A9D, B3E, B26E, desB30;

- 10 A9E, B3E, B26E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E;

A9E, A21A, B3E, B26E;

A9D, A21A, B3E, B26E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, desB30;

- 15 A9D, A21A, B3E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E;

A9E, B3E, B26E, B27E;

A9D, B3E, B26E, B27E, desB30;

- 20 A9E, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9D, B3E, B27E, B28E;

A9E, B3E, B27E, B28E;

5 A9D, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B27E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B27E, B28E;

A9D, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;

10 A9E, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B28E;

A9E, B3E, B26E, B28E;

A9D, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B28E, desB30;

15 A9D, A21A, B3E, B26E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B28E;

A9D, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, B28E;

20 A9E, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9D, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30 или

5 A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30.

18. Аналог инсулина по варианту осуществления 17, где аналог представляет собой

A9E, B3E, B26E;

A9E, B3E, B27E, B28E;

10 A9E, B3E, B26E, desB30;

A9E, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, desB30 или

A9E, A21A, B3E, B26E, desB30.

15 19. Аналог инсулина по варианту осуществления 18, где аналог представляет собой A9E, B3E, B26E.

20. Аналог инсулина по варианту осуществления 18, где аналог представляет собой A9E, B3E, B27E, B28E.

21. Аналог инсулина по варианту осуществления 18, где аналог представляет собой A9E, B3E, B26E, desB30.

20 22. Аналог инсулина по варианту осуществления 18, где аналог представляет собой A9E, B3E, B27E, B28E, desB30.

23. Аналог инсулина по варианту осуществления 18, где аналог представляет собой A9D, B3E, B26E, desB30.

24. Аналог инсулина по варианту осуществления 18, где аналог представляет собой A9E, A21A, B3E, B26E, desB30.

5 25. Фармацевтическая композиция, содержащая аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 1–24 и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

26. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 25, содержащая аналог инсулина, который представляет собой A9E, B3E, B26E, desB30.

27. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 25, содержащая аналог инсулина, который представляет собой A9E, B3E, B27E, B28E, desB30.

10 28. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 25, содержащая аналог инсулина, который представляет собой A9D, B3E, B26E, desB30.

29. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 25, содержащая аналог инсулина, который представляет собой A9E, A21A, B3E, B26E, desB30.

15 30. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–29, где аналог инсулина представлен в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 20,0 мМ.

31. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–30, где аналог инсулина представлен в концентрации от приблизительно 0,6 мМ до приблизительно 3,6 мМ.

20 32. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 31, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 0,6 мМ.

33. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 31, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 1,2 мМ.

25 34. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 31, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 1,8 мМ.

35. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 31, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 2,4 мМ.

36. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 31, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 3,0 мМ.

5 37. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–29, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 100–600 ЕД.

38. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 37, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 100 ЕД.

39. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 37, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 200 ЕД.

10 40. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 37, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 300 ЕД.

41. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 37, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 400 ЕД.

15 42. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 37, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 500 ЕД.

43. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 37, где аналог инсулина представлен в концентрации, составляющей приблизительно 600 ЕД.

44. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–43, где композиция не содержит цинк.

20 45. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–44, содержащая никотиновое соединение и, в частности, никотинамид.

46. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–45, содержащая никотинамид в концентрации от приблизительно 0 мМ до приблизительно 200 мМ.

25 47. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 46, содержащая 10 мМ никотинамида.

48. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 46, содержащая 20 мМ никотинамида.
49. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 46, содержащая 40 мМ никотинамида.
- 5 50. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 46, содержащая 170 мМ никотинамида.
51. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–50, содержащая от приблизительно 0,6 мг/мл до приблизительно 4 мг/мл фенола и/или м-крезола.
- 10 52. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 51, содержащая приблизительно 1,5 мг/мл фенола и приблизительно 1,72 мг/мл м-крезола.
53. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 51, содержащая приблизительно 1,79 мг/мл фенола и приблизительно 2,05 мг/мл м-крезола.
- 15 54. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–53, содержащая глицерин в концентрации от приблизительно 0 мМ до приблизительно 250 мМ.
55. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 54, содержащая приблизительно 103 мМ, 130 мМ, 163 мМ, 185 мМ, 195 мМ, 200 мМ, 230 мМ или 233 мМ глицерина.
- 20 56. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–55, содержащая пропиленгликоль в концентрации, составляющей приблизительно 0–2%.
57. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 56, содержащая пропиленгликоль в концентрации, составляющей приблизительно 1,5%.
- 25 58. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–57, содержащая буфер в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до 20 мМ.

59. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 58, содержащая фосфатный буфер в концентрации, составляющей приблизительно 3 мМ.

60. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 58, содержащая трис-буфер в концентрации, составляющей приблизительно 7 мМ.

5 61. Фармацевтическая композиция по вариантам осуществления 25–60, которая характеризуется значением рН в диапазоне от приблизительно 7,0 до приблизительно 8,0.

10 62. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 61, которая характеризуется значением рН в диапазоне от приблизительно 7,2 до приблизительно 7,8.

63. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 62, которая характеризуется значением рН в диапазоне от приблизительно 7,4 до приблизительно 7,6.

15 64. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–63, содержащая цитрат.

65. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 64, содержащая цитрат в концентрации от 1 мМ до 50 мМ.

66. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 65, содержащая цитрат в концентрации, составляющей 5 мМ.

20 67. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 65, содержащая цитрат в концентрации, составляющей 10 мМ.

68. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 65, содержащая цитрат в концентрации, составляющей 15 мМ.

25 69. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 65, содержащая цитрат в концентрации, составляющей 20 мМ.

70. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 10 мМ никотинамида и 10 мМ цитрата.

71. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 20 мМ никотиамида и 10 мМ цитрата.

72. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 40 мМ никотиамида и 10 мМ цитрата.

5 73. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 0,6 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

233 мМ глицерина;

10 3 мМ фосфата;

0 мМ никотиамида и

характеризующаяся значением рН 7,4.

74. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 1,2 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

15 1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

233 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

0 мМ никотиамида и

20 характеризующаяся значением рН 7,4.

75. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 1,8 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

233 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

0 мМ никотинамида и

5 характеризующаяся значением рН 7,4.

76. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 2,4 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

10 233 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

0 мМ никотинамида и

характеризующаяся значением рН 7,4.

15 77. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 3,0 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

233 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

20 0 мМ никотинамида и

характеризующаяся значением рН 7,4.

78. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 0,6 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

200 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

5 40 мМ никотинамида и

характеризующаяся значением рН 7,4.

79. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 1,2 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

10 1,72 мг/мл м-крезола;

200 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

40 мМ никотинамида и

характеризующаяся значением рН 7,4.

15 80. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 1,8 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

200 мМ глицерина;

20 3 мМ фосфата;

40 мМ никотинамида и

характеризующаяся значением рН 7,4.

81. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 2,4 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

5 200 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

40 мМ никотинамида и

характеризующаяся значением рН 7,4.

82. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 3,0 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

200 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

15 40 мМ никотинамида и

характеризующаяся значением рН 7,4.

83. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 0,6 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

20 1,72 мг/мл м-крезола;

185 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

20 мМ никотинамида;

10 мМ цитрата и

характеризующаяся значением рН 7,4.

84. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 1,2 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

5 1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

185 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

20 мМ никотинамида;

10 10 мМ цитрата и

характеризующаяся значением рН 7,4.

85. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 1,8 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

15 1,72 мг/мл м-крезола;

185 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

20 мМ никотинамида;

10 мМ цитрата и

20 характеризующаяся значением рН 7,4.

86. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 2,4 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

185 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

20 мМ никотинамида;

5 10 мМ цитрата и

характеризующаяся значением рН 7,4.

87. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 3,0 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В26Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

10 1,72 мг/мл м-крезола;

185 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

20 мМ никотинамида;

10 мМ цитрата и

15 характеризующаяся значением рН 7,4.

88. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 0,6 мМ, 1,2 мМ, 1,8 мМ, 2,4 мМ или 3,0 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В27Е, В28Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

20 1,72 мг/мл м-крезола;

233 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

0 мМ никотинамида и

характеризующаяся значением pH 7,4.

89. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 0,6 мМ, 1,2 мМ, 1,8 мМ, 2,4 мМ или 3,0 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В27Е, В28Е, desВ30;

5 1,5 мг/мл фенола;

1,72 мг/мл м-крезола;

200 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

40 мМ никотинамида и

10 характеризующаяся значением pH 7,4.

90. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая 0,6 мМ, 1,2 мМ, 1,8 мМ, 2,4 мМ или 3,0 мМ аналога инсулина А9Е, В3Е, В27Е, В28Е, desВ30;

1,5 мг/мл фенола;

15 1,72 мг/мл м-крезола;

185 мМ глицерина;

3 мМ фосфата;

20 мМ никотинамида;

10 мМ цитрата и

20 характеризующаяся значением pH 7,4.

91. Аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 1–24 или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–90 для применения в качестве лекарственного препарата.

92. Аналог инсулина по любому из вариантов осуществления 1–24 или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 25–90 для применения в предупреждении, или облегчении, или лечении заболевания, или нарушения, или патологического состояния организма человека, где заболевание, нарушение или патологическое состояние относится к диабету, в частности к диабету 1 типа или диабету 2 типа.

93. Способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания, или нарушения, или патологического состояния организма человека, где заболевание, нарушение или патологическое состояние относится к диабету, в частности к диабету 1 типа или диабету 2 типа, при этом способ предусматривает стадию введения такому живому организму, относящемуся к животным, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества аналога инсулина по любому из вариантов осуществления 1–24 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 25–90.

15 **Примеры**

Материалы и способы

Перечень сокращений

ACN - ацетонитрил

ALP – протеаза из *Achromobacter lyticus*

20 AUC – площадь под кривой

C-пептид – связывающий пептид

DCM – дихлорметан

DIC – диизопропилкарбодимид;

DIPEA = DIEA – N,N-диизопропилэтиламин

25 DMF – N,N-диметилформаид

DMSO – диметилсульфоксид

Fmoc – флуоренилметоксикарбонил

Glu (gGlu) – гамма-L-глутамил

HFIP – гексафтор-2-пропанол

HPLC – высокоэффективная жидкостная хроматография

5 IR – инсулиновый рецептор

IGF-1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1

LC – жидкостная хроматография

MALDI-TOF – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

MS – масс-спектрометрия

10 NMP – N-метилпирролидон

PAL – пептидный амидный линкер

ПЦР – полимеразная цепная реакция

PD – фармакодинамика (эффект снижения уровня глюкозы в крови/плазме крови)

15 PK – фармакодинамика (профили концентраций инсулина в крови/плазме крови в зависимости от времени)

К. Т. – комнатная температура

tBu – трет-бутил

TFA – трифторуксусная кислота и

20 ТРИС – трис(гидроксиметил)аминометан.

Общие способы получения

Общая процедура (А)

Твердофазный синтез и очистка аналогов по настоящему изобретению

Общая процедура твердофазного синтеза и очистки аналогов инсулина по настоящему изобретению подробно описана ниже и была применена для синтеза дополнительных соединений, как указано ниже.

- 5 А- и В-цепи инсулина получали на синтезаторе пептидов Prelude с применением общего способа твердофазного связывания пептидов на основе Fmoc.

Использованные смолы:

Fmoc-Thr(OtBu)-Wang и Fmoc-Asp-OtBu в сочетании со смолой PAL.

- 10 Аминокислоты (перечислены ниже) и оксим растворяли в DMF до концентрации, составляющей 0,3 М:

- 15 Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Glu(OtBu)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH и Fmoc-Val-OH.

 Особые/неприродные аминокислоты: Boc-Phe-OH; Boc-Gly-OH и Fmoc-Cys(Asm)-OH.

Процедура

Загрузка: 0,25 ммоль.

- 20 Стандартные условия связывания, используемые для смол, были следующими: 8 экв. аминокислоты, DIC, коллидин и оксима (этил(гидроксиимино)цианоацетат) в NMP в течение 1 часа, в случае Fmoc-Arg(Pbf)-OH использовали протокол двойного связывания (2 × 1 ч).

- 25 Используемые стандартные условия снятия защиты: 20% пиперидин в NMP (2 × 5,5 мл в течение 2 × 7,5 мин или 2 × 10 мин) с последующей промывкой NMP и DCM.

Образование дисульфидов A6C-A11C

Смолу обрабатывали в течение 15 мин 0,5% раствором йода в DCM/HFIP (30 мл смеси 1:1). После удаления растворителя фильтрованием смолу промывали DCM (3 × 20 мл) и сушили над потоком азота.

Отщепление А-цепи от смолы и активация A20-Cys в виде S-S-пиридила

- 5 Смолу обрабатывали раствором TFA (30 мл), триизопропилсиланом (1 мл), водой (0,75 мл) и дитиодипиридином (0,75 г) в течение 3 ч, а затем собирали фильтрат и добавляли к 150 мл эфира (разделенного в 6 пластиковых пробирок NUNC) для осаждения пептида. Пробирки центрифугировали при 3500 об./мин в течение 3 мин, эфирный слой декантировали и эту эфирную стадию повторяли еще 3 раза.
- 10 Неочищенный материал объединяли и сушили в течение ночи при к. т. с получением требуемого пептида А-цепи.

Отщепление В-цепи от смолы

- Смолу обрабатывали раствором TFA (30 мл), триизопропилсиланом (1 мл), водой (0,75 мл) и дитиотреитолом (0,5 г) в течение 3 ч, а затем собирали фильтрат и добавляли к эфиру (150 мл, разделенному в 6 пластмассовых пробирок NUNC) для осаждения пептида. Пробирки центрифугировали при 3500 об./мин в течение 3 мин, эфирный слой декантировали и эту эфирную стадию повторяли еще 3 раза. Неочищенный материал объединяли и сушили в течение ночи при к. т. с получением требуемого пептида В-цепи.

20 Образование дисульфидов A20C-B19C

- К смеси А-цепи (0,33 г) и В-цепи (0,33 г) добавляли DMSO (8 мл) и DIPEA (1 мл) и смесь перемешивали в течение 20 мин, затем добавляли по каплям при перемешивании до 140 мл нейтрального буферного раствора (вода, ТРИС (10 мМ), сульфат аммония (15 мМ), 20% ацетонитрил) до общего объема, составляющего прим.
- 25 150 мл.

Затем смесь очищали посредством хроматографии с обращенной фазой, используя следующие параметры:

- Колонка Phenomenex Gemini 5 мкМ 5 ЕД C18 110 Å 30 × 250 мм, скорость 20 мл/мин., от 10% В до 60% В в течение 40 мин.

- Элюент А = 10 мМ ТРИС, 15 мМ сульфат аммония, рН = 7,3, 20% АСN в воде milliQ

- Элюент В = 20% воды milliQ в ацетонитриле

Чистые фракции объединяли, быстро замораживали и лиофилизировали.

5 Образование дисульфидов А7С-В7С

Лиофилизированное промежуточное соединение, полученное на предыдущей стадии, повторно растворяли в 5 мл DMSO. Добавляли уксусную кислоту (20 мл) и воду (4 мл), а затем йод в АсОН (3 мл 40 мМ).

10 По прошествии общего времени реакции, составляющего 20 мин, реакционную смесь гасили 1 М аскорбатом натрия, а затем добавляли к перемешиваемому водному раствору (90 мл).

Затем смесь очищали посредством хроматографии с обращенной фазой, используя следующие параметры:

- Колонка Phenomenex Gemini 5 мкМ 5 ЕД С18 110 Å 30 × 250 мм, скорость 20 мл/мин, от 10% В до 45% В в течение 40 мин.

