

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291855 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.21

(22) Дата подачи заявки
2020.12.29

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

(54) ПРОИЗВОДНОЕ ИНСУЛИНА

(31) 201911398378.0; 202011057926.6

(32) 2019.12.30; 2020.09.29

(33) CN

(86) PCT/CN2020/141023

(87) WO 2021/136296 2021.07.08

(71) Заявитель:
ГАНЬ & ЛИ ФАРМАСЬЮТИКАЛС
КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

Гань Чжонру, Чэнь Вэй, Чжан Инин,
Сюэ Фанкай, Цай Линъюй, Ню
Цзяньхун, Му Бинь (CN)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Раскрыты ацилированный инсулин, его фармацевтический состав, его фармацевтическая композиция с веществом GLP-1 длительного действия, а также медицинское применение ацилированного инсулина, фармацевтического состава и фармацевтической композиции. По сравнению с инсулином деглудеком или другими производными инсулина ацилированный инсулин неожиданным образом обладает заметно более высоким лекарственным воздействием, имеет более значительную продолжительность действия и более длительный период полувыведения in vivo, характеризуется хорошей биодоступностью, а также улучшенной физической и химической стабильностью.

A1

202291855

202291855

A1

ПРОИЗВОДНОЕ ИНСУЛИНА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области терапевтических пептидов, и, в частности, к новому производному инсулина и его фармацевтическому составу, его фармацевтической композиции с веществом GLP-1 длительного действия и его фармацевтической композиции с инсулином быстрого действия, а также медицинскому применению производного инсулина, фармацевтического состава и фармацевтических композиций.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Инсулин — это полипептидный гормон, секретируемый β -клетками поджелудочной железы. Инсулин состоит из 2 полипептидных цепей, называемых А-цепью и В-цепью, которые соединены между собой 2 межцепочечными дисульфидными связями. В человеческом, свином и бычьем инсулине А-цепь и В-цепь содержат 21 и 30 аминокислотных остатков, соответственно. Однако среди биологических видов существуют различия между аминокислотными остатками, присутствующими в различных положениях 2 цепей. Широкое использование генной инженерии дало возможность получать аналоги природных инсулинов путем замены, удаления и добавления одного или более аминокислотных остатков.

Инсулин может использоваться для лечения сахарного диабета и заболеваний, связанных с ним либо являющихся его следствием; инсулин незаменим для поддержания нормальной регуляции обмена веществ. Однако природные инсулины, такие как человеческий инсулин, имеют относительно короткую продолжительность действия, что требует от пациента частых инъекций и вызывает у него сильный дискомфорт, связанный с инъекциями. Поэтому продолжают предприниматься усилия по получению производных или аналогов инсулина, отличающихся улучшенным лекарственным эффектом, большей продолжительностью действия и меньшей частотой введения, чтобы устранить неудобства и дискомфорт, связанные с высокой частотой введения инсулина.

В WO1995007931A1 раскрыт инсулин детемир, коммерчески доступный инсулин длительного действия, молекулярно-структурная особенность которого заключается в том, что треонин в положении 30 В-цепи человеческого инсулина удален, а 14-углеродная

жирная моноокислота присоединена к остатку лизина в положении 29 В-цепи. В WO2005012347A2 раскрыт инсулин деглудек, еще один инсулин длительного действия, который представляет собой новый инсулин сверхдлительного действия с большей продолжительностью действия, чем инсулин детемир, и имеет молекулярно-структурную особенность, заключающуюся в том, что треонин в положении 30 В-цепи человеческого инсулина удален, а 16-углеродная боковая цепь жирной дикислоты соединена с остатком лизина в положении В29 через 1 молекулу глутаминовой кислоты. В CN101573133В и WO2009/010428 раскрывают ПЭГилированный инсулин пролонгированного действия, который характеризуется большей продолжительностью действия по сравнению с обычным немодифицированным инсулином. В WO2013086927A1 и WO2018/024186 раскрывают ацилированное производное аналога человеческого инсулина длительного действия.

Однако на сегодня ни один препарат базального инсулина, частота подкожных инъекций которого составляет менее одного раза в сутки, не был одобрен для продажи.

Таким образом, все еще существует потребность в производных или аналогах инсулина с лучшим лекарственным эффектом или эффективностью, большей продолжительностью действия, меньшей частотой введения и лучшими физико-химическими свойствами по сравнению с уже имеющимся на рынке инсулином (например, инсулином деглудек) или известными производными инсулина.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предметом настоящего изобретения являются новые производные инсулина (например, ацилированные инсулины). В ходе широкомасштабных экспериментов авторы изобретения неожиданно для себя обнаружили, что новые производные инсулина (например, ацилированные инсулины) неожиданным образом обладают заметно более высокой активностью, эффективностью или лекарственным воздействием, большей продолжительностью действия, более длительным периодом полувыведения *in vivo*, хорошей биодоступностью, лучшей безопасностью и более удовлетворительной физической стабильностью, химической стабильностью и растворимостью по сравнению с коммерчески доступным инсулином деглудек (торговое название Тресиба) или некоторыми другими производными инсулина.

В одном аспекте предметом настоящего изобретения является производное инсулина,

включающее исходный инсулин, альбумин-связывающий остаток и линкер Lin, причем исходный инсулин представляет собой природный инсулин или аналог инсулина, а альбумин-связывающий остаток связан с исходным инсулином через линкер Lin, где линкер Lin представляет собой гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 40, предпочтительно по меньшей мере 50, предпочтительно по меньшей мере 65, предпочтительно по меньшей мере 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120 атомов углерода; или линкер Lin содержит по меньшей мере 11 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; предпочтительно линкер Lin содержит по меньшей мере 12 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; предпочтительно линкер Lin содержит 12–20 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; или линкер Lin содержит алкиленгликоль, содержащий по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 42, предпочтительно 15–120, предпочтительно 30–100, предпочтительно 42–80 атомов углерода; и

альбумин-связывающий остаток содержит 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток содержит линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа.

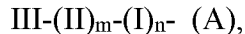
В ходе обширных экспериментов изобретатели неожиданно обнаружили, что сочетание определенной длины альбумин-связывающего остатка и определенной длины гидрофильного линкера в производном инсулина настоящего изобретения позволяет производным инсулина настоящего изобретения, по сравнению с существующими производными инсулина, получать эквивалентную или более длительную продолжительность действия и при этом неожиданно и значительно повышенный лекарственный эффект и значительно повышенную способность связывания с рецептором инсулина, поскольку влияние альбумина на способность связывания с рецептором

инсулина значительно снижается при наличии альбумина.

В некоторых вариантах осуществления исходный инсулин содержит по меньшей мере один остаток лизина, и альбумин-связывающий остаток связан с аминокислотной группой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через линкер Lin.

В некоторых вариантах осуществления производное инсулина дополнительно содержит один или более линкеров II, причем линкер II представляет собой кислотный аминокислотный остаток, и линкер II обеспечивает связывание между альбумин-связывающим остатком и линкером Lin и/или между линкером Lin и исходным инсулином, и предпочтительно обеспечивает связывание между альбумин-связывающим остатком и линкером Lin.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является производное инсулина, которое представляет собой ацилированный инсулин, причем исходный инсулин ацилированного инсулина является природным инсулином или аналогом инсулина и содержит по меньшей мере один остаток лизина, и ацильная группа ацилированного инсулина связана с аминокислотной группой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина, причем ацильная группа представлена формулой (A):



где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и n является целым числом, равным или большим 11, предпочтительно целым числом от 11 до 30;

I представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

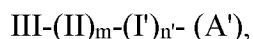
III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–24) атомов углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I, представленных в формуле (A), может быть изменен независимым образом;

или

ацильная группа представлена формулой (A'):



где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и n' является целым числом;

I' представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

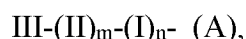
III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–24) атомов углерода, причем, формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III , II и I' соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I' , представленных в формуле (A'), может быть изменен независимым образом; и

общее количество атомов углерода в $(I')_{n'}$ составляет 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 42–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является производное инсулина, которое представляет собой ацилированный инсулин, причем исходный инсулин ацилированного инсулина является природным инсулином или аналогом инсулина и содержит по меньшей мере один остаток лизина, и ацильная группа ацилированного инсулина связан с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина, причем ацильная группа представлена формулой (A):



где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и n равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20;

I представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

III представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–24) атомов углерода, причем, формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III , II и I соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I , представленных в формуле (A), может быть изменен

независимым образом;

или

ацильная группа представлена формулой (A'):

$\text{III}-(\text{II})_m-(\text{I}')_{n'}$ (A'),

где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и n' является целым числом;

I' представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

III представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–24) атомов углерода, причем, формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I' соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I', представленных в формуле (A'), может быть изменен независимым образом; и

общее количество атомов углерода в (I')_{n'} составляет 42–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120.

В некоторых вариантах осуществления изобретения n равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18; предпочтительно n равно 11, 12, 13, 14, 15 или 16; предпочтительно n равно 11, 12, 13, 14 или 15; и/или

m является целым числом от 1 до 6; предпочтительно m равно 1, 2, 3 или 4; предпочтительно m равно 1 или 2; предпочтительно m равно 1; и/или

III представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–23) атомов углерода, и предпочтительно III представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20, 21 или 22 атома углерода, причем, формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа; и/или

исходный инсулин содержит один остаток лизина.

В некоторых вариантах осуществления I представляет собой: $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-$

$(\text{CH}_2)_4\text{-O-(CH}_2)_3\text{-NH-CO-(CH}_2)_2\text{-CO-}$, $-\text{HN-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $-\text{HN-(CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_3\text{-NH-CO-(CH}_2)_2\text{-CO-}$, $-\text{HN-(CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $-\text{HN-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-NH-CO-(CH}_2)_2\text{-CO-}$, $-\text{HN-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $-\text{HN-(CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $-\text{HN-(CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ или $-\text{HN-(CH}_2)_4\text{-O-(CH}_2)_4\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; предпочтительно I представляет собой $-\text{HN-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; или I' представляет собой $-\text{HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{20}\text{-CH}_2\text{-CO-}$, $-\text{HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{22}\text{-CH}_2\text{-CO-}$, $-\text{HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{24}\text{-CH}_2\text{-CO-}$ или $-\text{HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{15}\text{-CH}_2\text{-CO-}$; и/или

II представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей γGlu , αGlu , βAsp , αAsp , $\gamma\text{-D-Glu}$, $\alpha\text{-D-Glu}$, $\beta\text{-D-Asp}$ и $\alpha\text{-D-Asp}$; предпочтительно II выбран из γGlu и βAsp ; и/или

III представляет собой $\text{HOOC-(CH}_2)_{18}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{19}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{20}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{21}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{22}\text{-CO-}$ или $\text{HOOC-(CH}_2)_{24}\text{-CO-}$; предпочтительно III представляет собой $\text{HOOC-(CH}_2)_{18}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{19}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{20}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{21}\text{-CO-}$ или $\text{HOOC-(CH}_2)_{22}\text{-CO-}$; предпочтительно III представляет собой $\text{HOOC-(CH}_2)_{18}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{20}\text{-CO-}$ или $\text{HOOC-(CH}_2)_{22}\text{-CO-}$.

В некоторых вариантах осуществления изобретения формула (A) связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через C-концевую часть I, или формула (A') связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через C-концевую часть I'.

В некоторых вариантах осуществления ацильная группа связана с ϵ -аминогруппой остатка лизина исходного инсулина.

В некоторых вариантах осуществления остаток лизина исходного инсулина находится в положении B29.

В некоторых вариантах осуществления изобретения исходный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин desB30 (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, представляющие A-цепь и B-цепь соответственно); человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30 (SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, представляющие A-цепь и B-цепь соответственно); человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, desB30 (SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, представляющие A-цепь и B-цепь соответственно); человеческий инсулин (SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, представляющие A-цепь и B-цепь соответственно); человеческий инсулин A21G (SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, представляющие A-цепь и B-цепь

соответственно); человеческий инсулин A21G, desB30 (SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, представляющие А-цепь и В-цепь соответственно); и человеческий инсулин B28D (SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, представляющие А-цепь и В-цепь соответственно); предпочтительно исходный инсулин представляет собой человеческий инсулин desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30; или человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, desB30.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ацилированный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-11×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-12×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-12×OEG-γGlu-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-11×OEG-γGlu-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-βAsp-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-βAsp-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-αGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-αGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αAsp-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αAsp-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-13×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-14×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-14×OEG-γGlu-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-13×OEG-γGlu-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-βAsp-13×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-βAsp-14×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-13×OEG),

[illegible]

[illegible]

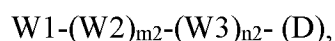
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; человеческий инсулин and A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-24×OEG), desB30.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ацилированный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-

17×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-19×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-19×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-20×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-20×OEG), desB30; человеческий инсулин and A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-24×OEG), desB30.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ацилированный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16 E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16 E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; и человеческий инсулин A14E, B16 E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является производное инсулина, которое представляет собой ацилированный инсулин, где исходный инсулин ацилированного инсулина представляет собой человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30 или человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, desB30, а ацильная группа ацилированного инсулина связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина, причем ацильная группа представлена формулой (D):



где:

m_2 равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и n_2 равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20;

W3 представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

W2 представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

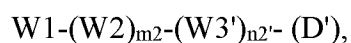
W1 представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

W1, W2 и W3 соединены амидными связями; и

порядок расположения W2 и W3, представленных в формуле (D), может быть изменен независимым образом;

или

ацильная группы представлена формулой (D'):



где:

m_2 равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и n_2' является целым числом;

W3' представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

W2 представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

W1 представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

W1, W2 и W3' соединены амидными связями;

порядок расположения W2 и W3, представленных в формуле (D'), может быть изменен независимым образом; и

общее количество атомов углерода в $(W3')_{n_2'}$ составляет 30–180, предпочтительно 42–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120.

В некоторых вариантах осуществления изобретения n_2 равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19; предпочтительно n_2 равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18; предпочтительно, n_2 равно 11, 12, 13, 14, 15 или 16; предпочтительно n_2 равно 11, 12, 13, 14 или 15; и/или

m_2 является целым числом от 1 до 6; предпочтительно m_2 равно 1, 2, 3 или 4; предпочтительно m_2 равно 1 или 2; предпочтительно m_2 равно 1; и/или

W1 представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–23 атома углерода; предпочтительно W1 представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20, 21 или 22 атома углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения W3 представляет собой: $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ или $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$; предпочтительно W3 представляет собой $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$; или W3' представляет собой $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{20}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{22}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{24}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ или $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{15}-\text{CH}_2-\text{CO}-$; и/или

W2 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей γGlu , αGlu , βAsp , αAsp , $\gamma\text{-D-Glu}$, $\alpha\text{-D-Glu}$, $\beta\text{-D-Asp}$ и $\alpha\text{-D-Asp}$; предпочтительно W2 выбран из γGlu и βAsp ; и/или

W1 представляет собой $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{19}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{21}-\text{CO}-$ или $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CO}-$; предпочтительно W1 представляет собой $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CO}-$ или $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CO}-$.

В некоторых вариантах осуществления изобретения формула (D) связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через C-концевую часть W3, или формула (D') связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через C-концевую часть W3'.

В некоторых вариантах осуществления ацильная группа связана с ϵ -аминогруппой остатка лизина исходного инсулина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ацилированный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил-

γ Glu-12 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-12 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-11 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-11 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-генэйкозандиоил- γ Glu-12 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-tricosanedioyl- γ Glu-12 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-тетракозандиоил- γ Glu-12 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-13 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-14 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-15 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-13 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-14 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-15 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин and A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-18 $\times$ OEG), desB30.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая производное инсулина, по настоящему изобретению, описанная выше, и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере 1,5 моль ионов цинка/6 моль ацилированного инсулина; предпочтительно по меньшей мере 2,2 моль ионов цинка/6 моль ацилированного инсулина; предпочтительно по меньшей мере 3,5 моль ионов цинка/6 моль производных ацилированного инсулина; предпочтительно по меньшей мере 4,5 моль ионов цинка/6 моль ацилированного инсулина; предпочтительно 2,2–12 моль ионов цинка/6 моль ацилированного инсулина; более предпочтительно 4,5–10 моль ионов цинка/6 моль ацилированного инсулина; более предпочтительно 4,5–8 моль ионов цинка/6 моль ацилированного инсулина; более предпочтительно 4,5–7,5 моль ионов цинка/6 моль ацилированного инсулина; более предпочтительно 4,5–7,0 моль ионов цинка/6 моль ацилированного инсулина; или более предпочтительно 4,5–6,5 моль ионов цинка/6 моль ацилированного инсулина; и/или

фармацевтическая композиция имеет pH в диапазоне от 6,5 до 8,5; предпочтительно pH составляет 6,8–8,2; предпочтительно pH составляет 7,0–8,2; предпочтительно pH

составляет 7,2–7,6; более предпочтительно рН составляет 7,4 или 7,6.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит глицерин, фенол, *m*-крезол, NaCl и/или Na₂HPO₄; предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит глицерин, фенол и NaCl; предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит глицерин, фенол, *m*-крезол и NaCl; предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит глицерин, фенол, NaCl и Na₂HPO₄; более предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит глицерин, фенол, *m*-крезол, NaCl и Na₂HPO₄.

В некоторых вариантах осуществления содержание глицерина составляет не более примерно 2,5% (масс./масс.), предпочтительно не более примерно 2% (масс./масс.), предпочтительно от примерно 0,3% до примерно 2% (масс./масс.), предпочтительно от примерно 0,5% до примерно 1,8% (масс./масс.), предпочтительно от примерно 0,7% до примерно 1,8% (масс./масс.) или более предпочтительно от примерно 1% до примерно 1,8% (масс./масс.); и/или

содержание фенола составляет примерно 16–80 мМ, предпочтительно примерно 25–75 мМ, предпочтительно примерно 30–70 мМ, предпочтительно примерно 45–70 мМ, предпочтительно примерно 45–65 мМ, предпочтительно примерно 45 мМ, примерно 46 мМ, примерно 47 мМ, примерно 48 мМ, примерно 49 мМ, примерно 50 мМ, примерно 51 мМ, примерно 52 мМ, примерно 53 мМ, примерно 54 мМ, примерно 55 мМ, примерно 56 мМ, примерно 57 мМ, примерно 58 мМ, примерно 59 мМ, примерно 60 мМ, примерно 61 мМ, примерно 62 мМ, примерно 63 мМ, примерно 64 мМ или примерно 65 мМ; и/или

содержание *m*-крезола составляет примерно 0–35 мМ, предпочтительно примерно 0–19 мМ, более предпочтительно примерно 0–15 мМ, наиболее предпочтительно примерно 0 мМ, примерно 1 мМ, примерно 2 мМ, примерно 3 мМ, примерно 4 мМ, примерно 5 мМ, примерно 6 мМ, примерно 7 мМ, примерно 8 мМ, примерно 9 мМ, примерно 10 мМ, примерно 11 мМ, примерно 12 мМ, примерно 13 мМ, примерно 14 мМ или примерно 15 мМ; и/или

содержание NaCl составляет примерно 0–150 мМ, предпочтительно примерно 5–120 мМ, предпочтительно примерно 10–120 мМ, предпочтительно примерно 10–100 мМ, более предпочтительно примерно 10–75 мМ, более предпочтительно примерно 10–50 мМ, более предпочтительно примерно 10–30 мМ; и/или

содержание Na₂HPO₄ составляет примерно 0–75 мМ, предпочтительно примерно 5–60 мМ,

предпочтительно менее примерно 50 мМ, более предпочтительно менее примерно 25 мМ или, более предпочтительно менее примерно 15 мМ; и/или

содержание ацилированного инсулина составляет более примерно 0,3 мМ, предпочтительно более примерно 0,6 мМ, предпочтительно примерно 0,3–12 мМ, предпочтительно примерно 0,6–9,0 мМ, предпочтительно примерно 0,6–8,4 мМ, предпочтительно примерно 0,6–7,2 мМ, предпочтительно примерно 0,6–6,0 мМ, предпочтительно примерно 0,6–4,2 мМ, предпочтительно примерно 0,6–3,6 мМ, предпочтительно примерно 0,6–3,0 мМ, предпочтительно примерно 0,6–2,4 мМ, предпочтительно примерно 0,6–2,1 мМ, предпочтительно примерно 0,6–1,2 мМ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; где предпочтительно ацилированный инсулин представляет собой человеческий инсулин A14E, B16H, B25H,

B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая примерно 0,6–4,2 мМ производного инсулина по настоящему изобретению, описанная выше, от примерно 1% до примерно 1,8% (масс./масс.) глицерина, примерно 45–65 мМ фенола, примерно 4,5–6,5 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина, примерно 10–120 мМ хлорида натрия и примерно 0–15 мМ *m*-крезола и имеющая рН примерно 7,0–8,2, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая от примерно 0,6 до примерно 1,2 мМ производного инсулина по настоящему изобретению, описанная выше, 1,7% (масс./масс.) глицерина, примерно 45 мМ фенола, примерно 10 мМ *m*-крезола, примерно 6,5 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина, примерно 20 мМ хлорида натрия и имеющая рН примерно 7,0–8,0, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая примерно 0,6–4,2 мМ производного инсулина по настоящему изобретению, описанная выше, от примерно 1% до примерно 2% (предпочтительно примерно 1,5–1,7%) (масс./масс.) глицерина, примерно 15–60 мМ (предпочтительно примерно 30–60 мМ; более предпочтительно примерно 45–60 мМ) фенола, примерно 0–25

мМ (предпочтительно примерно 0–10 мМ) *m*-крезола, примерно 1,5–7,0 (предпочтительно примерно 2,2–4,5) моль ионов цинка/6 моль производного инсулина, примерно 10–120 мМ (предпочтительно примерно 20–50 мМ) хлорида натрия и имеющая рН примерно 7,0–8,2, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая примерно 1,2–1,5 мМ производного инсулина по настоящему изобретению, описанная выше, примерно 1,5–1,7% (масс./масс.) глицерина, примерно 45–60 мМ фенола, примерно 0–10 мМ *m*-крезола, примерно 2,2–2,5 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина и примерно 20 мМ хлорида натрия и имеющая рН примерно 7,0–8,0, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, описанная выше, дополнительно содержит инсулинотропное соединение GLP-1, причем предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит инсулинотропное соединение GLP-1, выбранное из группы, включающей пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37)}$, пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$, пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино]этоксид)этоксид)ацетил][Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$ и пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8,$

Arg34]GLP-1-(7-37).