- Элюент А = 0,1% ТФА в воде milliQ

- Элюент В = 0,1% ТФА в ацетонитриле

Чистые фракции объединяли, быстро замораживали и лиофилизировали с получением требуемого продукта.

20 Общая процедура (В)

Экспрессия и очистка аналогов инсулина

Экспрессия аналогов инсулина в *S. cerevisiae*

25 Аналог инсулина, т. е. двухцепочечные неацилированные аналоги инсулина, предназначенные для использования в соответствии с настоящим изобретением, получают рекомбинантно путем экспрессии последовательности ДНК, кодирующей

рассматриваемый аналог инсулина в подходящей клетке-хозяине, посредством хорошо известных методик, например, раскрытых в патентном документе US 6500645. Аналог инсулина экспрессируется либо прямо, либо в виде молекулы-предшественника, которая может иметь N-концевое удлинение в В-цепи и/или связывающий пептид (С-пептид) между В-цепью и А-цепью. Это N-концевое удлинение и С-пептид отщепляют *in vitro* с помощью подходящей протеазы, например протеазы из *Achromobacter lyticus* (ALP), или трипсина, поэтому они будут иметь сайт расщепления рядом с положениями В1 и А1 соответственно. N-концевые удлинения и С-пептиды типа, подходящего для применения в соответствии с данным изобретением, раскрыты, например, в патентных документах US 5395922, EP 765395 и WO 9828429.

Полинуклеотидную последовательность, кодирующую предшественник аналога инсулина, предназначенный для применения в соответствии с настоящим изобретением, можно получить синтетическим путем с помощью известных способов, например, фосфорамидитного способа, описанного в публикации *Beaucage et al.* (1981) *Tetrahedron Letters* 22 1859-1869, или способа, описанного в публикации *Matthes et al.* (1984) *EMBO Journal* 3 801-805. В соответствии с фосфорамидитным способом олигонуклеотиды синтезировали, например в автоматическом синтезаторе ДНК, очищали, дуплексировали и лигировали с образованием синтетической ДНК-конструкции. В настоящее время предпочтительным способом получения ДНК-конструкции является полимеразная цепная реакция (ПЦР).

В рекомбинантном способе, как правило, используется вектор, который способен реплицироваться в выбранных микроорганизме или клетке-хозяине и который несет полинуклеотидную последовательность, кодирующую предшественник аналога инсулина, предназначенный для применения в соответствии с настоящим изобретением. Рекомбинантный вектор может представлять собой автономно реплицирующийся вектор, т. е. вектор, который существует в виде внехромосомной структуры, репликация которой является независимой от хромосомной репликации, например, в виде плазмиды, внехромосомного элемента, мини-хромосомы или искусственной хромосомы. Вектор может содержать любые средства для обеспечения саморепликации. В качестве альтернативы вектор может представлять собой вектор, который при введении в клетку-хозяина интегрируется в геном и реплицируется совместно с хромосомой (хромосомами), в которую (которые) он был интегрирован.

Кроме того, можно использовать один вектор или плазмиду или два или более векторов или плазмид, которые вместе содержат общую ДНК, подлежащую введению в геном клетки-хозяина, или транспозон. Вектор может представлять собой линейные или замкнутые кольцевые плазмиды, и предпочтительно содержит элемент(ы), которые

5 обеспечивают стабильную интеграцию вектора в геном клетки-хозяина или автономную репликацию вектора в клетке независимо от генома.

Рекомбинантный вектор экспрессии может представлять собой вектор, способный к репликации в дрожжах. Примеры последовательностей, которые позволяют вектору реплицироваться в дрожжах, представляют собой гены репликации

10 REP 1–3 2 мкм плазмиды дрожжей и точку начала репликации.

Вектор может содержать один или более селективных маркеров, которые обеспечивают легкий отбор трансформированных клеток. Селективный маркер представляет собой генный продукт, который обеспечивает резистентность к бактериям или вирусам, резистентность к тяжелым металлам, прототрофность в отношении

15 ауксотрофов и т. п. Примерами бактериальных селективных маркеров являются гены *dal* из *Bacillus subtilis* или *Bacillus licheniformis* или маркеры, которые придают резистентность к антибиотикам, как, например, резистентность к ампициллину, канамицину, хлорамфениколу или тетрациклину. Селективные маркеры, предназначенные для применения в клетке-хозяине, представляющей собой

20 мицелиальный гриб, включают *amdS* (ацетамидазу), *argB* (орнитин-карбамоилтрансферазу), *pyrG* (оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу) и *trpC* (антранилатсинтазу). Подходящие маркеры для дрожжевых клеток-хозяев представляют собой ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 и URA3. Селективным маркером, который хорошо подходит для дрожжей, является ген *TRP1* из

25 *Schizosaccharomyces pombe* (Russell (1985) Gene 40 125-130).

В векторе полинуклеотидная последовательность функционально связана с подходящей промоторной последовательностью. Промотор может представлять собой любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая проявляет транскрипционную активность в выбранной клетке-хозяине, в том числе мутантные,

30 усеченные и гибридные промоторы, и может быть получен из генов, кодирующих внеклеточные или внутриклеточные полипептиды, либо гомологичные, либо гетерологичные в отношении клетки-хозяина.

Примерами подходящих промоторов для направления транскрипции в бактериальной клетке-хозяине являются промоторы, полученные из *lac*-оперона *E. coli*, гена агаразы (*dagA*) *Streptomyces coelicolor*, гена левансахаразы (*sacB*) *Bacillus subtilis*, гена альфа-амилазы (*amyL*) *Bacillus licheniformis*, гена мальтогенной амилазы (*amyM*) *Bacillus stearothermophilus*, гена альфа-амилазы (*amyQ*) *Bacillus amyloliquefaciens* и гена пенициллиназы *Bacillus licheniformis*. Примерами подходящих промоторов для направления транскрипции в клетке-хозяине, представляющей собой мицелиальный гриб, являются промоторы, полученные из генов амилазы ТАКА из *Aspergillus oryzae*, аспарагиновой протеиназы из *Rhizomucor miehei*, нейтральной альфа-амилазы из *Aspergillus niger* и кислотоустойчивой альфа-амилазы из *Aspergillus niger*. В дрожжевом хозяине применимыми промоторами являются промоторы *Ma1*, *TPI*, *ADH*, *TDH3* или *PGK* из *Saccharomyces cerevisiae*.

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая пептидный остов инсулина, предназначенный для применения в соответствии с настоящим изобретением, также будет, как правило, функционально связана с подходящим терминатором. В дрожжах подходящим терминатором является терминатор *TPI* (Alber et al. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1 419-434).

Процедуры, используемые для объединения полинуклеотидной последовательности, кодирующей аналог инсулина, предназначенный для применения в соответствии с настоящим изобретением, промотора и терминатора соответственно, и для их вставки в подходящий вектор, содержащий информацию, необходимую для репликации в выбранном хозяине, хорошо известны специалистам в данной области техники. Следует понимать, что вектор может быть сконструирован либо путем предварительного получения ДНК-конструкции, содержащей полную последовательность ДНК, кодирующую остов инсулина, предназначенный для применения в соответствии с настоящим изобретением, и последующей вставки данного фрагмента в подходящий вектор экспрессии, либо путем последующей вставки фрагментов ДНК, содержащих генетическую информацию для отдельных элементов, как, например, для сигнального пептида и пропептида (N-концевого удлинения В-цепи), С-пептида, А- и В-цепей, с последующим лигированием.

Вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую аналог инсулина, предназначенный для применения в соответствии с настоящим

изобретением, вводят в клетку-хозяина так, что вектор сохраняется в виде хромосомного интегрированного компонента или в виде самореплицирующегося внехромосомного вектора. Термин «клетка-хозяин» охватывает любое потомство родительской клетки, которое не идентично родительской клетке из-за мутаций, возникающих в ходе репликации. Клетка-хозяин может быть одноклеточным микроорганизмом, например прокариотом, или многоклеточным микроорганизмом, например эукариотом. Применимыми клетками одноклеточных являются бактериальные клетки, такие как грамположительные бактерии, в том числе без ограничения клетка *Bacillus*, клетка *Streptomyces*, или грамотрицательные бактерии, такие как *E. coli* и *Pseudomonas sp.* Эукариотические клетки могут быть клетками млекопитающего, насекомого, растения или гриба.

Клетка-хозяин может представлять собой, в частности, дрожжевую клетку. Дрожжевой организм может быть любым подходящим дрожжевым организмом, который при культивировании секретирует пептидный остов инсулина или его предшественника в культуральную среду. Примеры подходящих дрожжевых организмов включают штаммы, выбранные из *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sp.*, *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Geotrichum sp.* и *Geotrichum fermentans*.

Трансформацию дрожжевых клеток можно, например, осуществлять путем образования протопласта с последующей трансформацией с помощью известных способов. Средой, используемой для культивирования клеток, может быть любая стандартная среда, подходящая для выращивания дрожжевых организмов.

25 Очистка аналогов инсулина

Секретируемый аналог инсулина или его предшественник может быть выделен из среды с помощью общепринятых процедур, включая отделение дрожжевых клеток от среды путем центрифугирования, путем фильтрации или путем улавливания или адсорбирования аналога инсулина или его предшественника с помощью ионообменной матрицы или абсорбирующей матрицы с обратной фазой, осаждения белковых компонентов супернатанта или путем фильтрации с использованием соли, например

сульфата аммония, с последующей очисткой с использованием разных хроматографических процедур, например, ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии и т. д.

5 Очистку и расщепление пептидных остовов инсулина по настоящему изобретению проводят следующим образом:

одноцепочечный предшественник аналога инсулина, который может содержать N-концевое удлинение В-цепи и модифицированный С-пептид между В-цепью и А-цепью, очищали и концентрировали из супернатанта дрожжевой культуры путем катионного обмена (Kjeldsen et al. (1998) Prot. Expr. Pur. 14 309-316).

10 Созревание одноцепочечного предшественника аналога инсулина в двухцепочечный пептидный остов инсулина осуществляют путем расщепления лизин-специфической иммобилизованной ALP (Kristensen et al. (1997) J. Biol. Chem. 20 12978-12983) или с использованием трипсина для отщепления N-концевого участка В-цепи, если он присутствует, и С-пептида.

15 Расщепление с помощью ALP

Элюат, полученный на стадии катионообменной хроматографии, содержащий пептидный остов предшественника инсулина, разбавляли водой до концентрации этанола 15–20%. Глутамат натрия добавляли до концентрации 15 мМ, и показатель pH доводили до 9,7 с использованием NaOH. Иммобилизованную ALP (4 грамма/л)
20 добавляли при соотношении 1:100 (объем:объем) и позволяли пройти процессу расщепления при легком перемешивании при комнатной температуре в течение ночи.

Реакцию расщепления анализировали с помощью аналитической ЖХ на системе Waters Acquity Ultra-Performance Liquid Chromatography с применением колонки C18, а молекулярную массу подтверждали с помощью времяпролетной с матрично-
25 активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) масс-спектрометрии (MS) (Bruker Daltonics Autoflex II TOF/TOF).

Иммобилизованную ALP удаляли с помощью фильтрации с использованием 0,2 мкм фильтра. Двухцепочечный пептидный остов инсулина очищали с помощью

HPLC с обратной фазой (система Waters 600) на колонке C18 с использованием градиента ацетонитрила. Требуемый инсулин выделяли путем лиофилизации.

Чистоту определяли с помощью аналитической LC на системе Waters Acquity Ultra-Performance Liquid Chromatography с применением колонки C18, а молекулярную массу подтверждали посредством MALDI-TOF MS

Соединение из примера 1

Получено с помощью общей процедуры (B)

Человеческий инсулин A9E, B3E, B26E, desB30 (SEQ ID NO: 3 и 4)

Соединение из примера 2

10 Получено с помощью общей процедуры (B)

Человеческий инсулин A9E, B3E, B27E, B28E, desB30 (SEQ ID NO: 3 и 5)

Соединение из примера 3

Получено с помощью общей процедуры (A)

Человеческий инсулин A9E, B3E, B26E (SEQ ID NO: 3 и 6)

15 **Соединение из примера 4**

Получено с помощью общей процедуры (A)

Человеческий инсулин A9E, B3E, B27E, B28E (SEQ ID NO: 3 и 7)

Соединение из примера 5

Получено с помощью общей процедуры (B)

20 A9D, B3E, B26E, desB30 (SEQ ID NO: 8 и 4)

Соединение из примера 6

Получено с помощью общей процедуры (B)

A9E, A21A, B3E, B26E, desB30 (SEQ ID NO: 9 и 4)

Соединение-препарат сравнения 1

Человеческий инсулин В3Е, В26Е, desВ30

Соединение-препарат сравнения 2

Человеческий инсулин В3Е, В27Е, В28Е, desВ30

5 Соединение-препарат сравнения 3

Человеческий инсулин В28D (инсулин аспарт)

Соединение-препарат сравнения 4

Человеческий инсулин А21А, В3Е, В26Е, desВ30

Пример 7

10 Аффинность выбранных производных инсулина по настоящему изобретению к инсулиновым рецепторам, измеренная в отношении солибилизованных рецепторов

Относительную аффинность связывания аналогов инсулина по настоящему изобретению с инсулиновым рецептором (IR) человека определяли путем конкурентного связывания в сцинтилляционном анализе сближения (SPA) (в
15 соответствии с публикацией Glendorf T et al. (2008) Biochemistry 47 4743-4751).

Если вкратце, то серию разведений стандарта человеческого инсулина и тестируемого аналога инсулина выполняли в 96-луночных планшетах Optiplate (Perkin-Elmer Life Sciences) с последующим добавлением [125I-A14Y]-человеческого
20 инсулина, мышинового антитела к IR 83-7, солибилизованного человеческого IR-A (полуочищенного из клеток почек детенышей хомяка (ВНК), сверхэкспрессирующих голорецептор IR-A, с помощью хроматографии с применением пшеничного зародышевого агглютинина), и гранул SPA (поливинилтолуловых гранул SPA, покрытых мышинным антителом, GE Healthcare) в буфере для связывания, состоящем из
25 100 мМ HEPES (pH 7,8), 100 мМ NaCl, 10 мМ MgSO₄ и 0,025% (об./об.) Tween 20. Планшеты инкубировали при осторожном встряхивании в течение 22-24 ч при 22°C,

центрифугировали при 2000 об./мин в течение 2 минут и осуществляли подсчет на TopCount NXT (Perkin-Elmer Life Sciences).

Данные, полученные в SPA, анализировали в соответствии с четырехпараметрической логистической моделью (Vølund A (1978) Biometrics 34 357-365), а аффинности связывания аналогов рассчитывали в сравнении с такой же аффинностью связывания стандартного человеческого инсулина, измеренной в том же планшете.

Показатели аффинности к инсулиновым рецепторам и другие данные *in vitro* для выбранных аналогов инсулина по настоящему изобретению представлены в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Показатели аффинности к инсулиновому рецептору, аффинности к рецептору IGF-1 и активности функционального липогенеза инсулинов по настоящему изобретению

Соединение из примера №	hIRA (% по сравн. с НИ) Прим. 7	hIRA mem (% по сравн. с НИ) Прим. 8	hIGF1R mem (% по сравн. с НИ) Прим. 8	Липогенез (% по сравн. с НИ) Прим. 9
1	83,2	55,8	10,2	68,2
2	59,5	35,4	16,5	46,5
5	75,5	Н. О.	Н. О.	Н. О.
6	35,3	Н. О.	Н. О.	Н. О.