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, описанная выше, дополнительно содержит инсулинотропное вещество GLP-1, представленное формулой (B), или его фармацевтически приемлемую соль, амид или сложный эфир:

$[Acy-(L1)_r-(L2)_q]-G1$ (B),

где G1 является аналогом GLP-1, несущим Arg и Ala или Gly, соответственно, в положении 34 и в положении 8, соответственно, GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 15), и $[Acy-(L1)_r-(L2)_q]$ является заместителем, присоединенным к ε-аминогруппе остатка Lys в положении 26 аналога GLP-1, где

r — целое число от 1 до 10, а q равно 0 или представляет собой целое число от 1 до 10;

Acy представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

L1 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей γGlu, αGlu, βAsp, αAsp, γ-D-Glu, α-D-Glu, β-D-Asp и α-D-Asp;

L2 представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

Acy, L1 и L2 соединены амидными связями; и

порядок расположения L1 и L2, представленный в формуле (B), может быть изменен независимым образом.

В некоторых вариантах осуществления G1 представляет собой пептид [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37), пептид (SEQ ID NO: 16) или пептид [Arg34]GLP-1-(7-37) (SEQ ID NO: 17), и предпочтительно представляет собой пептид [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37); и/или

r равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6; предпочтительно r равно 1, 2, 3 или 4; предпочтительно r равно 1 или 2; предпочтительно r равно 1; и/или

q равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; предпочтительно q равно 0, 1, 2, 3 или 4; более предпочтительно, q равно 0, 1 или 2; и/или

Acy представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–23 атома углерода, и предпочтительно Acy представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20, 21 или 22 атома углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа.

Асу представляет собой $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{19}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{21}-\text{CO}-$ или $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CO}-$; предпочтительно Асу представляет собой $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CO}-$ или $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CO}-$.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Асу, L1 и L2 в формуле (B) последовательно соединены амидными связями, и С-конец L2 связан с ϵ -аминогруппой остатка Lys в положении 26 аналога GLP-1.

В некоторых вариантах осуществления инсулиотропное вещество GLP-1 выбрано из группы, включающей

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-карбоксинонадеканоиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноиламино]этокс)этокс)ацетиламино]этокс)этокс)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[19-карбоксинадеканоиламино]-4(*S*)-карбоксибутаноиламино)этокси)этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноиламино]этокс)этокс)ацетиламино)этокс)этокс)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[21-карбоксигенэйкозаноиламино]-4(*S*)-карбоксибутаноиламино)этокси)этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(23-карбокситрикозаноиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноиламино]этокс)этокс]ацетиламино)этокс]этокс)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[23-карбокситрикозаноиламино]-4(S)-карбоксибутаноиламино)этокси]этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N - ϵ^{26} -(23-карбокситрикозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N - ϵ^{26} -(19-карбоксихонадеканоиламино)-4(S)-карбокситетаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид *N*-ε²⁶-(21-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-карбоксинадеканамино)-4(*S*)-карбоксибутаноиламино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[19-карбоксинадеканоиламино]-4(*S*)-карбоксибутаноиламино)этокси)этокси)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноиламино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[21-карбоксигенэйкозаноиламино]-4(*S*)-карбоксибутаноиламино)этокси)этокси)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(4-(23-карбокситрикозаноиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноиламино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[23-карбокситрикозаноиламино]-4(*S*)-карбоксибутаноиламино)этокси)этокси)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N - ϵ^{26} -(23-карбокситрикозаноиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-(19-карбоксихинадеканамино)-4(*S*)-карбоксивутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N - ϵ^{26} -(21-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[4\text{-}(20\text{-карбоксиийкозаноиламино})\text{-}4(S)\text{-карбоксібутааноиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетил}][\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(4\text{-}[20\text{-карбоксиийкозаноиламино})\text{-}4(S)\text{-карбоксібутааноиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетил}][\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[4\text{-}(22\text{-карбоксидокозаноиламино})\text{-}4(S)\text{-карбоксібутааноиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетил}][\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(4\text{-}[22\text{-карбоксидокозаноиламино})\text{-}4(S)\text{-карбоксібутааноиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетил}][\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(}20\text{-карбоксиийкозаноиламино)-}4(S)\text{-карбоксібутааноил-}[\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(}22\text{-карбоксидокозаноиламино)-}4(S)\text{-карбоксібутааноил-}[\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[4\text{-}(20\text{-карбоксиийкозаноиламино})\text{-}4(S)\text{-карбоксібутааноиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетил}][\text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(4\text{-}[20\text{-карбоксиийкозаноиламино})\text{-}4(S)\text{-карбоксібутааноиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетил}][\text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[4\text{-}(22\text{-карбоксидокозаноиламино})\text{-}4(S)\text{-карбоксібутааноиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетил}][\text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(4\text{-}[22\text{-карбоксидокозаноиламино})\text{-}4(S)\text{-карбоксібутааноиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетил}][\text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(}20\text{-карбоксиийкозаноиламино)-}4(S)\text{-карбоксібутааноил-}[\text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

и

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(}22\text{-карбоксидокозаноиламино)-}4(S)\text{-карбоксібутааноил-}[\text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)}.$

В некоторых вариантах осуществления инсулиотропное вещество GLP-1 выбрано из группы, включающей

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-}[4\text{-}(19\text{-карбоксиинадеканоиламино})\text{-}4(S)\text{-карбоксібутааноиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетиламино})\text{этоксис})\text{этоксис})\text{ацетил}][\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)},$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}4\text{-[}19\text{-карбоксихексаноиламино)]-4(S)\text{-карбоксибутаноиламино)этоксизэтоксизацетил}}\text{]}\text{[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(19-карбоксихексаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(19-карбоксихексаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}4\text{-(21-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино)этоксизэтоксизацетиламино)этоксизэтоксизацетил}}\text{]}\text{[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$, и

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}4\text{-[}21\text{-карбоксигенэйкозаноиламино)]-4(S)\text{-карбоксибутаноиламино)этоксизэтоксизацетил}}\text{]}\text{[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$;

предпочтительно инсулинотропное вещество GLP-1 представляет собой:

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}4\text{-[}19\text{-карбоксихексаноиламино)]-4(S)\text{-карбоксибутаноиламино)этоксизэтоксизацетил}}\text{]}\text{[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$ или пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}4\text{-(21-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино)этоксизэтоксизацетиламино)этоксизэтоксизацетил}}\text{]}\text{[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, описанная выше, дополнительно содержит инсулин быстрого действия.

В некоторых вариантах осуществления инсулин быстрого действия представляет собой один или более выбранных из группы, включающей человеческий инсулин Asp^{B28}, человеческий инсулин Lys^{B28}Pro^{B29}, человеческий инсулин Lys^{B3}Glu^{B29}, человеческий инсулин и человеческий инсулин desB30; предпочтительно инсулин быстрого действия представляет собой человеческий инсулин Asp^{B28}, человеческий инсулин Lys^{B28}Pro^{B29}, человеческий инсулин Lys^{B3}Glu^{B29}, человеческий инсулин или человеческий инсулин desB30.

Авторы изобретения неожиданно для себя обнаружили, что фармацевтическая композиция или комбинированный препарат производного инсулина (например, ацилированного инсулина), описанные в первом аспекте настоящего изобретения, и инсулинотропное соединение GLP-1 не влияют негативным образом на физическую стабильность ацилированного инсулина; напротив, комбинированный препарат по своей физической

стабильности превосходит препарат, включающий только один компонент. Физическая стабильность комбинированного препарата настоящего изобретения, заметно выше, чем у комбинированных препаратов, содержащих другие производные инсулина длительного действия (например, инсулина деглудек и лираглутид). Также установлено, что химическая стабильность ацилированного инсулина в составе комбинированного препарата выше, чем в препарате, содержащем только один компонент.

В другом аспекте производное инсулина или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, раскрытые выше, используются в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте производное инсулина или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, раскрытые выше, используются в качестве лекарственного средства для лечения или профилактики сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе.

В другом аспекте производное инсулина или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, раскрытые выше, используются при лечении или профилактике сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является использование производного инсулина или использование фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем документе, для получения лекарственного средства; предпочтительно лекарственное средство используется для лечения или профилактики сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лекарственное средство применяют для лечения сахарного диабета; производное инсулина вводят одному и тому же пациенту один раз в два дня или с меньшей частотой, и, в среднем, производное инсулина не вводят одному и тому же пациенту с большей частотой в течение периода времени по меньшей мере 1 месяц, 6 месяцев или 1 год.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лекарственное средство применяется для лечения сахарного диабета; производное инсулина вводят два раза в неделю или с меньшей частотой, и, в среднем ацилированный инсулин инсулина не вводят одному и тому же пациенту с более высокой частотой в течение периода длительностью по меньшей мере 1 месяц, 6 месяцев или 1 год.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лекарственное средство применяется для лечения сахарного диабета; производное инсулина вводят один раз в неделю или с

меньшей частотой, и, в среднем ацилированный инсулин инсулина не вводят одному и тому же пациенту с более высокой частотой в течение периода длительностью по меньшей мере 1 месяц, 6 месяцев или 1 год.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является способ лечения или профилактики сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе, включающий введение терапевтически эффективного количества производного инсулина или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, описанных выше.

Авторы изобретения неожиданно для себя обнаружили, что производное инсулина (например, ацилированный инсулин) по настоящему изобретению имеет длительный профиль фармакокинетики (далее — ФК), что делает возможным проведение подкожных инъекций у пациентов с сахарным диабетом два раза в неделю, один раз в неделю или с меньшей частотой.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является способ увеличения способности производного инсулина связываться с рецептором инсулина в присутствии альбумина, который включает:

присоединение альбумин-связывающего остатка к природному инсулину или аналогу инсулина посредством линкера Lin для получения производного инсулина, где линкер Lin представляет собой гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 40, предпочтительно по меньшей мере 50, предпочтительно по меньшей мере 65, предпочтительно 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180 или предпочтительно 72–120 атомов углерода; альбумин-связывающий остаток содержит 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток содержит линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты или одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа; или модифицирован природный инсулин или аналог инсулина с формулой (A) или формулой (A') для получения производного инсулина,

(A) представляет собой $\text{III}-(\text{II})_m-(\text{I})_n$ - (A), где

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и n является целым числом от 11 до 30, предпочтительно n равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20;

I представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

III представляет собой альбумин-связывающий остаток, содержащий линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I, представленных в формуле (A), может быть изменен независимым образом;

(A') представляет собой $\text{III}-(\text{II})_m-(\text{I}')_n$ - (A'),

где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и n' является целым числом;

I' представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

III представляет собой альбумин-связывающий остаток, содержащий линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I' соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I', представленных в формуле (A'), может быть изменен независимым образом; и

общее количество атомов углерода в $(I')_n$ составляет 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 42–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является способ повышения активности производного инсулина, который включает:

присоединение альбумин-связывающего остатка к природному инсулину или аналогу инсулина посредством линкера Lin для получения производного инсулина, где линкер Lin представляет собой гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 40, предпочтительно по меньшей мере 50, предпочтительно по меньшей мере 65, предпочтительно 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180 или предпочтительно 72–120 атомов углерода; альбумин-связывающий остаток содержит 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток содержит линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты или одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа; или модифицирован природный инсулин или аналог инсулина с формулой (A) или формулой (A') для получения производного инсулина,

(A) представляет собой $III-(II)_m-(I)_n$ (A), где

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и n является целым числом от 11 до 30, предпочтительно n равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20;

I представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

III представляет собой альбумин-связывающий остаток, содержащий линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной

группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I, представленных в формуле (A), может быть изменен независимым образом;

(A') представляет собой $\text{III}-(\text{II})_m-(\text{I}')_n$ (A'),

где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и n' является целым числом;

I' представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

III представляет собой альбумин-связывающий остаток, содержащий линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I' соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I', представленных в формуле (A'), может быть изменен независимым образом; и

общее количество атомов углерода в $(\text{I}')_n$ составляет 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 42–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120.

В некоторых вариантах осуществления природный инсулин или аналог инсулина содержит по меньшей мере один остаток лизина, и линкер Lin, формула (A) или формула (A') связаны с аминокислотной группой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения n равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18; предпочтительно n равно 11, 12, 13, 14, 15 или 16; предпочтительно n равно 11, 12, 13, 14 или 15; и/или

m является целым числом от 1 до 6; предпочтительно m равно 1, 2, 3 или 4; предпочтительно

m равно 1 или 2; предпочтительно m равно 1; и/или

III представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–23) атомов углерода, и предпочтительно III представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20, 21 или 22 атома углерода, причем, формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа; и/или исходный инсулин содержит один остаток лизина.

В некоторых вариантах осуществления I представляет собой: $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ или $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$; предпочтительно I представляет собой $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$; или I представляет собой $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{20}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{22}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{24}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ или $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{15}-\text{CH}_2-\text{CO}-$; и/или

II представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей γGlu , αGlu , βAsp , αAsp , $\gamma\text{-D-Glu}$, $\alpha\text{-D-Glu}$, $\beta\text{-D-Asp}$ и $\alpha\text{-D-Asp}$; предпочтительно II выбран из γGlu и βAsp ; и/или

III представляет собой $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{19}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{21}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CO}-$ или $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{24}-\text{CO}-$; предпочтительно III представляет собой $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CO}-$ или $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CO}-$.

В некоторых вариантах осуществления изобретения формула (A) связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка природного инсулина либо аналога инсулина через C-концевую часть I, или формула (A') связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка природного инсулина либо аналога инсулина через C-концевую часть I'.

В некоторых вариантах осуществления формула (A) или формула (A') связана с ϵ -аминогруппой остатка лизина исходного инсулина.

В некоторых вариантах осуществления остаток лизина природного инсулина или аналога инсулина находится в положении В29.

В некоторых вариантах осуществления природный инсулин или аналог инсулина выбран из группы, включающей человеческий инсулин desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, desB30; человеческий инсулин; человеческий инсулин A21G; человеческий инсулин A21G, desB30; и человеческий инсулин B28D; предпочтительно исходный инсулин представляет собой человеческий инсулин desB30 или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1a иллюстрирует гипогликемический эффект веществ из примера 1 и 2 по настоящему изобретению, инсулина деглудек и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 1b в связке с ФИГ. 1a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта веществ из примеров 1 и 2 в настоящем изобретении, инсулина деглудек и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 2a иллюстрирует гипогликемический эффект веществ из примеров 1 и 2 и вещества сравнительного примера 2 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 2b в связке с ФИГ. 2a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта веществ из примеров 1 и 2 и вещества из сравнительного примера 2 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 3a иллюстрирует гипогликемический эффект и длительность действия веществ из примеров 1–3 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 3b в связке с ФИГ. 3a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта веществ из примеров 1–3 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 4a иллюстрирует гипогликемический эффект веществ и длительность действия вещества из примера 2 и вещества сравнительного примера 3 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 4b в связке с ФИГ. 4a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта вещества из примера 2 и вещества из сравнительного примера 3 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 5a иллюстрирует гипогликемический эффект и длительность действия веществ из сравнительных примеров 3–4 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии

db/db.

ФИГ. 5b в связке с ФИГ. 5a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта веществ из сравнительных примеров 3–4 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 6a иллюстрирует гипогликемический эффект патентуемых веществ из сравнительного примера 5 и примеров 13 и 14 в настоящем изобретении и растворителя у крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 6b в связке с ФИГ. 6a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта патентуемых веществ из сравнительного примера 5 и примеров 13 и 14 в настоящем изобретении и растворителя у крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 7a иллюстрирует гипогликемический эффект вещества из примера 2, контрольного вещества 5 по настоящему изобретению и растворителя у самок крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 7b, которую следует рассматривать в связке с ФИГ. 7a, иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта, оказываемого веществами из примера 2, контрольным веществом 5 по настоящему изобретению и растворителем у самок крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 8a иллюстрирует способность вещества 15 и контрольного вещества 5 по настоящему изобретению связываться с рецептором инсулина в присутствии 2% ЧСА и в отсутствие ЧСА (0% ЧСА).

ФИГ. 8b иллюстрирует способность вещества 15 и контрольного вещества 5 по настоящему изобретению связываться с рецептором инсулина в присутствии 2% ЧСА и в отсутствие ЧСА (0% ЧСА).

ФИГ. 9 иллюстрирует способность вещества 17 и контрольного вещества 2 по настоящему изобретению связываться с рецептором инсулина в присутствии 2% ЧСА и в отсутствие ЧСА (0% ЧСА).

ФИГ. 10a иллюстрирует способность вещества 16, вещества 18 и контрольного вещества 5 по настоящему изобретению связываться с рецептором инсулина в присутствии 2% ЧСА и в отсутствие ЧСА (0% ЧСА).

ФИГ. 10b иллюстрирует способность вещества 16, вещества 18 и контрольного вещества 5 по настоящему изобретению связываться с рецептором инсулина в присутствии 2% ЧСА и в отсутствие ЧСА (0% ЧСА).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

В данном документе термин «инсулин» охватывает природные инсулины, такие как человеческий инсулин, а также аналоги инсулина и производные инсулина.

Термин «аналог инсулина» включает полипептид, имеющий молекулярную структуру, которая может быть формально получена из структуры природного инсулина (например, человеческого инсулина) путем делеции и/или замещения (замены) одного или более аминокислотных остатков, присутствующих в природном инсулине, и/или путем добавления одного или более аминокислотных остатков. Аминокислотные остатки для добавления и/или замещения могут быть кодируемыми аминокислотными остатками, или другими природными аминокислотными остатками, или чисто синтетическими аминокислотными остатками. Предпочтительно аминокислотные остатки для добавления и/или замещения являются кодируемыми аминокислотными остатками.

В данном документе термин «производное инсулина» относится к природному инсулину или аналогу инсулина, который был химически модифицирован, и модификация может заключаться, например, во введении боковой цепи в одно или более положений остова инсулина, окислении или восстановлении групп аминокислотных остатков инсулина, преобразовании свободной карбоксильной группы в сложноэфирную группу, или ацилировании свободной аминогруппы или гидроксильной группы. Ацилированные инсулины настоящего изобретения являются производными инсулина.

Термин «исходный инсулин» относится к инсулиновому фрагменту производного инсулина или ацилированного инсулина (также называемому в данном документе исходный инсулин) и, например, относится к фрагменту производного инсулина или ацилированного инсулина без связывающей боковой цепи или добавленной ацильной группы в настоящем изобретении. Исходный инсулин может быть природным инсулином, таким как человеческий или свиной инсулин. В другом аспекте исходный инсулин может быть аналогом инсулина.

В данном документе термин «аминокислотный остаток» охватывает аминокислоты, у которых атом водорода удален из аминогруппы и/или гидроксильная группа удалена из карбоксильной группы и/или атом водорода удален из меркаптогруппы. Неточно, остаток аминокислоты может быть назван аминокислотой.

Если не указано иное, все аминокислоты, упомянутые в настоящем документе, являются L-аминокислотами.

Термин «альбумин-связывающий остаток» относится к остатку, который способен нековалентно связываться с сывороточным альбумином человека. Альбумин-связывающие остатки, связанные с инсулином, обычно имеют аффинность связывания с человеческим сывороточным альбумином менее, например, примерно 10 мкМ или даже менее примерно 1 мкМ. Альбумин-связывающие свойства могут измерять методом поверхностного плазмонного резонанса, как описано в: J. Biol. Chem. 277(38), 35035–35042, (2002).

В данном случае «гидрофильный линкер» относится к линкеру, который содержит по меньшей мере 6 неводородных атомов, 30–50% из которых являются N или O, и отделяют исходный инсулин от альбумин-связывающего остатка.

«Липофильность» относится к способности группы растворяться в жирах, маслах, липидах и липофильных неполярных растворителях (таких как гексан или толуол). Липофильные группы, включая, помимо прочего, например, жиры, жирные кислоты или жирные дикислоты, обычно имеют «липидный хвост», и липидный хвост, присутствующий в этих липофильных группах, может быть насыщенным и ненасыщенным, в зависимости от того, включает ли липидный хвост двойную связь. Липидный хвост может также иметь различную длину, так хвост имеет 7–12 атомов углерода (например, C₇₋₁₂ алкил или C₇₋₁₂ алкенил), хвост имеет 13–22 атома углерода (например, C₁₃₋₂₂ алкил или C₁₃₋₂₂ алкенил) или хвост имеет 23–30 атомов углерода (например, C₂₃₋₃₀ алкил или C₂₃₋₃₀ алкенил).