В заключение следует отметить, что аналоги инсулина по настоящему изобретению характеризуются высокой аффинностью к инсулиновому рецептору и способны активировать рецептор и вызывать функциональный ответ. Кроме того, относительная аффинность аналогов инсулина по настоящему изобретению к рецептору IGF-1 является более низкой по сравнению с аффинностью к инсулиновому рецептору. Это является потенциальным преимуществом в отношении безопасности аналогов по настоящему изобретению в клинической практике, поскольку митогенный ответ будет ниже по сравнению с метаболическим ответом.

Пример 8

Показатели аффинности выбранных производных инсулина по настоящему изобретению к инсулиновому рецептору и рецепторам инсулиноподобного фактора роста 1, измеренные в отношении мембраноассоциированных рецепторов

Мембраноассоциированный человеческий IR и IGF-1R выделяют из клеток ВНК, стабильно трансфицированных вектором pZem219B, содержащим вставку либо человеческого IR-A, IR-B, либо IGF-IR. Клетки ВНК собирали и гомогенизировали в ледяном буфере (25 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM CaCl₂ и 1 mM MgCl₂, 250 мг/л бацитрацина, 0,1 mM Pefablock). Гомогенаты наслаивали на слой 41% (вес/об.) сахарозы и центрифугировали в течение 75 минут при 95000 g при 4°C. Цитоплазматические мембраны собирали, разбавляли буфером в соотношении 1:5 (как указано выше) и повторно центрифугировали в течение 45 минут при 40000 g при 4°C. Осадки повторно суспендировали в минимальном объеме буфера и трижды извлекали через иглу (размер 23) перед хранением при -80°C до дальнейшего использования.

Относительную аффинность связывания любого из мембраноассоциированных человеческих IR-A, IR-B или IGF-1R определяли путем конкурентного связывания в условиях SPA. IR-анализы выполняли дважды в 96-луночных планшетах OptiPlates (Perkin-Elmer Life Sciences). Мембранный белок инкубировали при осторожном встряхивании в течение 150 минут при 25°C с 50 пМ [125I-A14Y]-человеческого инсулина в общем объеме 200 мкл буфера для анализа (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM MgSO₄, 0,01% Triton X-100, 0,1% (вес/об.) HSA (Sigma A1887), полные ингибиторы протеаз, не содержащие EDTA), 50 мкг микросфер PVT, покрытых пшеничным зародышевым агглютинином (WGA) (GE Healthcare) и возрастающих концентраций лиганда. Анализ завершали центрифугированием планшета при 2000 об./мин в течение 2 минут и количественно оценивали связанную радиоактивность путем подсчета на приборе TopCount NXT (Perkin-Elmer Life Sciences).

Анализ IGF-1R выполняли по сути так же, как и анализ связывания IR, за исключением того, что использовали мембраноассоциированный IGF-1R и 50 пМ [125I-Tyr31]-человеческого IGF-1. Данные, полученные в SPA, анализировали в соответствии с четырехпараметрической логистической моделью (Vølund A (1978) Biometrics 34 357-365), а аффинности связывания тестируемых аналогов рассчитывали в сравнении с такой же аффинностью связывания стандартного человеческого инсулина, измеренной в том же планшете.

Данные по связыванию IR (изоформы A) и IGF-1R выбранных аналогов инсулина по настоящему изобретению приведены в таблице 1 выше.

Пример 9

Липогенез в адипоцитах крысы

5 В качестве показателя эффективности *in vitro* аналогов инсулина по настоящему изобретению можно использовать липогенез.

Первичные адипоциты крысы выделяли из жировых подушек придатка яичка и инкубировали с 3H-глюкозой в буфере, содержащем, например, 0,1% обезжиренного HSA и либо стандартный (человеческий инсулин, HI), либо инсулин по настоящему изобретению. Меченую глюкозу преобразовывали в экстрагируемые липиды дозозависимым образом, в результате чего получали полные кривые зависимости доза-ответ. Результат выражается в виде относительной эффективности (%) с доверительными интервалами 95% инсулина по настоящему изобретению по сравнению со стандартом (HI).

15 Данные приведены в таблице 1 выше.

Пример 10

Получение композиций на основе инсулина

Композиции на основе инсулина по настоящему изобретению могут быть получены в виде водных растворов. Водный раствор готовят изотоническим, например, с использованием хлорида натрия и/или глицерина. Кроме того, водная среда может содержать буферы и консерванты. Значение pH препарата доводили до требуемого значения, и оно могло составлять от приблизительно 3 до приблизительно 8,5, от приблизительно 3 до приблизительно 5, или приблизительно 6,5, или приблизительно 7,4, или приблизительно 7,5, в зависимости от изоэлектрической точки pI рассматриваемого аналога инсулина.

Получение композиций на основе инсулина, не содержащего цинк

Аналоги инсулина, не содержащие цинк, растворяли в водном растворе, который в конечной композиции содержал от 0,1 мМ до 10 мМ аналога инсулина, 16 мМ м-

крезола, 16 мМ фенола и соответствующие количества никотинамида и глицерина, а рН доводили до требуемого значения (от 7,0 до 8,0, измеряется при комнатной температуре) с использованием 1 н. хлористоводородной кислоты / 1 н. NaOH. Добавляли воду до конечного объема и раствор стерильно фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Композицию помещали во флаконы (флаконы объемом 2 мл, закрытые обжимными колпачками, пенфиллы, закрытые обжимными колпачками, или флаконы для HPLC с завинчивающимися крышками).

Таблица 2. Иллюстративные композиции на основе препаратов инсулина

Композиция	Инсулин (мМ)	Фенол (мМ)	m-Крезол (мМ)	Никотин амид (мМ)	Глицерин % , мМ		Пропил энглицо ль, %	Фосфа т (мМ)	Трис (мМ)	рН	Цитрат (мМ)
A	0,6	16	16	0	2,15	233	0	3		7,4	
B	0,6	16	16	40	1,85	200	0	3		7,4	
B1	0,6	16	16	40	1,5	163	0	3		7,4	5
B2	0,6	16	16	40	1,5	163	0	3		7,4	10
B3	0,6	16	16	40	1,2	130	0	3		7,4	15
B4	0,6	16	16	40	1,2	130	0	3		7,4	20
C	0,6	16	16	170	0,95	103	0	3		7,4	
I	0,6	16	16	40	1,7	185	0	3		7,2	
II	0,6	16	16	20	1,7	185	0	3		7,4	10
L	0,6	16	16	40	0	0	1,5		7	7,4	
M	0,6	16	16	40	1,8	195	0		7	7,4	
M1	0,6	16	16	10	1,8	195	0	3		7,4	10
D	1,2	16	16	40	1,85	200	0	3		7,4	
D1	1,2	16	16	40	1,5	163	0	3		7,4	10
E	1,8	16	16	40	1,85	200	0	3		7,4	
F	2,4	16	16	40	1,85	200	0	3		7,4	
G	3,0	16	16	40	1,85	200	0	3		7,4	
H	3,0	16	16	40	1,85	200	0	3		7,0	
J	3,0	16	16	0	1,8	195	0	3		7,0	
K	3,0	16	16	0	2,1	230	0	3		7,4	
K1	3,0	16	16	0	2,1	230	0	3		7,4	20
O	3,0	19	19	40	1,7	185	0	3		7,2	
P	3,0	19	19	40	1,7	185	0	3		7,6	
Q	3,0	19	19	40	1,7	185	0	3		8,0	

Пример 11

Самоассоциация композиций на основе инсулина, измеренная с помощью малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS)

Данные SAXS использовали для оценки состояния самоассоциации аналогов инсулина по настоящему изобретению в различных условиях.