В данном случае термин «алкиленгликоль» включает олиго- и полиалкиленгликолевые фрагменты и моноалкиленгликолевые фрагменты. Моноалкиленгликоли и полиалкиленгликоли включают, например, цепи на основе моноэтилен- и полиэтиленгликолей, монопропилен- и полипропиленгликолей, монотетраметилен- и политетраметиленгликолей, т. е. цепи на основе повторяющейся единицы -CH₂CH₂O-, -CH₂CH₂CH₂O- или -CH₂CH₂CH₂CH₂O-. Алкиленгликолевая группа может быть монодисперсной (с четко определенной длиной/молекулярной массой) и полидисперсной (с менее четко определенной длиной/средней молекулярной массой). Моноалкиленгликолевая группа на каждом конце включает -OCH₂CH₂O-, -OCH₂CH₂CH₂O- или -OCH₂CH₂CH₂CH₂O- содержащие различные группы.

Термин «жирная кислота» включает линейные или разветвленные жирные карбоновые кислоты, имеющие по меньшей мере два атома углерода и являющиеся насыщенными или

ненасыщенными. Неограничивающими примерами жирных кислот являются, например, миристиновая кислота, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота и эйкозановая кислота.

В данном документе термин «жирная дикислота» включает линейные или разветвленные жирные дикислоты, имеющие по меньшей мере два атома углерода и являющиеся насыщенными или ненасыщенными. Неограничивающими примерами жирных дикислот являются гександиовая кислота, октандиовая кислота, декандиовая кислота, додекандиовая кислота, тетрадекандиовая кислота, гексадекандиовая кислота, гептадекандиовая кислота, октадекандиовая кислота, эйкозандиовая кислота, докозандиовая кислота и тетракозандиовая кислота.

Как используется в настоящем документе, инсулины быстрого действия включают природные инсулины, аналоги инсулина и производные инсулина быстрого действия. Инсулин быстрого действия обычно начинает действовать в течение, например, от 1 до 20 минут, достигает максимума примерно через час и продолжает действовать в течение трех-пяти часов.

Термин «базальный инсулин» относится к инсулину, имеющему более длительное действие, чем обычный или нормальный человеческий инсулин.

В данном документе термин «химическая стабильность» означает, что производные инсулина, раскрытые в настоящем изобретении, химически достаточно стабильны в желаемом препарате. А именно, продукты химической деградации образуются лишь в таком количестве, которое не ухудшает срок годности готового лекарственного препарата. Продукты химической деградации включают продукты дезамидирования, продукты образования сложного эфира изоаспарагиновой кислоты, образования димера, рацемизации, дегидратации и тому подобное. Химическая стабильность может быть определена анализом ВЭЖХ образцов или составов, выдержанных в условиях ускоренного старения.

Используемая в настоящем документе «способность связывания с рецептором инсулина» относится к взаимодействию между инсулином и рецептором инсулина, величина или сила которого могут измерять, например, поверхностным плазмонным резонансом (ППР). Например, при измерениях ППР, когда раствор, содержащий инсулин, протекает через чип, покрытый рецептором инсулина, возникающее взаимодействие между инсулином и рецептором инсулина вызывает изменение угла отклонения ППР, которое обычно

выражается в виде относительного значения отклика, и большее значение относительного отклика обычно указывает на более высокую способность связывания с рецептором инсулина.

Высокая физическая стабильность означает, что склонность к образованию фибрилл составляет менее 50% от таковой у человеческого инсулина. Образование фибрилл может быть описано временем задержки до начала образования фибрилл при заданных условиях. Полипептиды, имеющие аффинность к рецептору инсулина и рецептору IGF-1, представляют собой полипептиды, которые способны взаимодействовать с рецептором инсулина и рецептором IGF-1 человека в подходящем анализе связывания. Такие методы анализа рецепторов хорошо известны в данной области.

Используемый в данном документе «лекарственный эффект» или «активность» относится к способности лекарственного препарата или активного вещества приводить к определенной функции или эффекту (например, снижению уровня глюкозы в крови). Например, по сравнению с инсулином деглудек или другими существующими производными инсулина, введение той же дозы производного инсулина настоящего изобретения приведет к лучшему эффекту или функции снижения уровня глюкозы в крови. Термин «сахарный диабет» включает сахарный диабет I типа, сахарный диабет II типа, гестационный (возникающий во время беременности) диабет и другие патологические состояния, вызывающие гипергликемию. Этот термин используется для обозначения метаболических нарушений, при которых поджелудочная железа вырабатывает недостаточное количество инсулина или при которых клетки организма не реагируют должным образом на инсулин, тем самым не позволяя клеткам поглощать глюкозу. В результате в крови накапливается глюкоза.

Сахарный диабет I типа, также известный как инсулинозависимый сахарный диабет (ИЗСД) и ювенильный диабет, вызывается разрушением β -клеток и часто приводит к абсолютному дефициту инсулина. Сахарный диабет II типа, также известный как инсулиннезависимый сахарный диабет (ИНСД) и диабет взрослых, связан с серьезной резистентностью к инсулину и, следовательно, с серьезными дефектами секреции инсулина, характеризующимися относительным дефицитом инсулина и/или резистентностью к инсулину.

Используемый в настоящем документе термин «аналог GLP-1» или «аналог GLP-1» относится к пептиду или веществу, которое является вариантом человеческого

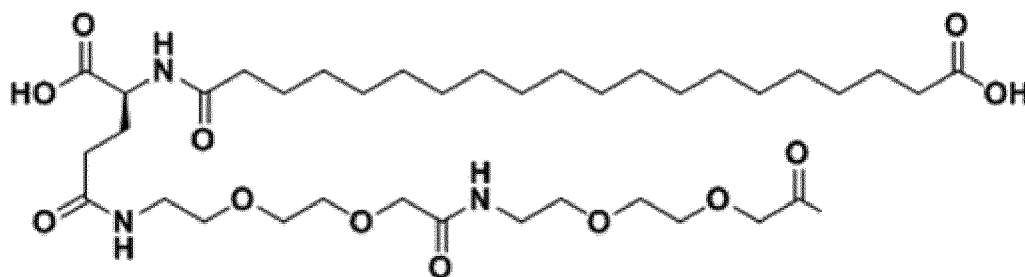
глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1(7-37)), где заменены один или более аминокислотных остатков GLP-1(7-37), и/или удалены один или более аминокислотных остатков, и/или добавлены один или более аминокислотных остатков. Конкретно, последовательность GLP-1(7-37) показана в SEQ ID NO: 15 в перечне последовательностей. Пептид с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 15, также может обозначаться как «природный» GLP-1 или «природный» GLP-1(7-37).

В перечне последовательностей первый аминокислотный остаток (His) в SEQ ID NO: 15 обозначается номером 1. Однако в дальнейшем описании, в соответствии с установившейся практикой в данной области, остаток гистидина обозначается номером 7, и следующие аминокислотные остатки нумеруются последовательно, заканчиваясь глицином под номером 37. Таким образом, в целом, исходя из нумерации аминокислотных остатков или положений, последовательность GLP-1(7-37), упомянутая в настоящем документе, представляет собой последовательность, начинающуюся с His в положении 7 и заканчивающуюся Gly в положении 37.

Пептид [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) представляет собой аналог GLP-1, имеющий Gly и Arg в положениях, соответствующих положению 8 и положению 34, соответственно, GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 15). Пептид [Arg34]GLP-1-(7-37) представляет собой аналог GLP-1, имеющий Arg в положении, соответствующему положению 34 GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 15). Конкретно, аминокислотные последовательности пептида [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) и пептида [Arg34]GLP-1-(7-37) показаны в SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17 в перечне последовательностей, соответственно.

В случае пептида GLP-1 или его аналога термин «производное», используемый в настоящем документе, относится к химически модифицированному пептиду GLP-1 или его аналогу, где один или более заместителей ковалентно связаны с пептидом. Заместители также могут называться боковыми цепями.

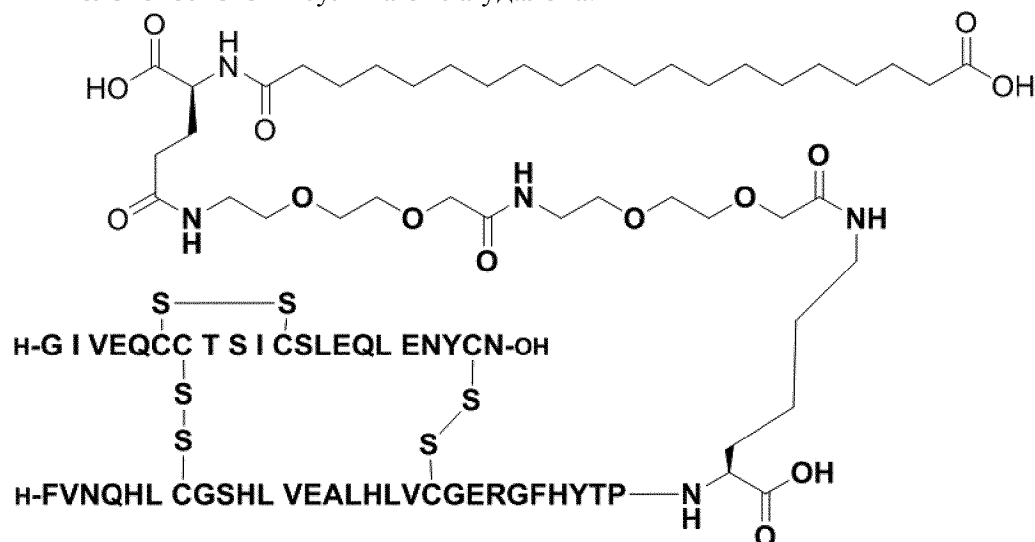
Используемое в настоящем документе наименование инсулина или веществ GLP-1 соответствует следующему принципу: названия даются в соответствии с мутациями и модификациями (например, ацилированием) относительно человеческого инсулина или мутациями и модификациями (например, ацилированием) природного GLP-1(7-37). Наименование ацильных фрагментов основано на номенклатуре ИЮПАК и, в других случаях, на номенклатуре пептидов. Например, следующая ацильная группа:



может называться, например, как «эйкозандиоил- γ Glu-OEG-OEG», «эйкозандиоил- γ Glu-2 $\times$ OEG» или «эйкозандиоил-gGlu-2 $\times$ OEG», или «19-карбоксихонадеканойл- γ Glu-OEG-OEG», где OEG представляет собой сокращение для группы $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CO}-$ (т. е., 2-[2-(2-аминоэтокс)этокс]ацетил) и γ Glu (или gGlu) представляет собой сокращение для аминокислоты γ -глутаминовой кислоты в L-конфигурации. Альтернативно ацильные фрагменты могут называться в соответствии с номенклатурой ИЮПАК (OpenEye, формат ИЮПАК). Согласно этой номенклатуре, указанный выше ацильная группа настоящего изобретения обозначается следующим названием: «[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-карбоксихонадеканойламино)-4(*S*)-карбоксибутаноиламино]этокс)этокс]ацетиламино)этокс]этокс]ацетил]» или «[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4*S*)-4-карбокси-4-(19-карбоксихонадеканойламино)бутаноил]-амино]-этокс]-этокс]ацетил]амино]этокс]этокс]ацетил]».

Например, инсулин из сравнительного примера 2 по настоящему изобретению (имеющий последовательность/структуру, приведенную ниже) обозначается как «человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-2 $\times$ OEG), desB30», «человеческий инсулин B29K(*N* ^{ϵ} -эйкозандиоил- γ Glu-2 $\times$ OEG), desB30» или «человеческий инсулин B29K(*N* ^{ϵ} -эйкозандиоил-gGlu-2 $\times$ OEG), desB30», что указывает на то, что аминокислота К в положении В29 человеческого инсулина была модифицирована путем ацилирования остатком эйкозандиоил-gGlu-2 $\times$ OEG по ϵ -азоту (обозначаемому как *N* ^{ϵ} или (*N*(ϵ)) остатка лизина в положении В29, а аминокислота Т в положении В30 человеческого инсулина была удалена. В соответствии с другим примером, инсулин из сравнительного примера 5 (имеющий последовательность/структуру, приведенную ниже) обозначается как «человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N* ^{ϵ} -эйкозандиоил-gGlu-2 $\times$ OEG), desB30» или «человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-2 $\times$ OEG), desB30», что указывает на то, что аминокислота Y в положении A14 человеческого инсулина была изменена на E, аминокислота Y в положении B16 человеческого инсулина была изменена на H, аминокислота F в положении B25 человеческого инсулина была

изменена на Н, аминокислота К в положении В29 человеческого инсулина была модифицирована путем ацилирования остатком эйкозандиоил-gGlu-2×OEG по ε-азоту (обозначаемому как N^ε) остатка лизина в положении В29, а аминокислота Т в положении В30 человеческого инсулина была удалена.



Используемый в данном документе «n×PEG» относится к группе $\text{-NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CO-}$, где n представляет собой целое число. Например, «20×PEG» относится к группе $\text{-NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}\text{CH}_2\text{CO-}$.

Инсулин представляет собой полипептидный гормон, секретируемый β-клетками поджелудочной железы и состоящий из двух полипептидных цепей, а именно А-цепи и В-цепи, соединенных двумя межцепочечными дисульфидными связями. Кроме того, А-цепь характеризуется наличием внутрицепочечной дисульфидной связи.

Существует три основных способа получения человеческого инсулина в микроорганизмах. В двух из этих способов используют *E.coli*, в одном — путем экспрессии слитых белков в цитоплазме (Frank et al. (1981) в Peptides: Proceedings of the 7th American Peptide Chemistry Symposium (Rich & Gross, eds.), Pierce Chemical Co., Rockford, Ill, pp. 729–739), а в другом — путем обеспечения секреции сигнального пептида в периплазматическое пространство (Chan et al. (1981) *PNAS* 78:5401–5404). В третьем способе используют обеспечение секреции предшественника инсулина в среду с помощью *Saccharomyces cerevisiae* (Thim et al. (1986) *PNAS* 83:6766–6770). В известном уровне техники был описан ряд способов экспрессии предшественников инсулина в *E.coli* или *Saccharomyces cerevisiae*. См., например, патент США № 5,962,267, WO95/16708, EP0055945, EP0163529, EP0347845 и EP0741188.

Конструирование вектора, экспрессия, процессинг и очистка аналога инсулина могут

выполнять с использованием методик, хорошо известных специалистам в данной области. Например, аналог инсулина могут получать путем экспрессии последовательности ДНК, кодирующей интересующий аналог инсулина, в подходящей клетке-хозяине с помощью хорошо известных методик, раскрытых в патенте США № 6500645. Например, аналоги инсулина также могут получать методами, о которых сообщается в следующей статье: Glendorf T, Sørensen AR, Nishimura E, Pettersson I, & Kjeldsen T: Importance of the Solvent-Exposed Residues of the Insulin B Chain α -Helix for Receptor Binding; *Biochemistry*, 2008, 47:4743–4751. В данной статье мутации вводят в инсулин-кодирующий вектор с использованием ПЦР с перекрыванием-удлинением. Аналоги инсулина экспрессируются в *Saccharomyces cerevisiae*, штамм MT663, в виде проинсулинподобных белков слияния с Ala-Ala-Lys мини C-пептидом. Одноцепочечные предшественники ферментативно превращаются в двухцепочечные аналоги desB30 с использованием эндопротеазы *A. lyticus*. Выделенные аналоги инсулина могут быть ацилированы в требуемом положении с использованием методов ацилирования, хорошо известных специалистам в данной области; примеры таких аналогов инсулина описаны, например, в китайских заявках на патент с номерами CN1029977C, CN1043719A и CN1148984A.

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды аналогов инсулина, могут получать синтетическим путем с помощью установленных стандартных методов, например, методом, описанным в Beaucage et al. (1981) *Tetrahedron Letters* 22:1859–1869 или Matthes et al. (1984) *EMBO Journal* 3:801–805.

Термин «вспомогательное вещество», в широком понимании, относится к любому ингредиенту, отличному от активного терапевтического ингредиента. В качестве вспомогательного вещества могут выступать инертные вещества, неактивные вещества и/или нефармацевтически активные вещества.

Вспомогательное вещество могут использовать в различных целях, например в качестве носителей, растворителей, разбавителей, вспомогательных агентов, требуемых для изготовления таблеток, и/или для улучшения введения и/или всасывания действующих веществ, в зависимости от фармацевтической композиции. Примеры вспомогательных веществ включают, помимо прочего, разбавители, буферы, консерванты, модификаторы тоничности (также известные как агенты обеспечения тоничности или изотонические агенты), хелатирующие агенты, поверхностно-активные вещества, ингибиторы протеаз, смачивающие агенты, эмульгаторы, антиоксиданты, наполнители, ионы металлов,

масляные растворители, белки и/или цвиттерионы, и стабилизаторы.

Фармацевтические композиции из фармацевтически активных ингредиентов и различных вспомогательных веществ, хорошо известны в данной области; см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 19-е изд. (1995) и более поздние редакции). Для удобства пациента предполагается, что временные интервалы (временные промежутки) от введения ацилированного инсулина настоящего изобретения до следующего введения ацилированного инсулина настоящего изобретения предпочтительно для пациента имеют одинаковую длительность или приблизительно одинаковую длительность в днях. Можно даже ожидать, что пациент предпочтет, чтобы введение ацилированного инсулина происходило раз в неделю, т. е. в один и тот же день недели, например каждое воскресенье. Это означает, что ацилированный инсулин вводят в среднем в течение периода времени 1 месяц, 6 месяцев или 1 год каждые 6 дней, но не с большей частотой. Для некоторых пациентов, может быть желательно вводить ацилированный инсулин в среднем в течение периода времени 1 месяц, 6 месяцев или 1 год каждые 5 дней или приблизительно каждые 5 дней, но не с большей частотой. Для других пациентов, может быть желательно вводить ацилированный инсулин в среднем в течение периода времени 1 месяц, 6 месяцев или 1 год каждые 4 дня или приблизительно каждые 4 дня, но не с большей частотой. Для других пациентов, может быть желательно вводить ацилированный инсулин в среднем в течение периода времени 1 месяц, 6 месяцев или 1 год каждые 3 дня или приблизительно каждые 3 дня, но не с большей частотой. Другим пациентам может быть даже выгодно вводить ацилированный инсулин в среднем два раза в неделю в течение периода времени 1 месяц, 6 месяцев или 1 год, например, с интервалами примерно 3–4 дня между введениями. Для некоторых пациентов, может быть желательно вводить ацилированный инсулин в среднем в течение периода времени 1 месяц, 6 месяцев или 1 год каждые 2 дней или приблизительно каждые 2 дней, но не с большей частотой. Для других пациентов, может быть желательно вводить ацилированный инсулин в среднем в течение периода времени 1 месяц, 6 месяцев или 1 год каждый второй день или приблизительно один раз в два дня, но не с большей частотой. Для некоторых пациентов, может быть желательно вводить ацилированный инсулин в среднем в течение периода времени 1 месяц, 6 месяцев или 1 год каждые 7 дней или приблизительно каждые 7 дней, но не с большей частотой. Другие пациенты могут даже не вводить ацилированный инсулин с интервалами, точно такой же длительности времени (в днях) еженедельно, ежемесячно

или ежегодно. В среднем в течение периода времени 1 месяц, 6 месяцев или 1 год некоторые пациенты могут иногда вводить ацилированный инсулин с интервалами 5–7 дней, но не с большей частотой. В среднем в течение периода времени 1 месяц, 6 месяцев или 1 год другие пациенты могут иногда вводить ацилированный инсулин с интервалами 4–6 дней, но не с большей частотой. В среднем в течение периода времени 1 месяц, 6 месяцев или 1 год некоторые пациенты могут иногда вводить ацилированный инсулин с интервалами 3–7 дней, но не с большей частотой.

Заболевания и патологические состояния, являющиеся основными объектами настоящего изобретения, представляют собой сахарный диабет (I типа или II типа) или другие патологические состояния, характеризующиеся гипергликемией, но в основном метаболические заболевания и патологические состояния, при которых метаболическое действие инсулина имеет клиническое значение или преимущества, такие как преддиабет, нарушение толерантности к глюкозе, метаболический синдром, ожирение, кахексия, повреждение/гибель β -клеток *in vivo*, булимия и воспаление. Известно или считается, что все эти типы патологических состояний улучшаются у субъекта, страдающего данным заболеванием или патологическим состоянием, вследствие стабильного метаболического состояния. В любом случае, любая схема лечения, включающая введение инсулина, может быть изменена путем практической реализации идей настоящего изобретения; а именно, такая терапия будет включать введение инсулина с пролонгированной продолжительностью действия, представленного в настоящем документе.

Примеры

Следующие примеры приведены в качестве иллюстрации, но не ограничения.

В данном документе используются следующие сокращения:

OEG: аминокислотный остаток $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CO}-$;

OSu: сукцинимидил-1-илокси-2,5-диоксо-пирролидин-1-илокси;

OtBu: окси-*трет*-бутил;

HCl: хлороводород;

γ Glu или gGlu: γ L-глутамоил;

NHS: *N*-гидроксисукцинимид;

DCC: дициклогексилкарбодиимид;

AEEA: 2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)уксусная кислота;

ОН: гидроксил;

CH₃CN: ацетонитрил;

Gly: глицин;

Arg: аргинин;

ТФА: трифторуксусная кислота;

НbA1с: гликированный гемоглобин;

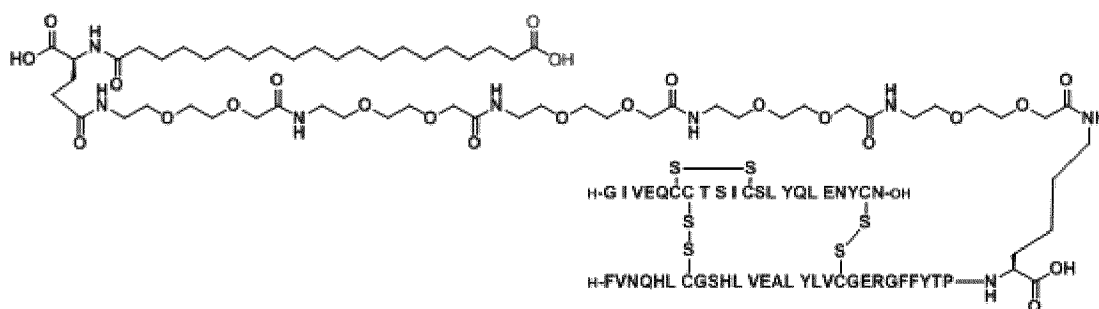
AUC: площадь под кривой «время — уровень глюкозы в крови»;

RU: единица отклика.

Следующие примеры и общие методы направлены на промежуточные вещества и конечные продукты, определенные в данном описании и схемах синтеза. Получение веществ настоящего изобретения подробно описано с использованием следующих примеров, но описанные химические реакции раскрыты с точки зрения их общей применимости для получения веществ, представленных данным изобретением. Иногда описанная реакция может применяться не ко всем веществам, входящим в объем настоящего изобретения, согласно описанию. Специалисты в данной области легко распознают вещества, для которых эта реакция проходит. В этих случаях реакцию могут успешно проводить с помощью обычных модификаций, известных специалистам в данной области, то есть путем соответствующей защиты мешающих групп, замены на другие обычные реагенты или путем обычных модификаций условий реакции. Во всех методах получения все исходные вещества известны, или их могут легко получать с использованием известных исходных веществ. Все температуры даны в градусах Цельсия, если явно не указано иное; все части и проценты указаны по массе, когда речь идет о выходе, и все части указаны по объему, когда речь идет о растворителе и элюенте.

Пример 1.

Человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30 (вещество 1)



1. Синтез человеческого инсулина des(B30)

Человеческий инсулин des(B30) получали в соответствии с методом, описанным в примере 11 китайского патента [CN1056618C](#).

2. Получение интересующего инсулина

Человеческий инсулин des(B30) (5 г, 0,876 ммоль) растворяли в 100 мМ водном растворе Na_2HPO_4 (150 мл) и добавляли ацетонитрил (100 мл). Доводили pH до 10–12,5 с помощью 1 N NaOH. *Трет*-бутил-эйкозандиоил- γGlu -(5 $\times$ OEG-OSu)-OtBu (1,36 г, 0,964 ммоль) растворяли в ацетонитриле (50 мл), и раствор медленно добавляли к раствору инсулина. Поддерживали pH на уровне 10–12,5. Через 120 минут реакционную смесь добавляли в воду (150 мл) и доводили pH до 5,0 с помощью 1 N водного раствора HCl. Осадок отделяли центрифугированием и лиофилизировали. Неочищенный продукт добавляли к смешанному раствору трифторуксусной кислоты (60 мл) и дихлорметана (60 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем смесь концентрировали до примерно 30 мл и выливали в охлажденный на льду *n*-гептан (300 мл), и осажденный продукт выделяли фильтрованием и дважды промывали *n*-гептаном. Полученный осадок высушивали в вакууме и очищали с помощью ионообменной хроматографии (Resource Q, градиент ацетата аммония 0,25–1,25 % в 42,5 % этаноле, pH 7,5) и обращенно-фазовой хроматографии (ацетонитрил, вода, TFA). Очищенные фракции объединяли, доводили pH до 5,2 с помощью 1 N HCl и разделяли с получением осадка, который лиофилизировали с получением патентуемого вещества 1.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1377,53[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$

3. Получение промежуточного вещества *трет*-бутил-эйкозандиоил- γGlu -(5 $\times$ OEG-OSu)-OtBu

3.1 *Трет*-бутил-эйкозандиоил-OSu

Сложный моно-*трет*-бутиловый эфир эйкозандиоевой кислоты (20 г, 50,17 ммоль) и NHS (5,77 г, 50,17 ммоль) смешивали в дихлорметане в атмосфере азота, и добавляли триэтиламин (13,95 мл). Полученную мутную смесь перемешивали при комнатной температуре, добавляли DCC (11,39 г, 55,19 ммоль) и дополнительно перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, и полученный фильтрат концентрировали до почти сухого состояния. Остаток смешивали с холодной водой и этилацетатом, смесь перемешивали в течение 20 мин и подвергали разделению жидких фаз. Верхнюю органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором, и после разделения жидких фаз верхнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и

фильтровали; фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил-эйкозандиоил-OSu (24,12 г; выход 97%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 496,36(M+1)^+$

3.2 *Трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил-OSu (24,12 г, 48,66 ммоль) растворяли в дихлорметане (250 мл), раствор перемешивали и последовательно добавляли к нему H-Glu-OtBu (10,88 г, 53,53 ммоль), триэтиламин (12,49 мл) и воду. Смесь нагревали для получения осветленного раствора, который затем перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 10%-ный водный раствор лимонной кислоты (200 мл) и проводили разделение жидких фаз. Нижнюю органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором, и после разделения жидких фаз нижнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-OtBu (27,27 г; выход 96%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 584,44(M+1)^+$

3.3 *Трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(OSu)-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-OtBu (27,27 г, 46,71 ммоль) растворяли в дихлорметане (300 мл) в атмосфере азота, и добавляли триэтиламин (11,99 мл). Смесь перемешивали в течение 10 мин, и добавляли NHS (5,38 г, 50,17 ммоль), с последующим добавлением DCC (10,60 г, 51,38 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, и полученный фильтрат концентрировали до почти сухого состояния. Остаток смешивали с холодной водой и этилацетатом, смесь перемешивали в течение 20 мин и подвергали разделению жидких фаз. Верхнюю органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором, и после разделения жидких фаз верхнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; и фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении. Добавляли *трет*-бутилметиловый эфир, и смесь перемешивали в течение 30 мин и фильтровали в вакууме. Отфильтрованный осадок высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил-эйкозандиоила- γ Glu-(OSu)-OtBu (25,76 г, выход 81%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 681,46(M+1)^+$

3.4 *Трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(2×OEG-OH)-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(OSu)-OtBu (25,76 г, 37,83 ммоль) растворяли в дихлорметане (250 мл), раствор перемешивали и последовательно добавляли к нему 2× АЕЕА (11,66 г, 37,83 ммоль), триэтиламин (9,71 мл) и воду (25 мл). Смесь нагревали для получения осветленного раствора, который затем перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 10%-ный водный раствор лимонной кислоты (200 мл) и проводили разделение жидких фаз. Нижнюю органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором, и после разделения жидких фаз нижнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; и фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(2×OEG-OH)-OtBu (30,75 г; выход 93%).

ЖХ-МС (Scie×100API): $m/z = 874,59(M+1)^+$

3.5 *Трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(2×OEG-OSu)-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(2×OEG-OH)-OtBu (30,75 г, 35,18 ммоль) растворяли в дихлорметане (300 мл) в атмосфере азота, и добавляли триэтиламин (9,03 мл). Смесь перемешивали в течение 10 мин, и добавляли NHS (4,05 г, 35,18 ммоль), с последующим добавлением DCC (7,98 г, 38,70 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, и полученный фильтрат концентрировали до почти сухого состояния. Остаток смешивали с холодной водой и этилацетатом, смесь перемешивали в течение 20 мин и подвергали разделению жидких фаз. Верхнюю органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором, и после разделения жидких фаз верхнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; и фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(2×OEG-OSu)-OtBu (31,09 г; выход 91%).

ЖХ-МС (Scie×100API): $m/z = 971,61(M+1)^+$

3.6 *Трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(5×OEG-OH)-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(2×OEG-OSu)-OtBu (31,09 г, 32,01 ммоль) растворяли в дихлорметане (350 мл), после чего раствор перемешивали и последовательно добавляли к нему 3× АЕЕА (14,52 г, 32,01 ммоль), триэтиламин (8,90 мл) и воду (25 мл). Смесь нагревали для получения осветленного раствора, который затем перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 10%-ный

водный раствор лимонной кислоты (200 мл) и проводили разделение жидких фаз. Нижнюю органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором, и после разделения жидких фаз нижнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; и фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(5 $\times$ OEG-OH)-OtBu (38,99 г; выход 93%).

ЖХ-МС (Scie $\times$ 100API): $m/z = 1309,81(M+1)^+$

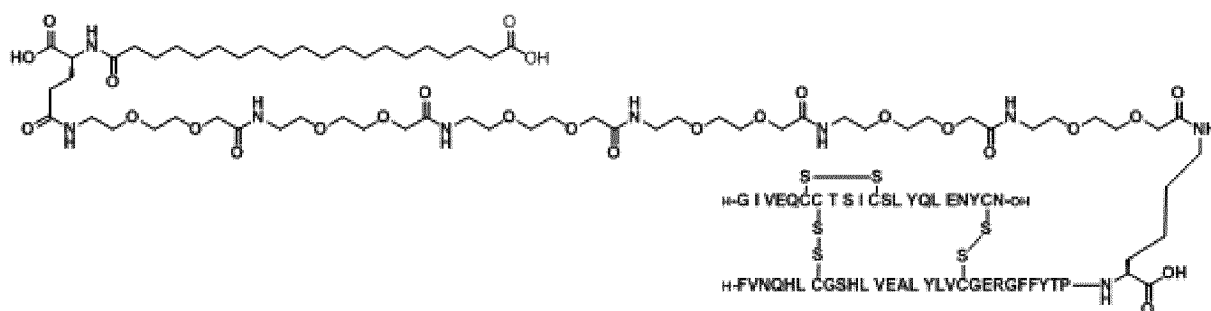
3.7 *Трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(5 $\times$ OEG-OSu)-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(5 $\times$ OEG-OH)-OtBu (38,99 г, 29,77 ммоль) растворяли в дихлорметане (400 мл) в атмосфере азота, и добавляли триэтиламин (8,28 мл). Смесь перемешивали в течение 10 мин, и добавляли NHS (3,43 г, 29,77 ммоль), с последующим добавлением DCC (6,76 г, 32,75 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, и полученный фильтрат концентрировали до почти сухого состояния. Остаток смешивали с холодной водой и этилацетатом, смесь перемешивали в течение 20 мин и подвергали разделению жидких фаз. Верхнюю органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором, и после разделения жидких фаз верхнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; и фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(5 $\times$ OEG-OSu)-OtBu (38,11 г; выход 91%).

ЖХ-МС (Scie $\times$ 100API): $m/z = 1406,83(M+1)^+$

Пример 2.

Человеческий инсулин B29K(N ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30 (вещество 2)



Вещество 2 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 1.

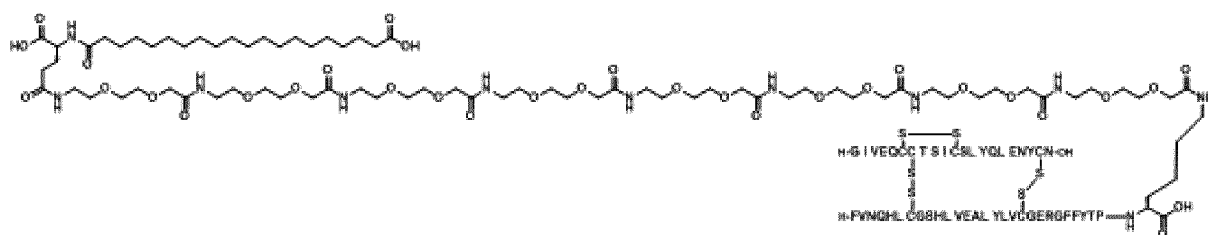
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1406,28[M+5H]^{5+}$

Промежуточное вещество *mpem*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(6 $\times$ OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 3 примера 1.

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 1551,90(M+1)^+$

Пример 3.

Человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30 (вещество 3)



Вещество 3 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 1.

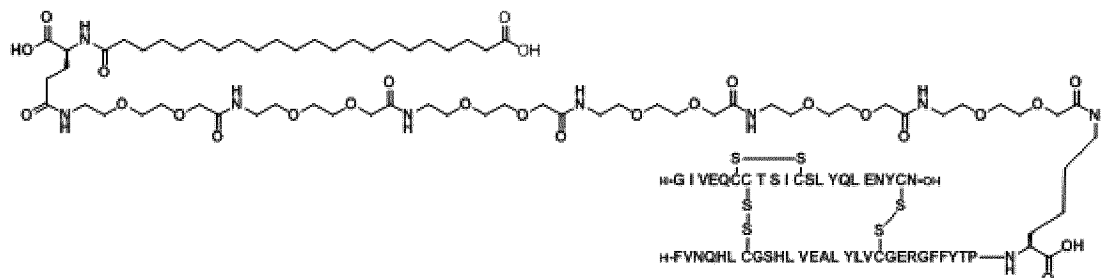
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1464,30[M+5H]^{5+}$

Промежуточное вещество *mpem*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(8 $\times$ OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 3 примера 1.

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 1814,02(M+1)^+$

Пример 4.

Человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30 (вещество 4)



Вещество 4 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 1.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1411,88[M+5H]^{5+}$

Промежуточное вещество *mpem*-бутил-докозандиоил- γ Glu-(6 $\times$ OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 3 примера 1.

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 1579,94(M+1)^+$

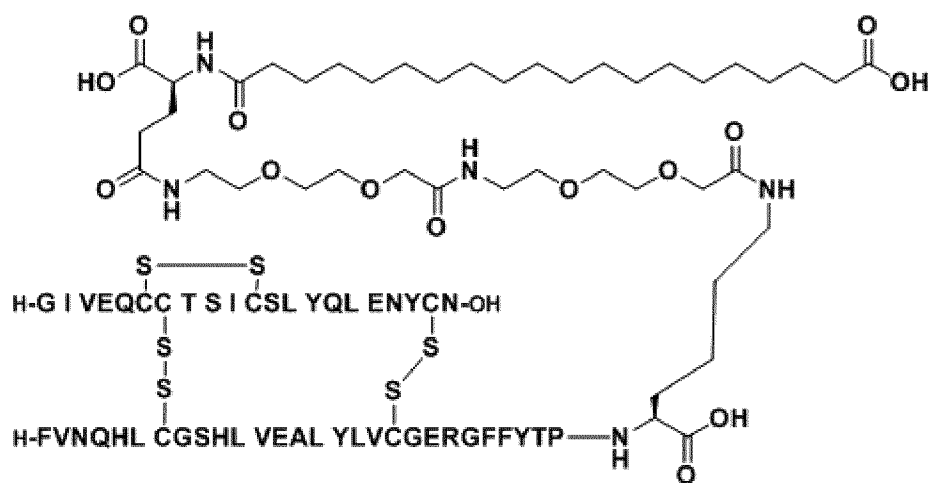
Сравнительный пример 1.

Человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-гексадекандиоил- γ Glu), desB30 (инсулин деглудек, контрольное вещество 1)

Контрольное вещество инсулин деглудек получали согласно примеру 4 из патента CN105820233A.

Сравнительный пример 2.

Человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-2×OEG), desB30 (контрольное вещество 2)



Контрольное вещество 2 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 1.

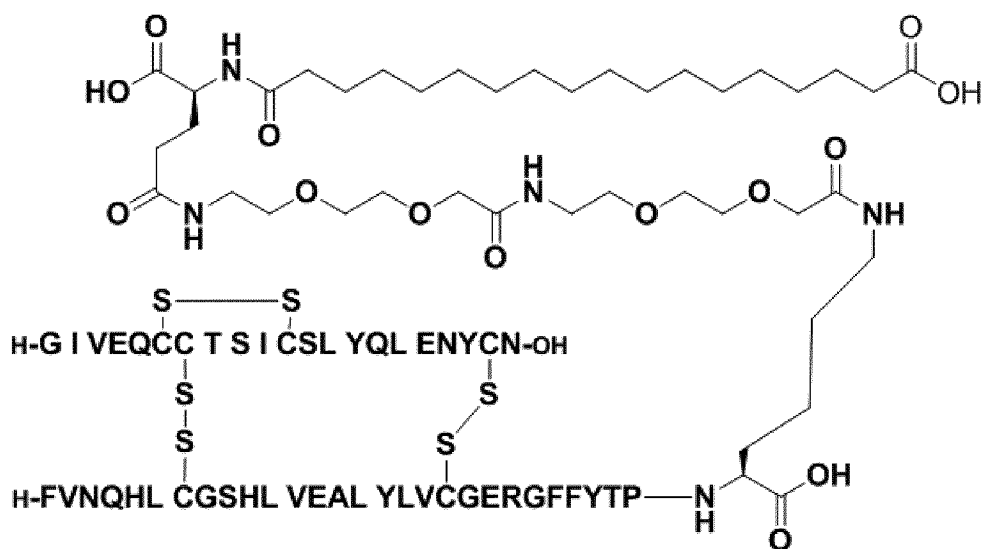
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1290,22[M+5H]^{5+}$

Промежуточное вещество *mpem*-бутил-эйкозандиоил-γGlu-(2×OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 3 примера 1.

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 971,61(M+1)^+$

Сравнительный пример 3.

Человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-октадекандиоил-γGlu-2×OEG), desB30 (контрольное вещество 3)

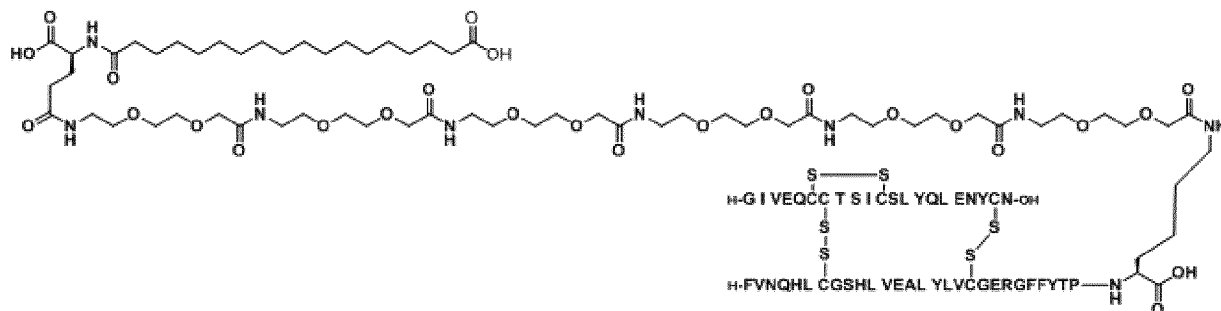


Контрольное вещество 3 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 1.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1284,61[M+5H]^{5+}$

Сравнительный пример 4.

Человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-октадекандиоил-γGlu-6×OEG), desB30 (контрольное вещество 4)



Контрольное вещество 4 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 1.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1400,68[M+5H]^{5+}$

Пример 5.

Фармакодинамическое исследование у мышей линии db/db

Данное исследование предназначалось для демонстрации регуляторного эффекта ацилированных инсулинов, раскрытых в данном документе, в отношении уровня глюкозы в крови (BG) в условиях индукции сахарного диабета.

Ацилированные инсулины из примеров 1-3 и контрольные вещества сравнительных примеров 1-4 изучали в исследовании с однократным дозированием на модельных мышах с ожирением и сахарным диабетом (мыши db/db). Гипогликемический эффект ацилированных инсулинов изучали для дозы 9 Ед/кг или 10 Ед/кг.

Самцов мышей линии db/db (BKS/Lep^r) возрастом 8-9 недель содержали в клетках для кормления соответствующего размера в огороженном пространстве со свободным доступом к стандартной пище и очищенной воде, условия в помещении контролировали на уровне 40-60% относительной влажности (ОВ) и 22-24 °С. После периода адаптации длительностью 1-2 недели мышей использовали для эксперимента.

В момент времени -1/1 ч (9:30) в день эксперимента до его начала у мышей определяли исходный уровень глюкозы в крови и массу тела. Каждую из мышей определяли либо в группу растворителя, либо в группу лечения на основании случайного уровня глюкозы в крови и массы тела и подвергали следующим процедурам: подкожная инъекция растворителя или ацилированных инсулинов (9 Ед/кг или 10 Ед/кг), причем растворитель содержал: 19,6 мг/мл глицерина, 1,5 мг/мл фенола, 1,72 мг/мл *m*-крезола и 55 мкг/мл ионов

цинка с рН 7,6.