5 Кривую рассеяния для каждого эксперимента описывали средним радиусом инерции (R_g) и максимальным размером (D_{max}).

Кроме того, относительные количества мономера, димера и более крупных фрагментов на кривой рассеяния оценивали с использованием того факта, что профиль рассеяния SAXS характеризуется вкладом интенсивности от всех отдельных компонентов в многокомпонентной смеси. С помощью показателей интенсивности (форм-факторов интенсивности) каждого компонента можно оценить объемную долю вклада каждого компонента в смесь. Систему линейных уравнений с использованием алгоритма неотрицательных или неограниченных наименьших квадратов использовали для сведения к минимуму несоответствия между экспериментальной и расчетной кривыми рассеяния. Форм-факторы рассчитывали на основе кристаллических структур мономера, димера, гексамера и т. д. Объемные доли выражены в процентах (%).

Результаты, полученные для производных по настоящему изобретению и производных из известного уровня техники, показаны в таблице 3 ниже.

Таблица 3. Данные, полученные с использованием SAXS, для производных по настоящему изобретению и аналогов инсулина, являющихся препаратами сравнения

Соединение примера №	из	Композиция	SAXS* Состав, описанный в примере 10	
			M	D+>D
1		A	100	0
1		B	100	0
1		C	100	0
1		I	99	1
1		II	100	0
1		L	98	2
1		M	100	0
1		M1	100	0

1	D	100	0
1	D1	97	3
1	E	100	0
1	F	100	0
1	G	100	0
1	H	79	21
1	O	90	10
1	P	100	0
1	Q	100	0
1	B1	100	0
1	B2	100	0
1	B3	100	0
1	B4	100	0
2	A	100	0
2	I	100	0
2	B	100	0
2	L	100	0
2	M	100	0
2	O	100	0
2	P	100	0
2	Q	100	0
5	B	98	2
5	G	95	5
6	B	91	9
Препарат сравнения 1	B	97	3
Препарат сравнения 1	B4	95	5
Препарат сравнения 1	G	77	23
Препарат сравнения 1	H	4	96
Препарат сравнения 2	A	100	0
Препарат сравнения 2	J	0	100
Препарат сравнения 2	K	87	13
Препарат сравнения 2	K1	0	100
Препарат сравнения 3	A#	35	65
Препарат сравнения 3	B#	0	100
Препарат сравнения 3	A+Zn	0	100
Препарат сравнения 4	A	86	14

Препарат сравнения 4	К	42	58
Препарат сравнения 4	В4	87	13
Препарат сравнения 4	К1	0	100

*) М: процент мономерных соединений в композиции; D: процент димерных соединений в композиции; >D: процент соединений в композиции, которые крупнее димерных;

#) концентрация фосфата 7 мМ вместо 3 мМ

5 В заключение следует отметить, что аналоги инсулина по настоящему изобретению в меньшей степени самоассоциируются, чем соединения-препараты сравнения, в соответствии с результатами SAXS. Эта разница является более выраженной при более высоких концентрациях аналогов инсулина по настоящему изобретению. Таким образом, ожидается, что аналоги инсулина по настоящему изобретению будут всасываться быстрее после подкожной инъекции композиций с особенно высокой концентрацией.

Пример 12

Анализ физической стабильности композиций на основе инсулина

15 Композиции (1 мл) на основе аналогов инсулина по настоящему изобретению, описанные в примере 10, переносили во флаконы объемом 2 мл и закрывали с помощью обжимных колпачков. Флаконы инкубировали при 30°C в положении лежа. Каждые 2 дня роботизированный манипулятор поднимал флакон и делала снимок стоящего флакона при фоновом освещении 10000 люкс. Полученные изображения анализировали в отношении присутствия частиц с использованием алгоритма

20 элементного анализа. Первый день, когда были обнаружены частицы, указан в таблице ниже.

Таблица 4. Физическая и химическая стабильность аналогов инсулина по настоящему изобретению в клинически значимых композициях

Соединение из примера №	Композиция	Время задержки до физической стабильности (дни)	Образование НМWP (неделя 4 при 37°C)
1	A	>35	0,1
1	B	>35	0,2
1	C	>35	0,2
1	I	>35	0,1
1	L	Н. О.	0,2
1	M	Н. О.	0,4
1	D	>35	0,3
1	E	>35	0,8
1	F	>35	1,3
1	G	>35	1,9
1	H	30	1,6
1	O	>35	1,6
1	P	>35	3,8
1	Q	>35	8,6
1	B1	>35	0,1
1	B2	>35	0,8
1	B3	>35	0,6
1	B4	>35	0,1
2	A	>35	0,1
2	I	>36	0,1
2	B	>40	0,1
2	L	>40	0,1
2	M	>40	0,1
2	O	>36	0,7
2	P	>36	0,6
2	Q	>36	1,1
5	B	>35	0,4
6	B	>35	-0,1
6	G	15	2,1*
Препарат сравнения 1	B	12	1,9
Препарат сравнения 1	B4	2	1,7*
Препарат сравнения 1	G	2	3,5*
Препарат сравнения 1	H	4	3,2*
Препарат сравнения 2	A	>36	0,8
Препарат сравнения 2	J	24	2,4*
Препарат	K	13	3,9*

сравнения 2			
Препарат сравнения 2	K1	5	1,1*
Препарат сравнения 3	A#	5,3	1,6*
Препарат сравнения 3	B#	3,3	1,8*
Препарат сравнения 3	A+Zn	>43	0,5
Препарат сравнения 4	A	14	1,6*
Препарат сравнения 4	B4	4	2,9*

#) концентрация фосфата 7 мМ вместо 3 мМ

Н. О.: не определено

*) НМWP определяли в супернатантах образцов, содержащих частицы; частицы не солюбилизировались.

- 5 В заключение следует отметить, что аналоги инсулина по настоящему изобретению характеризуются более высокой физической стабильностью в клинически значимых композициях, не содержащих Zn, особенно при высокой концентрации инсулина.

Пример 13

10 Анализ химической стабильности композиций на основе инсулина

Содержание НМWP

15 Высокомолекулярные белки (НМWP) отделяли от мономерной формы инсулина с помощью эксклюзионной хроматографии с использованием колонки Waters Insulin НМWP (125Å, 10 мкм, WAT 201549, 7,8 × 300 мм) при скорости потока 0,5 мл/мин элюента, содержащего 50% (об/об) изопропанола, 600 мМ NaCl, 20 мМ NaH₂PO₄, и УФ-детекции при 215 нм.

Типичный объем впрыскивания составлял 5 мкл композиции на основе инсулина с концентрацией 600 мкМ.

Результаты показаны в таблице 4 выше.

Пример 14

PK- / PD-профили при подкожном введении у свиней LYD

Аналоги инсулина по настоящему изобретению можно тестировать с помощью подкожного введения свиньям, например, сравнивая с инсулином аспартом в клинической композиции (FIASP®) или сравнивая с подобными аналогами инсулина из предшествующего уровня техники в соответствии с данным протоколом. Аналоги могут быть протестированы в отношении фармакокинетических и/или фармакодинамических параметров.

Общие используемые способы

10 Под анестезией устанавливали постоянные внутривенные катетеры свиньям под контролем ультразвукового обследования с помощью ультразвукового сканера Esaote модели «MyLabFive» и линейного зонда типа «LA435 6–18 МГц».

15 На средней части шеи между ухом и лопаткой, справа и слева, определяли и маркировали татуировкой область размером 2×2 см без подлежащих мышц, подходящую для подкожной инъекции.

Схема кормления

Перед экспериментом свиней подвергали голоданию (не кормили утром).

20 Свиньи находились в своих обычных загонах в течение всего эксперимента и их не подвергали анестезии. Свиней подвергали голоданию до тех пор, пока не отбирали образец крови в момент времени 5-часов, при этом им обеспечивали свободный доступ к воде. После отбора образца крови в момент времени 5 часов свиньям скармливали корм и яблоки.

Подкожное введение дозы

25 Penfill устанавливали в NovoPen Echo® с иглой Novofine 30G 8 мм, с использованием переходника иглы с глубиной 5 мм, используемого для каждой свиньи. Каждой свинье вводили дозу $10 \text{ ЕД} = 60 \text{ мкл}$ композиций, содержащих 600 нмоль/мл аналога инсулина.

Свинье вводили дозу в подкожную жировую клетчатку латерально с правой или левой стороны (напротив катетера) шеи, и иглу удерживали в подкожной жировой клетчатке в течение не менее 10 секунд после инъекции с тем, чтобы обеспечить накопление соединения.

5 Контроль гипогликемии

После подкожного введения дозы раствор глюкозы должен быть готов для в/в инъекции для предупреждения гипогликемии, т. е. 4–5 шприцев (20 мл) наполняли стерильным 20% раствором глюкозы, готовым к применению. Диагноз гипогликемии основан на основании клинических симптомов и измерении уровня глюкозы в крови с помощью глюкометра (Glucocard X-meter).

Контроль заключался в медленной в/в инъекции 50–100 мл 20% раствора глюкозы (10–20 г глюкозы). Глюкозу вводили частями за 5–10 минут до достижения эффекта.

Отбор образцов крови

15 Проприодимость катетеров для яремной вены перед экспериментом проверяли с помощью стерильного 0,9% раствора NaCl без добавления 10 МЕ/мл гепарина.

До и после введения дозы образцы крови отбирали в загоне из центрального венозного катетера в следующие временные точки:

20 до введения дозы (-15, -5), 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 240, 300 мин.

Образцы отбирали с помощью переключателя потока. Перед взятием образца крови спускали 4–5 мл крови.

Образцы крови по 0,8 мл собирали в пробирки, покрытые EDTA, для анализа на глюкозу и инсулин.

25 После отбора каждого образца крови катетер промывали 5 мл стерильного 0,9% NaCl без добавления 10 МЕ/мл гепарина.

Пробирку осторожно наклоняли не менее 10 раз для обеспечения достаточного перемешивания крови и антикоагулянта (EDTA) и через одну минуту помещали на влажный лед. Пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об./мин и 4°C в течение 1 часа после отбора образцов. Образцы хранили на влажном льду до пипетирования.

Во избежание роста бактерий в катетере с повышенным риском тромбообразования требуется асептическая техника.

Закрытие катетеров после эксперимента

После того, как последний образец отбирали в дни введения дозы, однократное внутривенное введение 1 мл на 10 кг Pentrexyl® (1 г ампициллина, растворенного в 10 мл 0,9% NaCl) медленно осуществляли в/в через катетер, используемый для отбора крови. После этой обработки катетер промывали 10 мл 0,9% раствора NaCl.

Катетеры закрывали с помощью 0,5 мл TauroLockHer500, который вводили через мембрану в качестве замка для катетера.

Анализ образцов крови

Глюкоза плазмы крови: 10 мкл плазмы крови пипеткой вносили в 500 мкл буферного раствора для измерения концентрации глюкозы в плазме крови в автоматическом анализаторе BIOSEN.

Инсулин в плазме крови: 1 × 50 мкл плазмы крови пипеткой вносили в пробирки Micronic® объемом 0,65 мл (установка ELISA/LOCI/SPA) для анализа.

Плазму крови хранили в замороженном виде при -20°C.

PK-расчеты: площадь под фармакокинетической кривой (AUC) с момента введения фармакологического препарата до времени «бесконечность» и частичные AUC, AUC₀₋₅, AUC₀₋₁₀, AUC₀₋₁₅, AUC₀₋₂₀ и AUC₀₋₃₀ рассчитывали с помощью некомпартментального анализа с применением метода расчета линейного увеличения логарифма в Phoenix 64 (Certara, США). Соотношение частичная AUC/AUC_{inf} использовали в качестве меры скорости всасывания, основанной на сходных свойствах аналогов инсулина при в/в введении у свиньи LYD.

На фиг. 1 и фиг. 2 показано, что аналоги по настоящему изобретению лучше подходят для применения в инсулиновых помпах, чем FIASP[®], поскольку их действие начинается быстрее по сравнению с FIASP[®]; минимальные уровни глюкозы для аналогов инсулина по настоящему изобретению являются более низкими по сравнению с FIASP[®]. Кроме того, прекращение действия аналогов инсулина по настоящему изобретению происходит быстрее по сравнению с прекращением действия FIASP[®], что является предпочтительным для инсулиновых помп.

Хотя определенные признаки настоящего изобретения были проиллюстрированы и описаны в данном документе, специалистам средней квалификации в данной области будут очевидны многие модификации, замены, изменения и эквиваленты. Таким образом, следует понимать, что прилагаемая формула изобретения предназначена для охвата всех таких модификаций и изменений, которые находятся в пределах истинной сущности настоящего изобретения..

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Аналог инсулина, где аналог содержит A9E или A9D и дополнительно содержит B3E и/или desB30 по сравнению с человеческим инсулином.

2. Аналог инсулина по п. 1, где аналог дополнительно содержит по меньшей мере одно из B26E, B27E и/или B28E.

3. Аналог инсулина по п. 2, где аналог дополнительно содержит замену A21A.

4. Аналог инсулина по любому из предыдущих пунктов, где аналог представляет собой

A9D, B3E;

A9E, B3E;

A9D, desB30;

A9E, desB30;

A9D, B3E, desB30;

A9E, B3E, desB30;

A9D, B3E, B26E;

A9E, B3E, B26E;

A9D, B26E, desB30;

A9E, B26E, desB30;

A9D, B3E, B26E, desB30;

A9E, B3E, B26E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E;

A9E, A21A, B3E, B26E;

A9D, A21A, B26E, desB30;

A9E, A21A, B26E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, desB30;
A9D, B3E, B27E;
A9E, B3E, B27E;
A9D, B27E, desB30;
A9E, B27E, desB30;
A9D, B3E, B27E, desB30;
A9E, B3E, B27E, desB30;
A9D, A21A, B3E, B27E;
A9E, A21A, B3E, B27E;
A9D, A21A, B27E, desB30;
A9E, A21A, B27E, desB30;
A9D, A21A, B3E, B27E, desB30;
A9E, A21A, B3E, B27E, desB30;
A9D, B3E, B28E;
A9E, B3E, B28E;
A9D, B28E, desB30;
A9E, B28E, desB30;
A9D, B3E, B28E, desB30;
A9E, B3E, B28E, desB30;
A9D, A21A, B3E, B28E;
A9E, A21A, B3E, B28E;
A9D, A21A, B28E, desB30;
A9E, A21A, B28E, desB30;
A9D, A21A, B3E, B28E, desB30;
A9E, A21A, B3E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E;

A9E, B3E, B26E, B27E;

A9D, B26E, B27E, desB30;

A9E, B26E, B27E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E;

A9D, A21A, B26E, B27E, desB30;

A9E, A21A, B26E, B27E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;

A9D, B3E, B27E, B28E;

A9E, B3E, B27E, B28E;

A9D, B27E, B28E, desB30;

A9E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B27E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B27E, B28E;

A9D, A21A, B27E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B28E;

A9E, B3E, B26E, B28E;

A9D, B26E, B28E, desB30;

A9E, B26E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B28E;

A9D, A21A, B26E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B26E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9E, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9D, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;

A9D, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9E, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;

A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30 или

A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30.

5. Аналог инсулина по п. 4, где аналог представляет собой

A9E, B3E, B26E;

A9E, B3E, B27E, B28E;

A9E, B3E, B26E, desB30;

A9E, B3E, B27E, B28E, desB30;

A9D, B3E, B26E, desB30 или

A9E, A21A, B3E, B26E, desB30.