Каждый из ацилированных инсулинов растворяли в растворителе до концентрации введения 1,8 Ед/мл или 2 Ед/мл, и объем введения составлял 5 мл/кг (т. е. 50 мкл/10 г массы тела). Введение осуществляли однократно путем подкожной инъекции (п/к) в загривок. Ацилированные инсулины вводили примерно в 10:30 (момент времени 0), и во время лечения мыши голодали, но имели свободный доступ к воде, а глюкозу в крови мышей определяли в моменты времени 3 ч, 6 ч, 9 ч, 12 ч и 15 ч после введения. Для имитации приема пищи начинали пероральный тест на толерантность к глюкозе (ПТТГ) после измерения глюкозы в крови в 15-часовой временной точке, и глюкозу в крови измеряли в моменты 30 мин, 60 мин, 120 мин и 180 мин после внутрижелудочного введения раствора глюкозы (100 мг/мл, 10 мл/кг). Тест ПТТГ проводили три раза подряд, и, согласно результатам предварительного теста, лекарственный эффект испытуемых веществ почти сошел на нет во время последнего теста ПТТГ, и тест прекращали после определения уровня глюкозы в крови в 30-часовой временной точке.

Хвост каждой мыши очищали ватным тампоном, смоченным спиртом, и капли крови собирали из хвоста с помощью одноразовой иглы для забора крови и проводили измерения с помощью глюкометра и прилагаемых к нему тест-полосок (Roche). Для каждой отдельной дозы ацилированного инсулина строили кривую зависимости ответа от дозы по изменению уровня глюкозы крови во времени.

Для иллюстрации влияния ацилированных инсулинов, раскрытых в данном документе, на уровень глюкозы в крови, для каждой индивидуальной кривой зависимости ответа от дозы рассчитывали площадь под кривой изменения уровня глюкозы крови во времени (AUC) от момента времени 0 до конечной точки мониторинга. Чем меньше значение AUC, тем лучше гипогликемический эффект и тем лучше лекарственный эффект.

Результаты испытания:

Гипогликемический эффект ацилированных инсулинов, раскрытых в настоящем документе, и контрольных веществ у мышей линии db/db показан на ФИГ. 1a-5b и в таблице 1, где конкретно:

На ФИГ. 1a и 1b показано, что ацилированные инсулины, раскрытые в данном документе, такие как вещество 1 и вещество 2, характеризуются значительно превосходящим гипогликемическим эффектом у мышей линии db/db по сравнению с инсулином деглудек, и характеризуются пролонгированной эффективной продолжительностью действия по

сравнению с инсулином деглудек.

На ФИГ. 2a и 2b показано, что ацилированные инсулины, раскрытые в данном документе, такие как вещество 1 и вещество 2, характеризуются значительно лучшим гипогликемическим эффектом у мышей линии db/db по сравнению с контрольным веществом 2, и лекарственный эффект вещества 1 и вещества 2, раскрытых в данном документе, увеличивается на 39,5% и 45,1%, соответственно, в диапазоне времени 0–16,5 ч после введения по отношению к контрольному веществу 2, как показано в таблице 1:

Таблица 1. Увеличение лекарственного эффекта ацилированных инсулинов, раскрытых в данном документе, по отношению к контрольному веществу 2.

Вещество/контрольное вещество	Пример	Увеличение лекарственного эффекта по отношению к контрольному веществу 2 (%)
Вещество 1	Пример 1	39,5%
Вещество 2	Пример 2	45,1%
Контрольное вещество 2	Сравнительный пример 2	0%

Увеличение лекарственного эффекта по отношению к контрольному веществу 2 (%) = $[(AUC(\text{испытуемое вещество}) - AUC(\text{растворитель})) / (AUC(\text{контрольное вещество 2}) - AUC(\text{растворитель})) - 1] \times 100\%$, где испытуемое вещество относится к ацилированному инсулину, раскрытому в данном документе

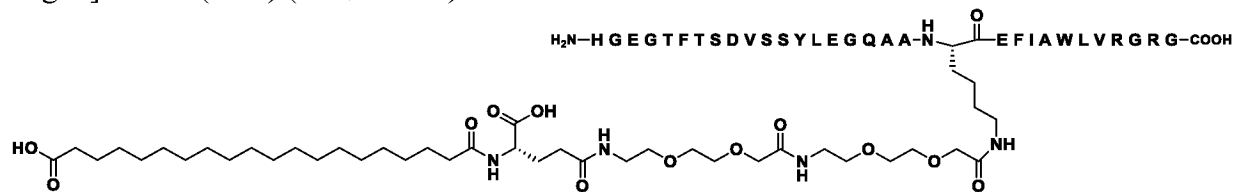
На ФИГ. 3a–3b показано, что вещество 1, вещество 2 и вещество 3, раскрытые в данном документе, характеризуются очень хорошим лекарственным эффектом, а также имеют значительно более пролонгированную продолжительность гипогликемического эффекта, поскольку они остаются эффективными у мышей линии db/db при мониторинге в 30-часовой временной точке.

На ФИГ. 4a–5b показано, что ацилированные инсулины, раскрытые в данном документе, такие как вещество 2, характеризуются значительно более высоким гипогликемическим эффектом у мышей линии db/db по сравнению с контрольным веществом 3 и контрольным веществом 4.

Пример 6.

Пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-карбоксихинадеканамино)-4(*S*)-карбокситетранамино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)ацетил][Gly8,

Arg34]GLP-1-(7-37) (вещество 6)



1. Получение пептида *N*-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-карбоксихекозаноиламино)-4(*S*)-карбоксивалерианоиламино]этоксид)этоксид]ацетиламино)этоксид]этоксид]ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)

Пептид [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) получали общим методом рекомбинантной экспрессии белков (подробности см. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*, Michael R. Green, Cold Spring Harbor Press, 2012). Пептид [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) (5 г, 1,48 ммоль) растворяли в 100 мМ водном растворе Na₂HPO₄ (150 мл) и добавляли ацетонитрил (100 мл). Доводили pH до 10–12,5 с помощью 1 N NaOH. *Трет*-бутил-эйкозандиоил-γGlu(2×OEG-OSu)-OtBu (1,59 г, 1,63 ммоль) растворяли в ацетонитриле (50 мл), и раствор медленно добавляли к раствору пептида [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37). Поддерживали pH на уровне 10–12,5. Через 120 минут реакционную смесь добавляли в воду (150 мл) и доводили pH до 5,0 с помощью 1 N водного HCl. Осадок отделяли центрифугированием и лиофилизировали. Неочищенный продукт добавляли к смешанному раствору трифторуксусной кислоты (60 мл) и дихлорметана (60 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем смесь концентрировали до примерно 30 мл и выливали в охлажденный на льду *n*-гептан (300 мл), и осажденный продукт выделяли фильтрованием и дважды промывали *n*-гептаном. Полученный осадок высушивали в вакууме и очищали с помощью ионообменной хроматографии (Resource Q, градиент ацетата аммония 0,25–1,25 % в 42,5 % этаноле, pH 7,5) и обращенно-фазовой хроматографии (ацетонитрил, вода, TFA). Очищенные фракции объединяли, доводили pH до 5,2 с помощью 1 N HCl и разделяли с получением осадка, который лиофилизировали с получением патентуемого вещества.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1028,79[M+4H]^{4+}$

2. Получение промежуточного вещества *трет*-бутил-эйкозандиоил-γGlu-(2×OEG-OSu)-OtBu

2.1 *Трет*-бутил-эйкозандиоил-OSu

Сложный моно-*трет*-бутиловый эфир эйкозандиоовой кислоты (20 г, 50,17 ммоль) и NHS (5,77 г, 50,17 ммоль) смешивали в дихлорметане (400 мл) в атмосфере азота, и добавляли триэтиламин (13,95 мл). Полученную мутную смесь перемешивали при комнатной

температуре, добавляли DCC (11,39 г, 55,19 ммоль) и дополнительно перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, и полученный фильтрат концентрировали до почти сухого состояния. Остаток смешивали с холодной водой и этилацетатом, смесь перемешивали в течение 20 мин и подвергали разделению жидких фаз. Верхнюю органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором, и после разделения жидких фаз верхнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил-эйкозандиоил-OSu (24,12 г; выход 97%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 496,36(M+1)^+$

2.2 Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил-OSu (24,12 г, 48,66 ммоль) растворяли в дихлорметане (250 мл), раствор перемешивали и последовательно добавляли к нему H-Glu-OtBu (10,88 г, 53,53 ммоль), триэтиламин (12,49 мл) и воду (25 мл). Смесь нагревали для получения осветленного раствора, который затем перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 10%-ный водный раствор лимонной кислоты (200 мл) и проводили разделение жидких фаз. Нижнюю органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором, и после разделения жидких фаз нижнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-OtBu (27,27 г; выход 96%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 584,44(M+1)^+$

2.3 Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(OSu)-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-OtBu (27,27 г, 46,71 ммоль) растворяли в дихлорметане (300 мл) в атмосфере азота, и добавляли триэтиламин (11,99 мл). Смесь перемешивали в течение 10 мин, и добавляли NHS (5,38 г, 50,17 ммоль), с последующим добавлением DCC (10,60 г, 51,38 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, и полученный фильтрат концентрировали до почти сухого состояния. Остаток смешивали с холодной водой и этилацетатом, смесь перемешивали в течение 20 мин и подвергали разделению жидких фаз. Верхнюю органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором, и после разделения

жидких фаз верхнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; и фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении. Добавляли *трет*-бутилметиловый эфир, и смесь перемешивали в течение 30 мин и фильтровали в вакууме. Отфильтрованный осадок высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил-эйкозандиоила- γ Glu-(OSu)-OtBu (25,76 г, выход 81%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 681,46(M+1)^+$

2.4 *Трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OH)-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(OSu)-OtBu (25,76 г, 37,83 ммоль) растворяли в дихлорметане (250 мл), раствор перемешивали и последовательно добавляли к нему 2 $\times$ АЕЕА (11,66 г, 37,83 ммоль), триэтиламин (9,71 мл) и воду (25 мл). Смесь нагревали для получения осветленного раствора, который затем перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 10%-ный водный раствор лимонной кислоты (200 мл) и проводили разделение жидких фаз. Нижнюю органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором, и после разделения жидких фаз нижнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; и фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OH)-OtBu (30,75 г; выход 93%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 874,59(M+1)^+$

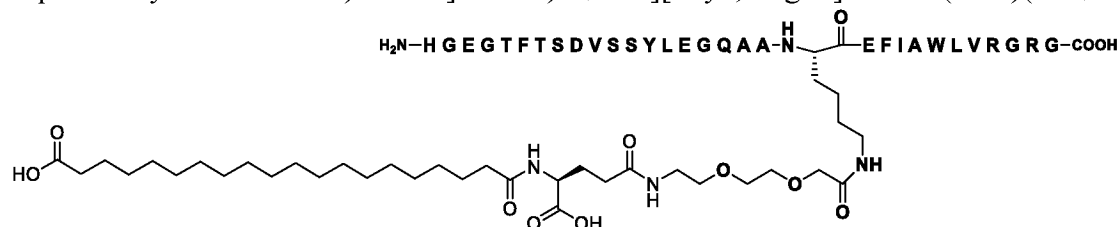
2.5 *Трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OSu)-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OH)-OtBu (30,75 г, 35,18 ммоль) растворяли в дихлорметане (300 мл) в атмосфере азота, и добавляли триэтиламин (9,03 мл). Смесь перемешивали в течение 10 мин, и добавляли NHS (4,05 г, 35,18 ммоль), с последующим добавлением DCC (7,98 г, 38,70 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, и полученный фильтрат концентрировали до почти сухого состояния. Остаток смешивали с холодной водой и этилацетатом, смесь перемешивали в течение 20 мин и подвергали разделению жидких фаз. Верхнюю органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором, и после разделения жидких фаз верхнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; и фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OSu)-OtBu (31,09 г; выход 91%).

ЖХ-МС (Scie×100API): $m/z = 971,61(M+1)^+$

Пример 7.

Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}4\text{-[}19\text{-карбоксихексадеканамино)]-4(S)\text{-карбоксибутаноиламино)этокси]этокси)ацетил}][\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)}$ (вещество 7)



Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}4\text{-[}19\text{-карбоксихексадеканамино)]-4(S)\text{-карбоксибутаноиламино)этокси]этокси)ацетил}][\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)}$ получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 примера 6.

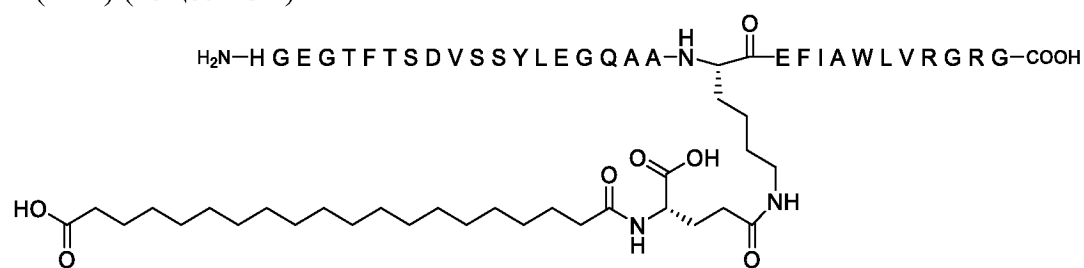
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 992,52[M+4H]^{4+}$

Промежуточное вещество *трет*-бутил-эйкозандиоил-γGlu-(OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 6.

ЖХ-МС (Scie×100API): $m/z = 826,54(M+1)^+$

Пример 8.

Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(19-карбоксихексадеканамино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)}$ (вещество 8)



Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(19-карбоксихексадеканамино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)}$ получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 примера 6.

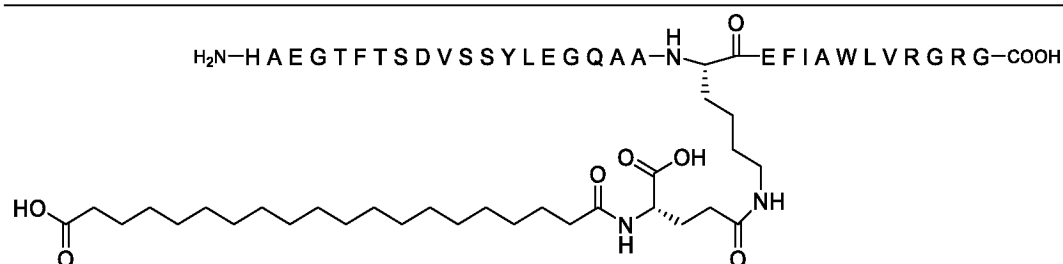
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 956,25[M+4H]^{4+}$

Промежуточное вещество *трет*-бутил-эйкозандиоил-γGlu-(OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 6.

ЖХ-МС (Scie×100API): $m/z = 681,46(M+1)^+$

Пример 9.

Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(19-карбоксихексадеканамино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)}$ (вещество 9)



Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(19-карбоксихептадекананоиламино)-4(S)\text{-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37)}$ получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 примера 6.

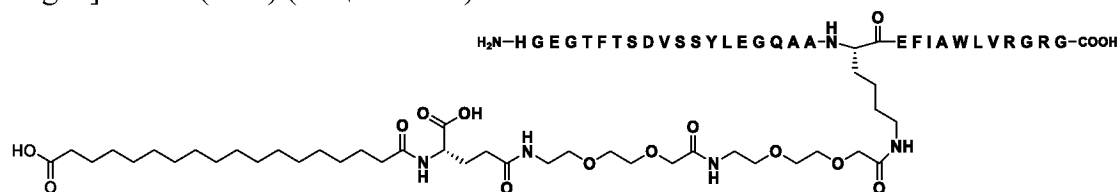
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 959,75[M+4H]^{4+}$

Промежуточное вещество $m\text{rem-бутил-эйкозандиоил-}\gamma\text{Glu-(OSu)-OtBu}$ получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 6.

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 681,46(M+1)^+$

Пример 10.

Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-карбоксихептадекананоиламино)-4(S)\text{-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$ (вещество 10)

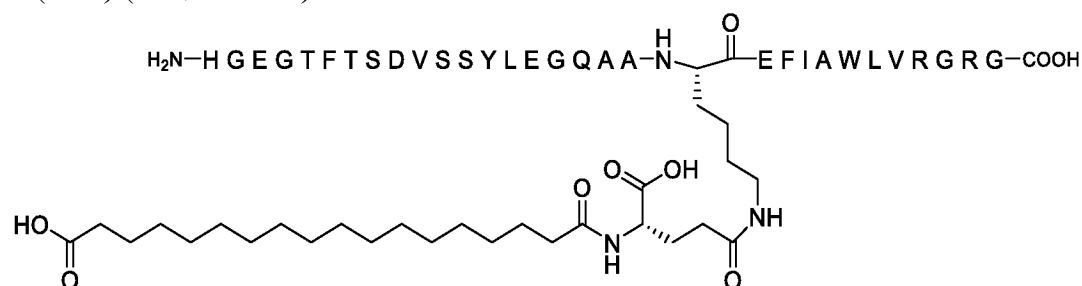


Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-[17-карбоксихептадекананоиламино]-4(S)\text{-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$ получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 примера 6.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1021,78[M+4H]^{4+}$

Пример 11.

Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(17-карбоксихептадекананоиламино)-4(S)\text{-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$ (вещество 11)



Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(17-карбоксихептадекананоиламино)-4(S)\text{-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$

1-(7-37) получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 примера 6.

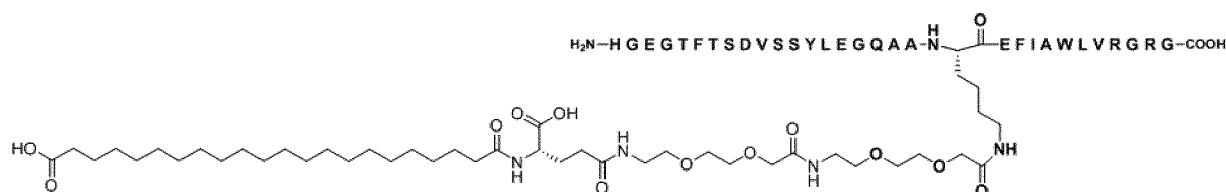
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 949,24[M+4H]^{4+}$

Промежуточное вещество mpet-бутил-октадекандиоил-γGlu-(OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 6.

ЖХ-МС (Scie×100API): $m/z = 653,43(M+1)^+$

Пример 12.

Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}2\text{-[}4\text{-(}21\text{-карбоксигенэйкозаноиламино)-}4(S)\text{-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино]этоксид)этоксид)ацетил}][\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)}$ (вещество 12)



Пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}2\text{-[}4\text{-(}21\text{-карбоксигенэйкозаноиламино)-}4(S)\text{-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино]этоксид)этоксид)ацетил}][\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)}$ получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 примера 6.

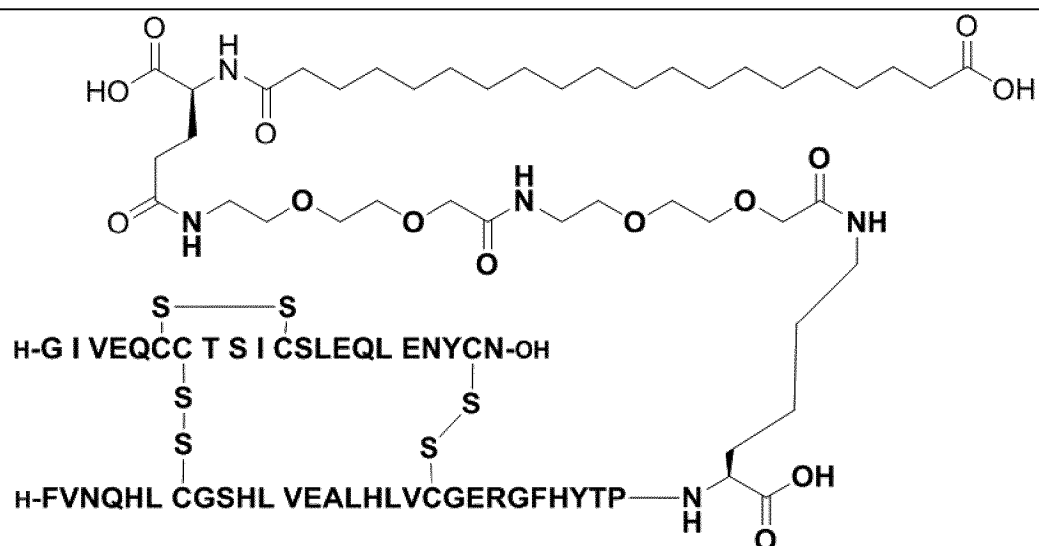
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1035,80[M+4H]^{4+}$

Промежуточное вещество mpet-бутил-докозандиоил-γGlu-(2×OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 6.

ЖХ-МС (Scie×100API): $m/z = 999,64(M+1)^+$

Сравнительный пример 5.

Человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K($N(\epsilon)$ -эйкозандиоил-γGlu-2×OEG), desB30 (контрольное вещество 5)



1. Получение человеческого инсулина A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-2×OEG), desB30

Человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30 получали с использованием традиционного метода для получения аналогов инсулина (подробности, см. Glendorf T, Sørensen AR, Nishimura E, Pettersson I, & Kjeldsen T: Importance of the Solvent-Exposed Residues of the Insulin B Chain α-Helix for Receptor Binding; *Biochemistry*, 2008, 47:4743–4751). Человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30 (5 г, 0,888 ммоль) растворяли в 100 мМ водном растворе Na₂HPO₄ (150 мл) и добавляли ацетонитрил (100 мл). Доводили pH до 10–12,5 с помощью 1 N NaOH. *Трем*-бутил-эйкозандиоил-γGlu-(2×OEG-OSu)-OtBu (0,948 г, 0,976 ммоль) растворяли в ацетонитриле (50 мл), и раствор медленно добавляли к раствору инсулина. Поддерживали pH на уровне 10–12,5. Через 120 минут реакционную смесь добавляли в воду (150 мл) и доводили pH до 5,0 с помощью 1 N водного HCl. Осадок отделяли центрифугированием и лиофилизировали. Лيوфилизированный неочищенный продукт добавляли к смешанному раствору трифторуксусной кислоты (60 мл) и дихлорметана (60 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем смесь концентрировали до примерно 30 мл и выливали в охлажденный на льду *n*-гептан (300 мл), и осажденный продукт выделяли фильтрованием и дважды промывали *n*-гептаном. Полученный осадок высушивали в вакууме и очищали с помощью ионообменной хроматографии (Resource Q, градиент ацетата аммония 0,25–1,25 % в 42,5 % этаноле, pH 7,5) и обращенно-фазовой хроматографии (ацетонитрил, вода, TFA). Очищенные фракции объединяли, доводили pH до 5,2 с помощью 1 N HCl и разделяли с получением осадка, который лиофилизировали с получением контрольного вещества 5.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1063,6852[M+6H]^{6+}$

2. Получение промежуточного вещества *трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 3 примера 1.

2.1 *Трет*-бутил-эйкозандиоил-OSu

Сложный моно-*трет*-бутиловый эфир эйкозандиоевой кислоты (20 г, 50,17 ммоль) и NHS (5,77 г, 50,17 ммоль) смешивали в дихлорметане в атмосфере азота, и добавляли триэтиламин (13,95 мл). Полученную мутную смесь перемешивали при комнатной температуре, добавляли DCC (11,39 г, 55,19 ммоль) и дополнительно перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, и полученный фильтрат концентрировали до почти сухого состояния. Остаток смешивали с холодной водой и этилацетатом, смесь перемешивали в течение 20 мин и подвергали разделению жидких фаз. Верхнюю органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором, и после разделения жидких фаз верхнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил-эйкозандиоил-OSu (24,12 г; выход 97%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 496,36(M+1)^+$

2.2 *Трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил-OSu (24,12 г, 48,66 ммоль) растворяли в дихлорметане (250 мл), раствор перемешивали и последовательно добавляли к нему H-Glu-OtBu (10,88 г, 53,53 ммоль), триэтиламин (12,49 мл) и воду. Смесь нагревали для получения осветленного раствора, который затем перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 10%-ный водный раствор лимонной кислоты (200 мл) и проводили разделение жидких фаз. Нижнюю органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором, и после разделения жидких фаз нижнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-OtBu (27,27 г; выход 96%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 584,44(M+1)^+$

2.3 *Трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(OSu)-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-OtBu (27,27 г, 46,71 ммоль) растворяли в дихлорметане (300 мл) в атмосфере азота, и добавляли триэтиламин (11,99 мл). Смесь перемешивали в течение 10 мин, и добавляли NHS (5,38 г, 50,17 ммоль), с последующим добавлением DCC

(10,60 г, 51,38 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, и полученный фильтрат концентрировали до почти сухого состояния. Остаток смешивали с холодной водой и этилацетатом, смесь перемешивали в течение 20 мин и подвергали разделению жидких фаз. Верхнюю органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором, и после разделения жидких фаз верхнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; и фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении. Добавляли *трет*-бутилметиловый эфир, и смесь перемешивали в течение 30 мин и фильтровали в вакууме. Отфильтрованный осадок высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил-эйкозандиоила- γ Glu-(OSu)-OtBu (25,76 г, выход 81%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 681,46(M+1)^+$

2.4 *Трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OH)-OtBu

Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(OSu)-OtBu (25,76 г, 37,83 ммоль) растворяли в дихлорметане (250 мл), раствор перемешивали и последовательно добавляли к нему 2 $\times$ АЕЕА (11,66 г, 37,83 ммоль), триэтиламин (9,71 мл) и воду (25 мл). Смесь нагревали для получения осветленного раствора, который затем перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 10%-ный водный раствор лимонной кислоты (200 мл) и проводили разделение жидких фаз. Нижнюю органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором, и после разделения жидких фаз нижнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; и фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OH)-OtBu (30,75 г; выход 93%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 874,59(M+1)^+$

2.5 *Трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OSu)-OtBu

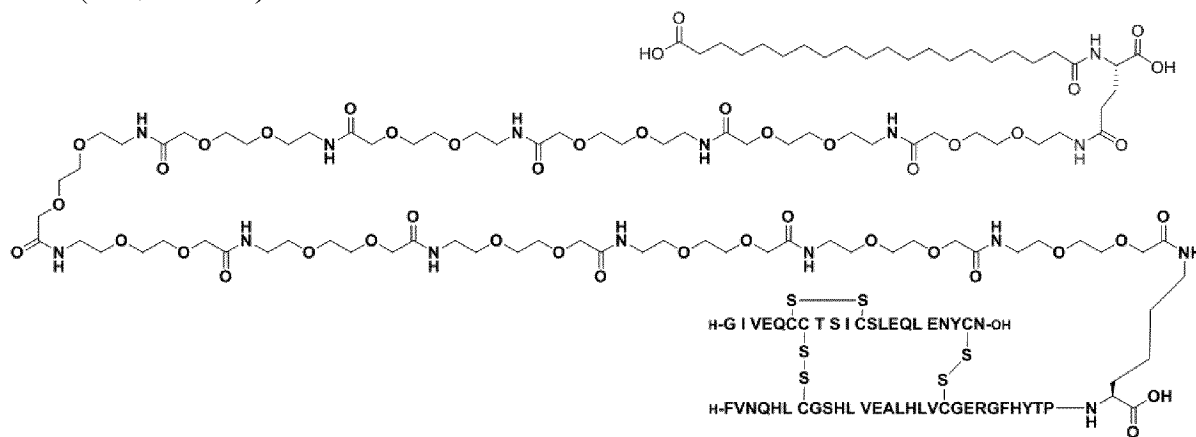
Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OH)-OtBu (30,75 г, 35,18 ммоль) растворяли в дихлорметане (300 мл) в атмосфере азота, и добавляли триэтиламин (9,03 мл). Смесь перемешивали в течение 10 мин, и добавляли NHS (4,05 г, 35,18 ммоль), с последующим добавлением DCC (7,98 г, 38,70 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, и полученный фильтрат концентрировали до почти сухого состояния. Остаток смешивали с холодной водой и этилацетатом, смесь перемешивали в течение 20 мин и подвергали разделению жидких фаз.

Верхнюю органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором, и после разделения жидких фаз верхнюю органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали; и фильтрат концентрировали до почти сухого состояния при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи с получением *трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OSu)-OtBu (31,09 г, выход 91%).

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 971,61(M+1)^+$

Пример 13.

Человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-12 $\times$ OEG), desB30 (вещество 15)



Вещество человеческого инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-12 $\times$ OEG), desB30 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 сравнительного примера 5.

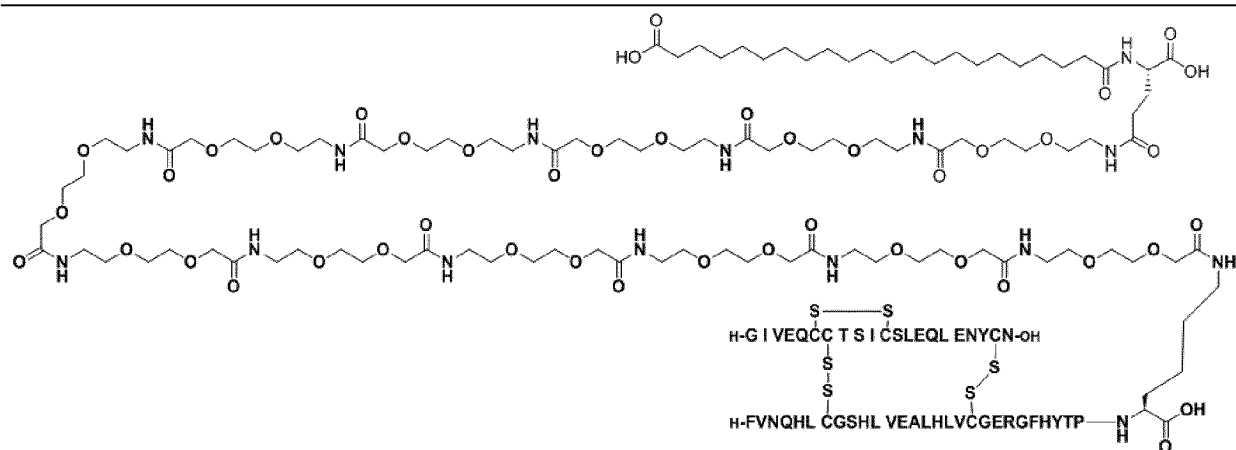
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1305,4716[M+6H]^{6+}$

Промежуточное вещество *трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(12 $\times$ OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 сравнительного примера 5.

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 2423,35(M+1)^+$

Пример 14.

Человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-12 $\times$ OEG), desB30 (вещество 16)



Вещество человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-12 $\times$ OEG), desB30 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 сравнительного примера 5.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1310,1425[M+6H]^{6+}$

Промежуточное вещество *трет*-бутил-докозандиоил- γ Glu-(12 $\times$ OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 сравнительного примера 5.

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 2451,38(M+1)^+$

Пример 15.

Фармакодинамическое исследование у крыс со стрептозотоцин (STZ)-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1)

Крыс линии SD (половина — самки, половина — самцы) возрастом 8 недель и массой 180–220 г содержали в клетках для кормления соответствующего размера (5 крыс/клетка) в огороженном пространстве со свободным доступом к стандартной пище и очищенной воде; относительную влажность в помещении контролировали на уровне 40–60%, а температуру — на уровне 22–24 °C. После периода адаптации длительностью 4 дня крыс выдерживали без корма в течение 12 ч, после чего им внутрибрюшинно вводили раствор стрептозотоцина (Sigma) (10 мг/мл, в 0,1 М цитратном буфере) в дозе 60 мг/кг. Через 3 дня после введения стрептозотоцина проводили выборочное определение уровня глюкозы в крови и крыс, у которых уровень глюкозы крови был выше 20 ммоль/л, отбирали в качестве модельных крыс с СДТ1 для последующего эксперимента.

Эксперимент начали через 14 дней после отбора групп. В момент времени -1/1 ч (9:30) в день эксперимента до его начала у крыс определяли исходный уровень глюкозы в крови и массу тела. На основании выборочного определения уровня глюкозы в крови и массы тела крыс определяли либо в группу растворителя, либо в экспериментальную группу и подвергали следующим процедурам: подкожная инъекция растворителя либо подкожная

инъекция патентуемых веществ из сравнительного примера 5, примера 13 и примера 14 (то есть контрольное вещество 5, вещество 15 и вещество 16) в дозе 25 Ед/кг, причем растворитель содержал 5,65 мг/мл фенола, 15 мг/мл глицерина, 0,708 мг/мл динатрия гидрофосфата и 0,585 мг/мл натрия хлорида и имел рН 7,6.

Каждый из ацилированных инсулинов растворяли в растворителе до концентрации введения 25 Ед/мл, и объем введения составлял 1 мл/кг (т. е. 0,1 мкл/100 г массы тела). Введение осуществляли путем подкожной инъекции (п/к) в загривок и повторяли 4 раза с интервалом в 4 дня, и во время эксперимента крысы SD имели свободный доступ к пище и воде. Ацилированные инсулины вводили примерно в 9:30–10:00 (момент времени 0). Уровень глюкозы в крови крыс отслеживали в моменты времени 3 ч, 6 ч, 9 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч и 96 ч после первого введения, а уровень глюкозы в крови крыс отслеживали в моменты времени 6 ч и 24 ч после каждого из следующих введений.

Для каждой отдельной дозы ацилированного инсулина строили кривую зависимости ответа от дозы по изменению уровня глюкозы крови во времени. Для иллюстрации влияния ацилированных инсулинов на уровень глюкозы в крови, для каждой индивидуальной кривой зависимости ответа от дозы рассчитывали площадь под кривой изменения уровня глюкозы крови во времени (AUC) от момента времени 0 до конечной точки мониторинга.

Таблица 2. Увеличение лекарственного эффекта ацилированных инсулинов, раскрытых в данном документе, по отношению к контрольному веществу 5.

Вещество/контрольное вещество	Пример	Увеличение лекарственного эффекта по отношению к контрольному веществу 5 (%)
Вещество 15	Пример 13	125%
Вещество 16	Пример 14	142%
Контрольное вещество 5	Сравнительный пример 5	0%

Увеличение лекарственного эффекта по отношению к контрольному веществу 5 (%) = $[(AUC(\text{испытуемое вещество}) - AUC(\text{растворитель})) / (AUC(\text{контрольное вещество 5}) - AUC(\text{растворитель})) - 1] \times 100\%$, где испытуемое вещество относится к ацилированному инсулину, раскрытому в данном документе

Как показано на ФИГ. 6А–6В и в таблице 2, ацилированные инсулины, раскрытые в данном

документе, после введения крысам с сахарным диабетом I типа (СДТ1) неожиданным образом оказывают более высокий гипогликемический эффект, чем контрольное вещество 5, причем и вещество 15, и вещество 16 оказывают гипогликемический эффект, заметно превосходящий эффект контрольного вещества 5.

Пример 16.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности композиций с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе.

Композиции с ацилированными инсулинами

Патентуемое вещество из примера 4 (вещество 4) растворяли в 0,1% растворе NaOH до конечной концентрации 4,8 мМ (рН около 10–11), и последовательно добавляли фенол, *m*-крезол, ацетат цинка, глицерин и хлорид натрия в соответствии с количествами компонентов, указанными в таблице ниже, для получения препаратов ацилированных инсулинов с конечной концентрацией инсулина 1,2 мМ (200 Ед/мл или 8,46 мг/мл); содержание Zn выражено как Zn/6 моль ацилированного инсулина (сокращенно «Zn/6 инс.»).

О химической стабильности препаратов, описанных в этом примере, можно судить по изменению количества высокомолекулярного белка (ВМБ) после 14 и 20 дней хранения при температуре 25 °С и 37 °С относительно дня 0, а также по изменению количества родственных соединений после 14 и 20 дней хранения при температурах 25 °С и 37 °С.

Определение содержания высокомолекулярного белка (ВМБ)

Содержание высокомолекулярного белка (ВМБ) определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Waters ВЕН 200А (7,8×300 мм, 5 мкм) (температура колонки: 30 °С; температура кюветы для образцов: 5 °С; подвижная фаза: 600 мл 0,1% раствора аргинина, 150 мл ледяной уксусной кислоты и 250 мл ацетонитрила; скорость потока: 0,5 мл/мин). Длина волны детектирования составляла 276 нм, а объем образца составлял 10 мкл. В таблице 3 показано увеличение количества ВМБ при температурах 25 °С и 37 °С на день 14 и день 20 относительно дня 0.

Таблица 3

1,2 мМ вещества 4 10 мМ <i>m</i> -крезола 17 мг/мл глицерина рН 7,4	25 °С	25 °С	37 °С	37 °С
	Увеличение	Увеличение	Увеличение	Увеличение
	количества	количества	количества	количества
	ВМБ на	ВМБ на	ВМБ на	ВМБ на

	день 14 относитель но дня 0 (%)	день 20 относитель но дня 0 (%)	день 14 относитель но дня 0 (%)	день 20 относитель но дня 0 (%)
30 мМ фенола + 5,5 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	0,06	0,13	0,37	0,57
30 мМ фенола + 6,5 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	0,03	0,07	0,2	0,35
30 мМ фенола + 5,5 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	0,05	0,07	0,34	0,56
30 мМ фенола + 6,5 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	0,03	0,04	0,16	0,28
60 мМ фенола + 5,5 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	0,05	0,09	0,41	0,66
60 мМ фенола + 6,5 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	0,06	0,06	0,30	0,49
60 мМ фенола + 5,5 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	0,08	0,08	0,36	0,56
60 мМ фенола + 6,5 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	0,04	0,08	0,24	0,43
45 мМ фенола + 6,0 Zn/6 инс. + 20 мМ NaCl	0,04	0,06	0,28	0,42

Из таблицы, приведенной выше, можно видеть, что количество ВМБ в составах с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе, очень медленно увеличивается с течением времени, из чего следует, что все приведенные выше составы с ацилированными инсулинами характеризуются превосходной химической стабильностью. В частности, когда содержание Zn составляет 6,5 Zn/6 инс., количество ВМБ увеличивается медленнее, чем когда содержание Zn составляет 5,5 Zn/6 инс.

Определение количества родственных соединений

Содержание родственных инсулину соединений определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Waters Kromasil 300A-5 мкм-С8 (4,6×250 мм) (температура колонки: 40 °С; температура кюветы для

образца: комнатная температура; скорость потока элюирующей фазы: 1,0 мл/мин).

Элюирование выполняли с помощью подвижной фазы, состоящей из:

фазы А: 0,1 М безводный сульфат натрия, 0,1 М дигидрат дигидрофосфата натрия и 10% ацетонитрила (об./об.), с pH доведенным до 5,0 с помощью NaOH; и

фазы В: 50% ацетонитрила (об./об.).

Градиент: линейное изменение от 45%/55% А/В до 35%/65% А/В от 0 мин до 45 мин, линейное изменение до 20%/80% А/В от 45 мин до 50 мин, изократический градиент 20%/80% А/В от 50 мин до 60 мин, линейное изменение до 45%/55% А/В от 60 мин до 60,1 мин и изократический градиент 45%/55% А/В от 60,1 мин до 70 мин.

В таблице 4 показано увеличение количества родственных соединений при температуре 37 °С в день 14 и день 20 относительно дня 0.

Таблица 4

1,2 мМ вещества 4 10 мМ <i>m</i> -крезола 17 мг/мл глицерина pH 7,4	37 °С Увеличение количества родственных соединений в день 14 относительно дня 0. (%)	37 °С Увеличение количества родственных соединений в день 20 относительно дня 0. (%)
30 мМ фенола + 5,5 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	1,49	2,46
30 мМ фенола + 6,5 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	1,61	2,79
30 мМ фенола + 5,5 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	1,55	2,4
30 мМ фенола + 6,5 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	1,58	2,63
60 мМ фенола + 5,5 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	1,74	2,71
60 мМ фенола + 6,5 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	1,69	2,94
60 мМ фенола + 5,5 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	1,52	2,58
60 мМ фенола + 6,5 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	1,56	2,8

45 мМ фенола + 6,0 Zn/6 инс. + 20 мМ NaCl	1,46	2,58
---	------	------

Из таблицы, приведенной выше, можно видеть, что количество родственных инсулину соединений в составах с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе, также очень медленно увеличивается с течением времени, из чего следует, что приведенные выше составы с ацилированными инсулинами являются очень стабильными.

Пример 17.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности композиций с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе. Готовили составы с ацилированными инсулинами из таблиц 5-7, в соответствии с количеством каждого компонента, указанного ниже в таблицах 5-7, по методикам, аналогичным описанным в примере 16. Изменение содержания ВМБ и родственных соединений определяли по методикам, сходных с описанными в примере 16. В таблицах 5-7, приведенных ниже, показаны изменения количества ВМБ и родственных соединений в составах с ацилированными инсулинами различных формул.

Таблица 5

2,1 мМ вещества 4 60 мМ фенола 10 мМ <i>m</i> -крезола 20 мМ NaCl 15 мг/мл глицерина pH 7,4	37 °C Увеличение количества ВМБ на день 26 относительно дня 0 (%)	37 °C Увеличение количества ВМБ на день 65 относительно дня 0 (%)	37 °C Степень увеличения за сутки количества ВМБ в течение 65 дней хранения (%)
2,2 Zn/6 инс.	0,98	2,18	0,032
2,5 Zn/6 инс.	0,99	2,42	0,037
3 Zn/6 инс.	0,79	1,68	0,026
4,5 Zn/6 инс.	0,43	1,2	0,018

Таблица 6

2,1 мМ вещества 4 60 мМ фенола 10 мМ <i>m</i> -крезола 15 мг/мл глицерина	37 °C Увеличение количества ВМБ на день 26	37 °C Увеличение количества ВМБ на день	37 °C Степень увеличения за сутки
--	---	--	--

pH 7,4	относительно дня 0 (%)	65 относительно дня 0 (%)	количества ВМБ в течение 65 дней хранения (%)
10 мМ Na ₂ HPO ₄ +2,2 Zn/6 инс.	0,88	1,84	0,028
10 мМ Na ₂ HPO ₄ +4,5Zn/6 инс.	0,20	0,55	0,008
30 мМ Na ₂ HPO ₄ +2,2 Zn/6 инс.	0,67	1,47	0,023
30 мМ Na ₂ HPO ₄ +4,5Zn/6 инс.	0,27	0,61	0,009
2,2 Zn/6 инс.	0,96	2,16	0,033
4,5 Zn/6 инс.	0,46	1,33	0,020

Таблица 7

0,6 мМ вещества 2 60 мМ фенола 15 мг/мл глицерина 5 мМ дигидрофосф ат натрия 10 мМ NaCl pH 7,6	37 °C Увеличение количества ВМБ на день 30 относительно дня 0 (%)	37 °C Степень увеличения за сутки количества ВМБ в течение 30 дней хранения (%)	37 °C Увеличение количества родственных соединений в день 30 относительно дня 0 (%)	37 °C Степень увеличения за сутки количества родственных соединений в течение 30 дней хранения (%)
5,5 Zn/6 инс.	0,45	0,0153	1,91	0,0637
6,5 Zn/6 инс.	0,42	0,0140	1,50	0,0500
7 Zn/6 инс.	0,44	0,0147	1,58	0,0527
7,5 Zn/6 инс.	0,51	0,0170	1,75	0,0583

Из таблицы, приведенной выше, можно видеть, что количество ВМБ и родственных соединений в приведенных выше составах с ацилированными инсулинами, раскрытых в данном документе, относительно медленно увеличивается с течением времени, и количество ВМБ и родственных соединений увеличивается медленнее, особенно когда увеличивается содержание ионов Zn или добавлен Na₂HPO₄, из чего следует, что все

составы с ацилированными инсулинами, полученными по настоящему изобретению, характеризуются хорошей химической стабильностью.

Пример 18.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности композиций с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе. Готовили составы с ацилированными инсулинами из таблицы 8, в соответствии с количеством каждого компонента, указанного ниже в таблице 8, по методикам, аналогичным описанным в примере 16. Изменение содержания ВМБ и родственных соединений определяли по методикам, сходных с описанными в примере 16. В таблице, приведенной ниже, показаны изменения количества ВМБ и родственных соединений в составах с ацилированными инсулинами различных формул.

Таблица 8

60 mM фенола 4,5 Zn/6 инс. 15 мг/мл глицерина 5 mM дигидрофосфат натрия 10 mM м-крезола 10 mM NaCl	37 °C Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	37 °C Увеличение количества родственных соединений после 14 дней хранения относительно дня 0 (%)
0,6 mM (100 Ед) вещества 4	0,77	1,62
2,1 mM (350 Ед) вещества 4	0,57	1,08
3,0 mM (500 Ед) вещества 4	0,53	1,03
4,2 mM (700 Ед) вещества 4	0,45	1,29

Из таблицы, приведенной выше, можно видеть, что количество ВМБ и родственных соединений в составах с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе, относительно медленно увеличивается с течением времени, из чего следует, что все составы с ацилированными инсулинами, полученные по настоящему изобретению, характеризуются хорошей химической стабильностью.

Пример 19.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности композиций с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе.

Композиции с ацилированными инсулинами

Вещество 4 растворяли в 0,03% растворе NaOH до концентрации 2,4 mM, а затем доводили

pH до 7,4 с помощью 4% раствора NaOH. Хорошо смешивали фенол, *m*-крезол, глицерин и хлорид натрия в соответствии с количеством каждого компонента, указанного в таблице ниже, добавляли к раствору вещества 4, и доводили pH до 7,4. К раствору вещества 4 добавляли ацетат цинка тремя равными порциями в соответствии с количеством, указанным в таблице ниже, и доводили pH до конечного значения. Получали составы с ацилированными инсулинами с конечной концентрацией инсулина 1,2 мМ (200 Ед/мл или 8,46 мг/мл), содержание Zn выражено как Zn/6 моль ацилированного инсулина (сокращенно «Zn/6 инс.»).

О химической стабильности составов, описанных в этом примере, можно судить по изменениям количества высокомолекулярного белка (ВМБ) после 14 и 21 дней хранения при температуре 25 °С и 37 °С относительно дня 0, а также по изменениям количества родственных соединений после 21 дня хранения при температуре 37 °С.

Определение содержания высокомолекулярного белка (ВМБ)

Содержание высокомолекулярного белка (ВМБ) определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Shodex™ PROTEIN KW-802.5 (8,0 мм×300 мм) (температура колонки: 30 °С; температура кюветы для образцов: 5 °С; подвижная фаза: 3 л 0,1% раствора аргинина, 750 мл ледяной уксусной кислоты и 1250 мл ацетонитрила; скорость потока: 0,5 мл/мин). Длина волны детектирования составляла 276 нм, а объем образца составлял 10 мкл. В таблице 9 показано увеличение количества ВМБ при температурах 25 °С и 37 °С на день 14 и день 21 относительно дня 0.

Таблица 9

1,2 мМ вещества 4 10 мМ <i>m</i> -крезола 17 мг/мл глицерина 45 мМ фенола 6,5 Zn/6 инс. 20 мМ NaCl	25 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	25 °С Увеличение количества ВМБ на день 21 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 21 относительно дня 0 (%)
pH 7,0	0,03	0,07	0,27	0,45
pH 7,2	0,02	0,06	0,25	0,34
pH 7,4	0,03	0,06	0,26	0,34

pH 7,6	0,01	0,06	0,25	0,35
pH 8,0	0,06	0,12	0,44	0,79

Из таблицы, приведенной выше, можно видеть, что в пределах указанного выше диапазона pH количество ВМБ в составах с ацилированными инсулинами, раскрытых в данном документе, очень медленно увеличивается с течением времени, из чего следует, что все приведенные выше составы с ацилированными инсулинами характеризуются превосходной химической стабильностью в пределах указанного выше диапазона pH.

Определение количества родственных соединений

Содержание родственных инсулину соединений определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Waters Kromasil 100A-3,5 мкм-C8 (4,6×250 мм) (температура колонки: 40 °C; температура кюветы для образца: 10 °C; скорость потока элюирующей фазы: 1,0 мл/мин). Элюирование выполняли с помощью подвижной фазы, состоящей из:

фаза А: 0,1 М безводный сульфат натрия, 0,1 М дигидрат дигидрофосфата натрия и 10% ацетонитрила (об./об.), с pH доведенным до 3,0 с помощью концентрированной фосфорной кислоты; и

фазы В: 60% ацетонитрила (об./об.).

Градиент: изократический градиент 41,3%/58,7% А/В от 0 мин до 40 мин, линейное изменение до 0%/100% А/В от 40 мин до 50 мин, линейное изменение до 41,3%/58,7% А/В от 50 мин до 51 мин, и изократический градиент 41,3%/58,7% А/В от 51 мин до 65 мин. В таблице 10 показано увеличение количества родственных соединений при температуре 37 °C на день 21 по сравнению с днем 0.

Таблица 10

1,2 mM вещества 4 10 mM м-крезола 17 мг/мл глицерина 45 mM фенола 6,5 Zn/6 инс. 20 mM NaCl	37 °C Увеличение количества родственных соединений в день 21 относительно дня 0 (%)
pH 7,0	2,43
pH 7,2	2,44
pH 7,4	2,22

pH 7,6	2,29
pH 8,0	3,34

Из таблицы, приведенной выше, можно видеть, что в пределах указанного выше диапазона pH количество родственных соединений в составах с ацилированными инсулинами, раскрытых в данном документе, также очень медленно изменяется с течением времени, и все раскрытые в данном документе составы с ацилированными инсулинами характеризуются превосходной химической стабильностью.

Пример 20.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности композиций с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе. Готовили составы с ацилированными инсулинами из таблиц 11 и 12, в соответствии с количеством каждого компонента, указанного ниже в таблицах 11 и 12, по методикам, аналогичным описанным в примере 19. Изменение содержания ВМБ и родственных соединений определяли по методикам, сходных с описанными в примере 19. В таблицах 11 и 12, приведенных ниже, показаны изменения количества ВМБ и родственных соединений в составах с ацилированными инсулинами различных формул.

Таблица 11

10 мМ м-крезола 17 мг/мл глицерина 45 мМ фенола 6,5 Zn/6 инс. 20 мМ NaCl pH 7,4	25 °C Увеличение количества ВМБ на день 22 относительно дня 0 (%)	25 °C Увеличение количества ВМБ на день 42 относительно дня 0 (%)	37 °C Увеличение количества ВМБ на день 22 относительно дня 0 (%)	37 °C Увеличение количества ВМБ на день 42 относительно дня 0 (%)
100 Ед вещества 4	0,06	0,13	0,25	0,75
200 Ед вещества 4	0,03	0,07	0,18	0,55

Таблица 12

10 мМ м-крезола	25 °C	37 °C	37 °C
-----------------	-------	-------	-------

17 мг/мл глицерина 45 мМ фенола 6,5 Zn/6 инс. 20 мМ NaCl рН 7,4	Увеличение количества родственных соединений в день 42 относительно дня 0 (%)	Увеличение количества родственных соединений в день 21 относительно дня 0 (%)	Увеличение количества родственных соединений в день 42 относительно дня 0 (%)
100 Ед вещества 4	0,48	3,23	5,69
200 Ед вещества 4	0,71	3,06	5,03

Из таблиц, приведенных выше, можно видеть, что количество ВМБ и родственных соединений в составах с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе, относительно медленно увеличивается с течением времени, из чего следует, что все составы с ацилированными инсулинами, полученные по настоящему изобретению, характеризуются хорошей химической стабильностью.

Пример 21.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности композиций с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе.

Композиции с ацилированными инсулинами

Вещество 16 растворяли в 0,08% растворе NaOH до концентрации, в два раза превышавшей конечную концентрацию инсулина, а затем доводили рН до 7,45 с помощью 4% раствора NaOH. Хорошо смешивали фенол, *m*-крезол, глицерин и хлорид натрия в соответствии с количеством каждого компонента, указанного в таблице ниже, добавляли к раствору вещества 16, и доводили рН до 7,4. К раствору вещества 16 добавляли ацетат цинка тремя равными порциями в соответствии с количеством, указанным в таблице ниже, и доводили рН до 7,4. Получали составы ацилированного инсулина с конечной концентрацией инсулина 1,2 мМ (9,43 мг/мл) или 1,5 мМ (11,74 мг/мл).

О химической стабильности препаратов, описанных в этом примере, можно судить по изменению количества высокомолекулярного белка (ВМБ) после 14 и 21 дней хранения при температуре 25 °С и 37 °С относительно дня 0, а также по изменению количества родственных соединений после 14 и 21 дней хранения при температурах 25 °С и 37 °С.

Определение содержания высокомолекулярного белка (ВМБ)

Содержание ВМБ определяли по методикам, аналогичным описанным в примере 19. В таблицах 13–15 показано увеличение содержания ВМБ в день 14 и в день 21 относительно дня 0 после хранения при температуре 25 °С и 37 °С.

Таблица 13

1,2 мМ вещества 16 10 мМ <i>m</i> -крезола 15 мг/мл глицерина 30 мМ фенола рН 7,4	25 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	25 °С Увеличение количества ВМБ на день 21 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 21 относительно дня 0 (%)
2,5 Zn/6 инс.+10 мМ NaCl	0,20	0,32	0,64	0,83
4,0 Zn/6 инс.+10 мМ NaCl	0,23	0,31	0,62	1,05
7,0 Zn/6 инс.+10 мМ NaCl	0,08	0,11	0,38	0,89
2,5 Zn/6 инс.+50 мМ NaCl	0,24	0,33	0,83	1,39

Таблица 14

1,5 мМ вещества 16 10 мМ <i>m</i> -крезола 15 мг/мл глицерина рН 7,4	25 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	25 °С Увеличение количества ВМБ на день 21 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 21 относительно дня 0 (%)
30 мМ фенола + 2,5 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	0,12	0,16	0,46	0,69

30 мМ фенола + 7,0 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	0,05	0,08	0,27	0,43
30 мМ фенола + 2,5 Zn/6 инс. + 50 мМ NaCl	0,15	0,22	0,46	0,70
60 мМ фенола + 7,0 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	0,03	0,06	0,22	0,39
45 мМ фенола + 4,0 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	0,13	0,18	0,47	0,72
45 мМ фенола + 5,5 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	0,09	0,12	0,33	0,54

Таблица 15

1,5 мМ вещества 16 20 мМ NaCl 15 мг/мл глицерина рН 7,4 4,5 Zn/6 инс.	25 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	25 °С Увеличение количества ВМБ на день 21 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 21 относительно дня 0 (%)
15 мМ фенола + 10 мМ <i>м</i> -крезола	0,07	0,15	0,42	0,63
35 мМ фенола + 10 мМ <i>м</i> -крезола	0,02	0,07	0,31	0,63
25 мМ фенола + 25 мМ <i>м</i> -крезола	0,10	0,13	0,44	0,75

Из таблиц, приведенных выше, можно видеть, что количество ВМБ в составах ацилированных инсулинов, раскрытых в этом документе, очень медленно увеличивается с течением времени, из чего следует, что все составы ацилированных инсулинов, описанные выше, характеризуются превосходной химической стабильностью.

Определение количества родственных соединений

Содержание родственных инсулину соединений определяли с помощью

высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Waters Kromasil 300A-5 мкм-С4 (4,6×150 мм) (температура колонки: 40 °С; температура кюветы для образца: 10 °С; скорость потока элюирующей фазы: 1,0 мл/мин). Элюирование выполняли с помощью подвижной фазы, состоящей из:

фаза А: 0,18 М безводный сульфат дигидрат и 10% ацетонитрил (об./об.), pH доведен до 2,3 85% фосфорной кислотой; и

фазы В: 75% ацетонитрила (об./об.).

Градиент: изократический градиент 48%/52% А/В от 0 мин до 40 мин, линейное изменение до 0%/100% А/В от 40 мин до 51 мин и линейное изменение 48%/52% А/В от 51 мин до 65 мин.

В таблицах 16–17 показано увеличение содержания родственных соединений в день 14 и/или в день 21 относительно дня 0 после хранения при температуре 25 °С и/или 37 °С.

Таблица 16

1,2 мМ вещества 16 10 мМ <i>m</i> -крезола 15 мг/мл глицерина 30 мМ фенола pH 7,4	25 °С Увеличение количества родственных соединений в день 14 относительно дня 0 (%)	25 °С Увеличение количества родственных соединений в день 21 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества родственных соединений в день 14 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества родственных соединений в день 21 относительно дня 0 (%)
2,5 Zn/6 инс.+10 мМ NaCl	0,65	0,68	1,67	2,37
4,0 Zn/6 инс.+10 мМ NaCl	0,63	0,67	2,26	2,42
7,0 Zn/6 инс.+10 мМ NaCl	0,40	0,47	1,13	2,12
2,5 Zn/6 инс.+50 мМ NaCl	0,67	0,83	1,67	2,43

Таблица 17

1,5 мМ вещества 16	25 °С	37 °С	37 °С
--------------------	-------	-------	-------

10 мМ <i>m</i> -крезола 15 мг/мл глицерина рН 7,4	Увеличение количества родственных соединений в день 21 относительно дня 0 (%)	Увеличение количества родственных соединений в день 14 относительно дня 0 (%)	Увеличение количества родственных соединений в день 21 относительно дня 0 (%)
30 мМ фенола + 2,5 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	0,76	1,08	1,66
30 мМ фенола + 7,0 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	0,60	1,10	1,58
30 мМ фенола + 2,5 Zn/6 инс. + 50 мМ NaCl	0,97	1,28	1,72
60 мМ фенола + 7,0 Zn/6 инс. + 10 мМ NaCl	0,51	1,04	1,50
45 мМ фенола + 4,0 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	0,77	1,14	1,53
45 мМ фенола + 5,5 Zn/6 инс. + 30 мМ NaCl	0,59	1,11	1,25

Таблица 18

1,5 мМ вещества 16 20 мМ NaCl 15 мг/мл глицерина рН 7,4 4,5 Zn/6 инс.	37 °C Увеличение количества родственных соединений в день 14 относительно дня 0 (%)	37 °C Увеличение количества родственных соединений в день 21 относительно дня 0 (%)
15 мМ фенола + 10 мМ <i>m</i> -крезола	0,60	0,60
35 мМ фенола + 10 мМ <i>m</i> -крезола	0,37	0,52
25 мМ фенола + 25 мМ <i>m</i> -крезола	0,55	0,95

Из таблиц, приведенных выше, можно видеть, что количество родственных инсулину соединений в составах ацилированных инсулинов, раскрытых в этом документе, также очень медленно увеличивается с течением времени, из чего следует, что все составы ацилированных инсулинов исключительно стабильны.

Пример 22.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности композиций с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе.

Композиции с ацилированными инсулинами

Вещество 16 растворяли в 10 мМ динатрия гидрофосфате (50% в конечном объеме) до концентрации, в два раза превышавшей конечную концентрацию инсулина, а затем доводили pH до конечного значения с помощью 4% NaOH. Хорошо смешивали фенол, *m*-крезол, глицерин и хлорид натрия в соответствии с количествами компонентов, указанных в таблице ниже, добавляли смесь к раствору вещества 16 и доводили pH до конечного значения. К раствору вещества 16 добавляли ацетат цинка тремя равными порциями в соответствии с количеством, указанным в таблице ниже, и доводили pH до конечного значения. Получали составы ацилированного инсулина с конечной концентрацией инсулина 1,5 мМ (11,74 мг/мл).

Содержание ВМБ определяли по методикам, аналогичным описанным в примере 19, а изменения в содержании родственных соединений определяли по методикам, аналогичным описанным в примере 21. В таблицах 19 и 20, приведенных ниже, показаны изменения количества ВМБ и родственных соединений в составах с ацилированными инсулинами различных формул.

Таблица 19

1,5 мМ вещества 16 10 мМ <i>m</i> -крезола 17 мг/мл глицерина 45 мМ фенола 2,2 Zn/6 инс. 20 мМ NaCl 5 мМ динатрия гидрофосфата	25 °C Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	25 °C Увеличение количества ВМБ на день 28 относительно дня 0 (%)	37 °C Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	37 °C Увеличение количества ВМБ на день 28 относительно дня 0 (%)
pH 6,5	0,10	0,19	0,53	1,11

pH 7,0	0,14	0,24	0,47	0,89
pH 7,5	0,14	0,27	0,44	0,96
pH 8,0	0,14	0,34	0,61	1,62

Таблица 20

1,5 мМ вещества 16 10 мМ <i>m</i> -крезола 17 мг/мл глицерина 45 мМ фенола 2,2 Zn/6 инс. 20 мМ NaCl 5 мМ динатрия гидрофосфата	25 °С Увеличение количества родственных соединений в день 14 относительно дня 0 (%)	25 °С Увеличение количества родственных соединений в день 21 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества родственных соединений в день 14 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества родственных соединений в день 21 относительно дня 0 (%)
pH 6,5	0,71	0,76	1,45	1,81
pH 7,0	0,55	0,71	1,09	1,36
pH 7,5	0,63	0,69	1,11	1,46
pH 8,0	0,63	0,58	1,33	2,14

Из таблиц, приведенных выше, можно видеть, что количество ВМБ и родственных соединений в составах с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе, относительно медленно увеличивается с течением времени, из чего следует, что все составы с ацилированными инсулинами, полученные по настоящему изобретению, характеризуются хорошей химической стабильностью.

Пример 23

Фармакодинамическое исследование у крыс со стрептозотоцин (STZ)-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1)

Самок крыс возрастом 8 недель и массой 180–220 г содержали в клетках для кормления соответствующего размера (5 крыс/клетка) в огороженном пространстве со свободным доступом к стандартной пище и очищенной воде; относительную влажность в помещении контролировали на уровне 40–60%, а температуру — на уровне 22–24 °С. После периода адаптации длительностью 4 дня крыс выдерживали без корма в течение 12 ч, после чего им внутрибрюшинно вводили раствор стрептозотоцина (Sigma) (10 мг/мл, в 0,1 М цитратном буфере) в дозе 60 мг/кг. После выполнения инъекции в питьевую воду добавляли надлежащее количество глюкозы (20%), чтобы предотвратить развитие у крыс внезапной

гипогликемии, а еще через 12 ч добавку глюкозы отменяли. Через 4 дня после введения стрептозотоцина проводили выборочное определение уровней глюкозы в крови, и крыс с уровнем глюкозы крови выше 20 ммоль/л отбирали в качестве модельных крыс с СДТ1 для последующего эксперимента.

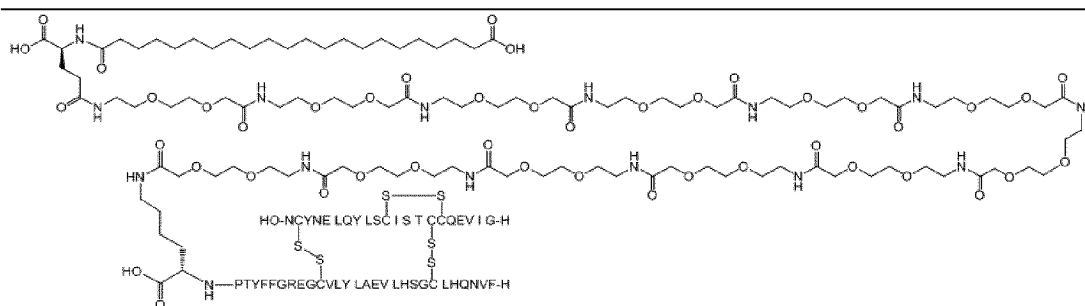
В момент времени -1/1 ч (9:30) в день эксперимента до его начала у крыс определяли исходный уровень глюкозы в крови и массу тела. На основании выборочного определения уровня глюкозы в крови и массы тела крыс определяли либо в группу растворителя, либо в экспериментальные группы и подвергали следующим процедурам: подкожная инъекция растворителя либо подкожная инъекция патентуемых веществ из сравнительного примера 5 и примера 2 (вещество 2) в дозе 67 Ед/кг, причем растворитель содержал 60 мМ фенола, 15 мг/мл глицерина, 15 мМ динатрия гидрофосфата и 10 мМ натрия хлорида и имел pH 7,6. Ацилированный инсулин растворяли в растворителе до концентрации введения 67 Ед/мл, и объем введения составлял 1 мл/кг (т. е. 0,1 мкл/100 г массы тела). Введение осуществляли однократно путем подкожной инъекции (п/к) в загривок. Ацилированный инсулин вводили примерно в 9:30–10:00 (момент времени 0), а уровень глюкозы в крови крыс оценивали через 3 ч, 6 ч, 9 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч и 120 ч после введения.