6. Аналог инсулина по п. 5, где аналог представляет собой A9E, B3E, B26E, desB30.

7. Фармацевтическая композиция, содержащая аналог инсулина по любому из пп. 1–6 и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, где аналог инсулина представлен в концентрации от 0,6 мМ до 3 мМ.

9. Фармацевтическая композиция по пп. 7–8, где композиция не содержит цинк.

10. Фармацевтическая композиция по пп. 7–9, содержащая никотиновое соединение и, в частности, никотинамид.

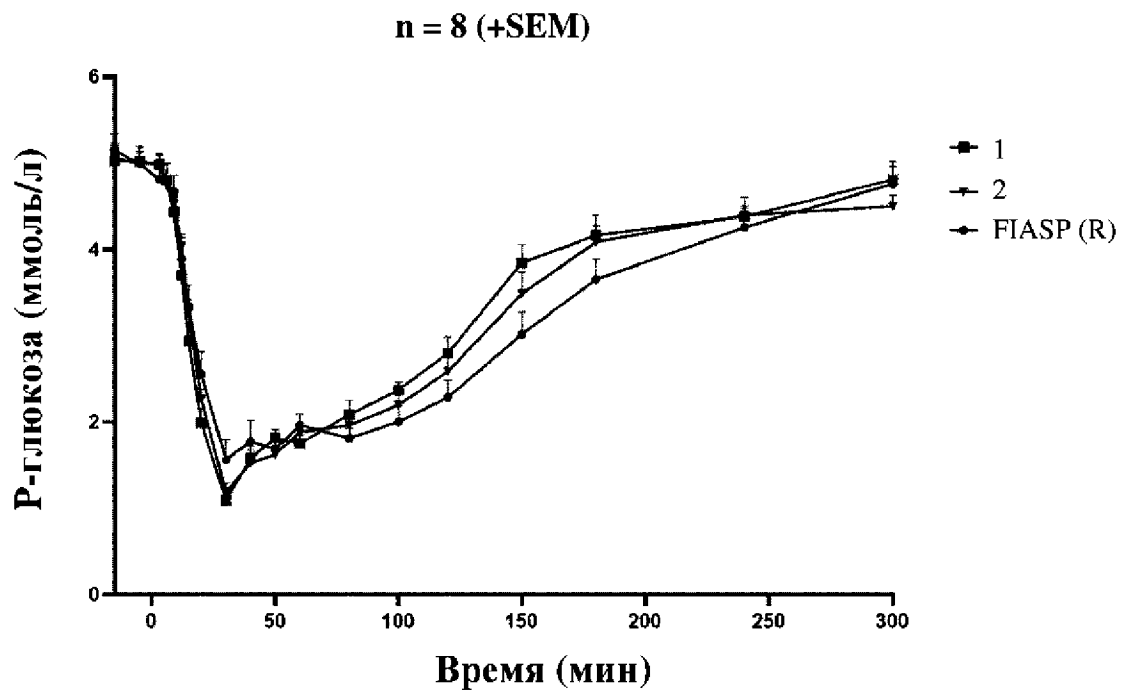
11. Фармацевтическая композиция по пп. 7–9, где композиция не содержит никотиновое соединение и, в частности, никотинамид.

12. Аналог инсулина по любому из пп. 1–6, который является мономерным в фармацевтической композиции, не содержащей цинк.

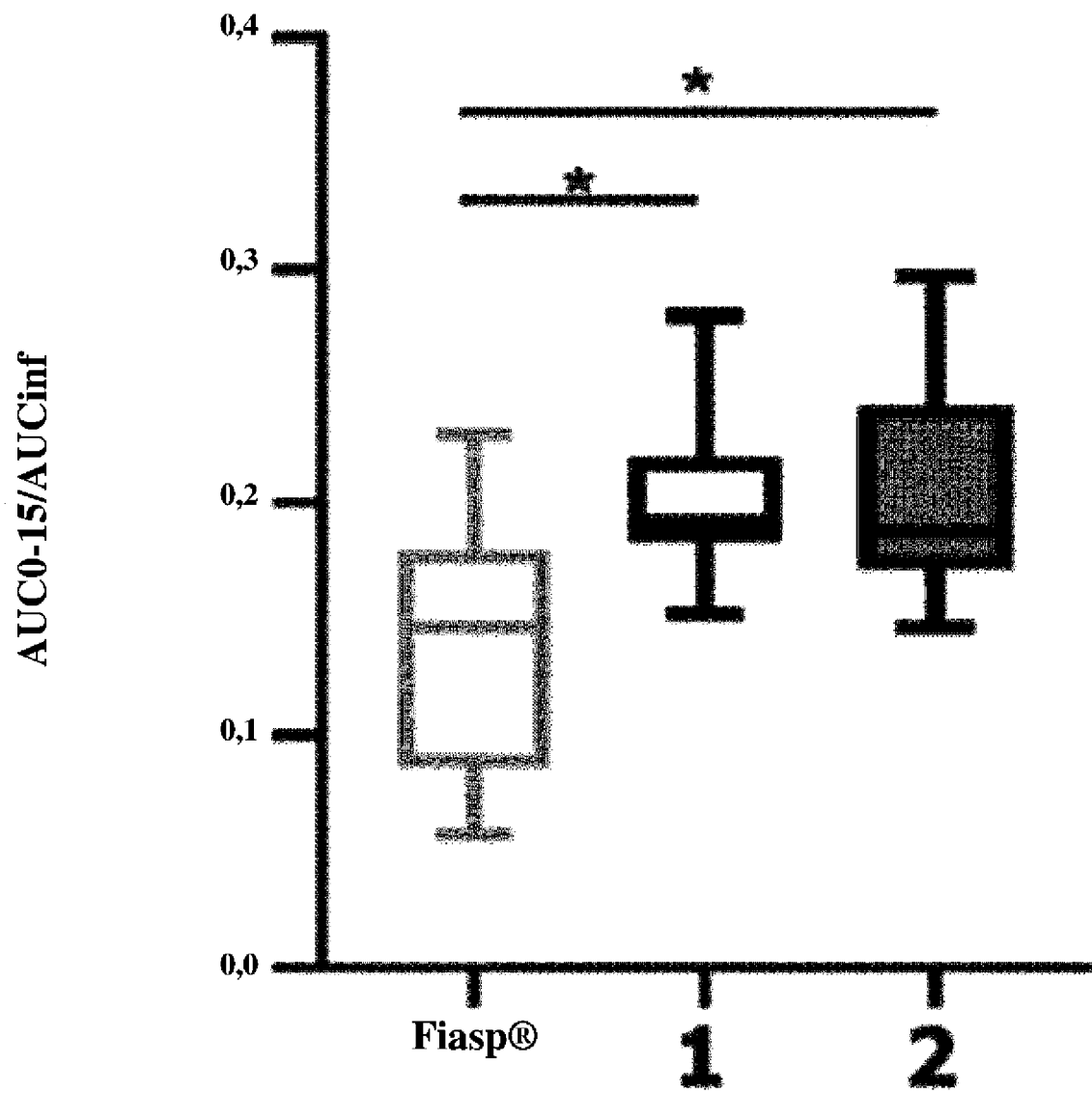
13. Аналог инсулина по п. 7, который является химически и/или физически стабильным.

14. Аналог инсулина по любому из пп. 1–6 или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция по любому из пп. 7–11 для применения в качестве лекарственного препарата.

15. Способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания, или нарушения, или патологического состояния организма человека, где заболевание, нарушение или патологическое состояние относится к диабету, в частности к диабету 1 типа или диабету 2 типа, при этом способ предусматривает стадию введения такому живому организму, относящемуся к животным, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества аналога инсулина по любому из пп. 1–6 или фармацевтической композиции по любому из пп. 7–11



Фиг. 1



Фиг. 2