Для каждой крысы, получившей однократную инъекцию ацилированного инсулина (контрольное вещество 5, вещество 2), строили кривую зависимости ответа от дозы, отражающую зависимость уровня глюкозы в крови от времени. Для иллюстрации влияния ацилированных инсулинов на уровень глюкозы в крови, для каждой индивидуальной кривой зависимости ответа от дозы рассчитывали площадь под кривой изменения уровня глюкозы крови во времени (AUC) от момента времени 0 до конечной точки мониторинга. Чем меньше значение AUC, тем лучше гипогликемический эффект и тем лучше лекарственный эффект.

ФИГ. 7a–7d показывают, что гипогликемический эффект контрольного вещества 5 у самок крыс с сахарным диабетом I типа (СДТ1) превосходит эффект ацилированного инсулина (вещество 2).

Пример 24.

Человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30 (вещество 17)



Человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30 был получен по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 1.

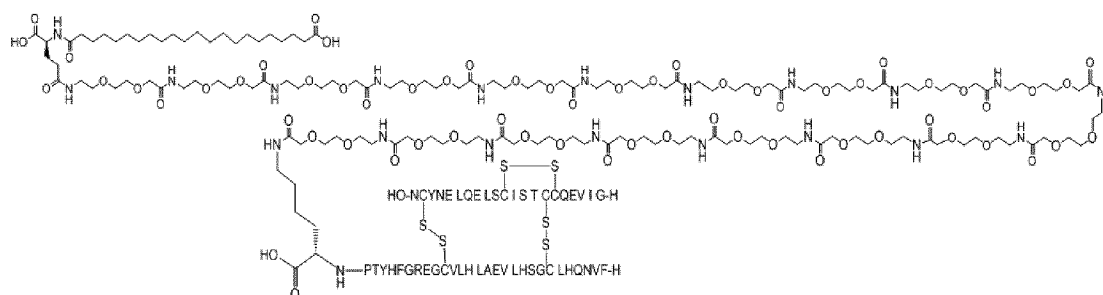
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1585,98[M+5H]^{5+}$

Промежуточное вещество *tert*-бутил-докозандиоил-γGlu-(12×OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 3 примера 1.

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 2451,38(M+1)^+$

Пример 25.

Человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30 (вещество 18)



Вещество

человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 сравнительного примера 5.

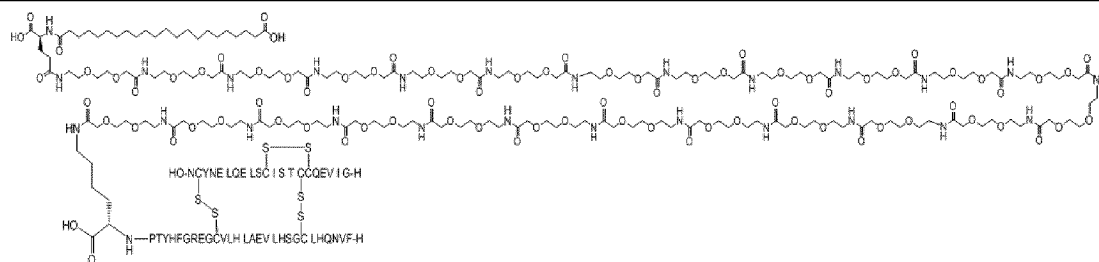
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1247,47[M+7H]^{7+}$

Промежуточное вещество *tert*-бутил-докозандиоил-γGlu-(18×OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 сравнительного примера 5.

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 3320,83(M+1)^+$

Пример 26.

Человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-24×OEG), desB30 (вещество 19)



Вещество человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-24×OEG), desB30 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 сравнительного примера 5.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 873,35[M+11H]^{11+}$

Промежуточное вещество *трет*-бутил-докозандиоил-γGlu-(24×OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 сравнительного примера 5.

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 4192,27(M+1)^+$

Пример 27.

Способность связывания с рецепторами производных инсулина, раскрытых в данном документе

Это исследование предназначено для демонстрации способности связывания производных инсулина, раскрытых в данном документе, с инсулиновым рецептором.

Вещество 15, раскрытое в данном документе, и контрольное вещество 5 исследовали методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на способность связывания с внеклеточным доменом his-меченого инсулинового рецептора A (IRA, Sino Biological) в отсутствие человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и в присутствии 2% ЧСА. Образцы разводили рабочим буфером (Cytiva) или рабочим буфером, содержащим 2,0% ЧСА, так что концентрация вещества 15 в испытуемом образце и концентрация контрольного вещества 5 составляли 12 800 нМ и 25 600 нМ. Выбирали чувствительный чип NTA (Cytiva) для проведения анализа ППР на приборе Biacore T200 (Cytiva) при температуре 25 °C. Вводили 0,5 M NiCl₂ (Cytiva) при скорости потока 10 мкл/мин в течение 60 с, после чего следовала промывка с помощью буфера HBS-EP (Cytiva). Вводили 3 мкг/мл рецептора IRA при скорости потока 5 мкл/мин в течение 180 с, чтобы обеспечить связывание рецептора IRA на поверхности чипа. Затем образец исследуемого производного инсулина вводили со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 60 с, после чего проводили диссоциацию в течение 60 с. После каждой инъекции образца вводили 350 mM ЭДТК (Cytiva) при скорости потока 10 мкл/мин в течение 60 с для регенерации чипа, и, наконец, после промывки буфером HBS-P (Cytiva) получали возможность проводить исследование

следующего образца. В качестве значения, характеризующего способность связываться с рецептором, выбирали значение отклика за 4 с до начала диссоциации образца; для каждого образца испытание повторяли 3 раза. Результаты испытания показаны на ФИГ. 8a и 8b.

ФИГ. 8a и 8b иллюстрируют способность вещества 15 и контрольного вещества 5 связываться с рецептором в присутствии 2% ЧСА (имитация физиологических условий) и в отсутствие ЧСА (0% ЧСА). Из ФИГ. 8a и 8b можно видеть, что вещество 15 неожиданным образом обладает значительно более высокой способностью связываться с рецептором в присутствии 2% ЧСА, чем контрольное вещество 5, и при этом в случае производного инсулина, раскрытого в этом документе (вещества 15), альбумин влияет на способность связываться с рецептором в заметно меньшей степени, чем в случае контрольного вещества 5.

Пример 28.

Способность связывания с рецепторами производных инсулина, раскрытых в данном документе

Это исследование предназначено для демонстрации способности связывания производных инсулина, раскрытых в данном документе, с инсулиновым рецептором.

Производное инсулина, раскрытое в этом документе (вещество 17), и контрольное вещество 2 были подвергнуты испытанию на способность связываться с рецептором инсулина A (IRA) в отсутствие человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и в присутствии 2% ЧСА. Испытание проводили примерно так же, как описано в примере 27, за исключением того, что концентрация вещества 17 в испытуемом образце и концентрация контрольного вещества 2 составляли 400 нМ. Результаты испытания показаны на ФИГ. 9.

На ФИГ. 9 показана способность связывания с рецептором вещества 17 и контрольного вещества 2 в присутствии 2% ЧСА (имитация физиологических условий) относительно 0% ЧСА. Из ФИГ. 9 можно видеть, что вещество 17 обладает значительно более высокой способностью связываться с рецептором в присутствии 2% ЧСА, чем контрольное вещество 2, и при этом в случае производного инсулина, раскрытого в этом документе (вещества 17), альбумин влияет на способность связываться с рецептором в заметно меньшей степени, чем в случае контрольного вещества 2.

Это говорит о том, что производные инсулина, раскрытые в этом документе, например вещество 17, неожиданным образом обладают значительно более высокой способностью связываться с рецептором в присутствии альбумина, чем контрольное вещество 2, и при

этом в случае производных инсулина, раскрытых в этом документе, альбумин влияет на способность связываться с рецептором в заметно меньшей степени, чем в случае контрольного вещества 2.

Пример 29.

Способность связывания с рецепторами производных инсулина, раскрытых в данном документе

Это исследование предназначено для демонстрации способности связывания производных инсулина, раскрытых в данном документе, с инсулиновым рецептором.

Производные инсулина, раскрытые в этом документе (вещество 16 и вещество 18), и контрольное вещество 5 были подвергнуты испытанию на способность связываться с рецептором IRA в отсутствие человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и в присутствии 2% ЧСА. Испытание проводили примерно так же, как описано в примере 27.

Результаты испытания показаны на ФИГ. 10a и 10b.

ФИГ. 10a и 10b иллюстрируют способность вещества 16, вещества 18 и контрольного вещества 5 связываться с рецептором в присутствии 2% ЧСА (имитация физиологических условий) и в отсутствие ЧСА (0% ЧСА). Из ФИГ. 10a и 10b можно видеть, что вещество 16 и вещество 18 неожиданным образом обладают значительно более высокой способностью связываться с рецептором в присутствии 2% ЧСА, чем контрольное вещество 5, и при этом в случае производных инсулина, раскрытых в этом документе, альбумин влияет на способность связываться с рецептором в заметно меньшей степени, чем в случае контрольного вещества 5.

Настоящее изобретение проиллюстрировано приведенными выше примерами, однако следует понимать, что приведенные выше примеры служат только для иллюстративных и описательных целей и не предназначены для ограничения настоящего изобретения объемом описанных примеров. Кроме того, специалистам в данной области будет понятно, что настоящее изобретение не ограничивается примерами, описанными выше, и что многие вариации и модификации могут выполняться в соответствии с принципами настоящего изобретения, все из которых входят в заявленный объем настоящего изобретения. Объем правовой охраны настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO 1:

А-цепь человеческого инсулина desB30:

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

SEQ ID NO 2:

В-цепь человеческого инсулина desB30:

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

SEQ ID NO 3:

А-цепь человеческого инсулина A14E, B16H, B25H, desB30:

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

SEQ ID NO 4:

В-цепь человеческого инсулина A14E, B16H, B25H, desB30:

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

SEQ ID NO 5:

А-цепь человеческого инсулина A14E, B16E, B25H, desB30:

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

SEQ ID NO 6:

В-цепь человеческого инсулина A14E, B16E, B25H, desB30:

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

SEQ ID NO 7:

А-цепь человеческого инсулина:

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

SEQ ID NO 8:

В-цепь человеческого инсулина:

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

SEQ ID NO 9:

А-цепь человеческого инсулина A21G:

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

SEQ ID NO 10:

В-цепь человеческого инсулина A21G:

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

SEQ ID NO 11:

А-цепь человеческого инсулина A21G, desB30:

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

SEQ ID NO 12:

В-цепь человеческого инсулина A21G, desB30:

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

SEQ ID NO 13:

А-цепь человеческого инсулина B28D:

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

SEQ ID NO 14:

В-цепь человеческого инсулина B28D:

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

SEQ ID NO 15:

Пептид GLP-1-(7-37)

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile
Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

SEQ ID NO 16:

Пептид [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile
Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly

SEQ ID NO 17:

Пептид [Arg34]GLP-1-(7-37)

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile
Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Производное инсулина, включающее исходный инсулин, альбумин-связывающий остаток и линкер Lin, где исходный инсулин представляет собой природный инсулин или аналог инсулина, а альбумин-связывающий остаток связан с исходным инсулином через линкер Lin, где

линкер Lin представляет собой гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 40, предпочтительно по меньшей мере 50, предпочтительно по меньшей мере 65, предпочтительно по меньшей мере 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120 атомов углерода; или линкер Lin содержит по меньшей мере 11 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; предпочтительно линкер Lin содержит по меньшей мере 12 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; предпочтительно линкер Lin содержит 12–20 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; или линкер Lin содержит алкиленгликоль, содержащий по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 42, предпочтительно 15–120, предпочтительно 30–100, предпочтительно 42–80 атомов углерода; и

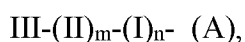
альбумин-связывающий остаток содержит 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток содержит линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа.

2. Производное инсулина по пункту 1, где исходный инсулин содержит по меньшей мере один остаток лизина, и альбумин-связывающий остаток связан с аминокислотной группой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через линкер Lin.

3. Производное инсулина по пункту 1 или 2, где производное инсулина

дополнительно содержит один или более линкеров II, причем линкер II представляет собой кислотный аминокислотный остаток, и линкер II обеспечивает связывание между альбумин-связывающим остатком и линкером Lin и/или между линкером Lin и исходным инсулином, и предпочтительно обеспечивает связывание между альбумин-связывающим остатком и линкером Lin.

4. Производное инсулина, которое представляет собой ацилированный инсулин, причем исходный инсулин ацилированного инсулина является природным инсулином или аналогом инсулина и содержит по меньшей мере один остаток лизина, и ацильный фрагмент ацилированного инсулина связан с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина, причем ацильная группа представлена формулой (A):



где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и n является целым числом, равным или большим 11, предпочтительно целым числом от 11 до 30;

I представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

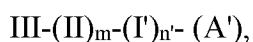
III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–24) атомов углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I, представленных в формуле (A), может быть изменен независимым образом;

или

ацильная группа представлена формулой (A'):



где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и n' является целым числом;

I' представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

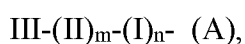
III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–24) атомов углерода, причем, формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I' соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I', представленных в формуле (A'), может быть изменен независимым образом; и

общее количество атомов углерода в (I')_{n'} составляет 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 42–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120.

5. Производное инсулина, которое представляет собой ацилированный инсулин, причем исходный инсулин ацилированного инсулина является природным инсулином или аналогом инсулина и содержит по меньшей мере один остаток лизина, и ацильный фрагмент ацилированного инсулина связан с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина, причем ацильная группа представлена формулой (A):



где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и n равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20;

I представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

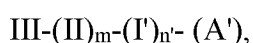
III представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–24) атомов углерода, причем, формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I, представленных в формуле (A), может быть изменен независимым образом;

или

ацильная группа представлена формулой (A'):



NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₃-O-CH₂-CO- или -HN-(CH₂)₄-O-(CH₂)₄-O-CH₂-CO-; предпочтительно I представляет собой -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-; или I' представляет собой -HN-(CH₂-CH₂-O)₂₀-CH₂-CO-, -HN-(CH₂-CH₂-O)₂₂-CH₂-CO-, -HN-(CH₂-CH₂-O)₂₄-CH₂-CO- или -HN-(CH₂-CH₂-CH₂-O)₁₅-CH₂-CO-; и/или

II представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей γ Glu, α Glu, β Asp, α Asp, γ -D-Glu, α -D-Glu, β -D-Asp и α -D-Asp; предпочтительно II выбран из γ Glu и β Asp; и/или

III представляет собой HOOC-(CH₂)₁₈-CO-, HOOC-(CH₂)₁₉-CO-, HOOC-(CH₂)₂₀-CO-, HOOC-(CH₂)₂₁-CO-, HOOC-(CH₂)₂₂-CO- или HOOC-(CH₂)₂₄-CO-; предпочтительно III представляет собой HOOC-(CH₂)₁₈-CO-, HOOC-(CH₂)₁₉-CO-, HOOC-(CH₂)₂₀-CO-, HOOC-(CH₂)₂₁-CO- или HOOC-(CH₂)₂₂-CO-; предпочтительно III представляет собой HOOC-(CH₂)₁₈-CO-, HOOC-(CH₂)₂₀-CO- или HOOC-(CH₂)₂₂-CO-.

8. Производное инсулина по любому из пунктов 4–7, где формула (A) связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через С-концевую часть I, или формула (A') связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через С-концевую часть I'.

9. Производное инсулина по любому из пунктов 4–8, где ацильная группа связана с ϵ -аминогруппой остатка лизина исходного инсулина.

10. Производное инсулина по любому из пунктов 1–9, где остаток лизина исходного инсулина находится в положении B29.

11. Производное инсулина по любому из пунктов 1–10, где исходный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, desB30; человеческий инсулин; человеческий инсулин A21G; человеческий инсулин A21G, desB30; и человеческий инсулин B28D; предпочтительно исходный инсулин представляет собой человеческий инсулин desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30; или человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, desB30.

12. Производное инсулина по пункту 4, где ацилированный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-11 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-12 $\times$ OEG), desB30;

[illegible]

B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-13×OEG-γGlu-γGlu), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-βAsp-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-βAsp-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-αGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-αGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αAsp-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αAsp-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; человеческий инсулин and A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-24×OEG), desB30.

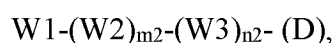
13. Производное инсулина по пункту 4 или 5, где ацилированный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30;

инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-16×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-17×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-19×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-19×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-20×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-20×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-16×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-17×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-16×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-17×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-19×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-19×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-20×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-20×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-16×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-17×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-16×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-17×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-19×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-19×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-20×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-20×OEG), desB30; человеческий инсулин and A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-24×OEG), desB30.

14. Производное инсулина по пункту 4 или 5, где ацилированный инсулин выбран

из группы, включающей человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16 E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16 E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; и человеческий инсулин A14E, B16 E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

15. Производное инсулина, которое представляет собой ацилированный инсулин, где исходный инсулин ацилированного инсулина представляет собой человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30 или человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, desB30, а ацильная группа ацилированного инсулина связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина, причем ацильная группа представлена формулой (A):



где:

m2 равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и n2 равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20;

W3 представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

W2 представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

W1 представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

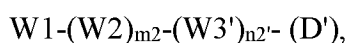
W1, W2 и W3 соединены амидными связями; и

порядок расположения W2 и W3, представленных в формуле (D), может быть

изменен независимым образом;

или

ацильная группы представлена формулой (D'):



где:

$m2$ равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и $n2'$ является целым числом;

$W3'$ представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

$W2$ представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

$W1$ представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

$W1$, $W2$ и $W3'$ соединены амидными связями;

порядок расположения $W2$ и $W3'$, представленных в формуле (D'), может быть изменен независимым образом; и

общее количество атомов углерода в $(W3')_{n2'}$ составляет 30–180, предпочтительно 42–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120.

16. Производное инсулина по пункту 15, где

$n2$ равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19; предпочтительно $n2$ равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18; предпочтительно $n2$ равно 11, 12, 13, 14, 15 или 16; предпочтительно $n2$ равно 11, 12, 13, 14 или 15; и/или

$m2$ является целым числом от 1 до 6; предпочтительно $m2$ равно 1, 2, 3 или 4; предпочтительно $m2$ равно 1 или 2; предпочтительно $m2$ равно 1; и/или

$W1$ представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–23 атома углерода; предпочтительно $W1$ представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20, 21 или 22 атома углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа.

17. Производное инсулина по пункту 15 или 16, где

$W3$ представляет собой: $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-$

$(\text{CH}_2)_4\text{-O-(CH}_2)_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_4\text{-O-(CH}_2)_3\text{-NH-CO-(CH}_2)_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_3\text{-NH-CO-(CH}_2)_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-NH-CO-(CH}_2)_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ или $\text{-HN-(CH}_2)_4\text{-O-(CH}_2)_4\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; предпочтительно W3 представляет собой $\text{-HN-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; или W3' представляет собой $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{20}\text{-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{22}\text{-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{24}\text{-CH}_2\text{-CO-}$ или $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{15}\text{-CH}_2\text{-CO-}$; и/или

W2 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей γGlu , αGlu , βAsp , αAsp , $\gamma\text{-D-Glu}$, $\alpha\text{-D-Glu}$, $\beta\text{-D-Asp}$ и $\alpha\text{-D-Asp}$; предпочтительно W2 выбран из γGlu и βAsp ; и/или

W1 представляет собой $\text{HOOC-(CH}_2)_{18}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{19}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{20}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{21}\text{-CO-}$ или $\text{HOOC-(CH}_2)_{22}\text{-CO-}$; предпочтительно W1 представляет собой $\text{HOOC-(CH}_2)_{18}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{20}\text{-CO-}$ или $\text{HOOC-(CH}_2)_{22}\text{-CO-}$.

18. Производное инсулина по любому из пунктов 15–17, где формула (D) связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через С-концевую часть W3, или формула (D') связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через С-концевую часть W3'.

19. Производное инсулина по любому из пунктов 15–18, где ацильная группа связана с ϵ -аминогруппой остатка лизина исходного инсулина.

20. Производное инсулина по пункту 4, 5 или 15, где производное инсулина выбрано из группы, включающей человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- $\gamma\text{Glu-12}\times\text{OEG}$), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- $\gamma\text{Glu-12}\times\text{OEG}$), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- $\gamma\text{Glu-11}\times\text{OEG}$), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- $\gamma\text{Glu-11}\times\text{OEG}$), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-генэйкозандиоил- $\gamma\text{Glu-12}\times\text{OEG}$), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-tricosanedioyl- $\gamma\text{Glu-12}\times\text{OEG}$), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-тетракозандиоил- $\gamma\text{Glu-12}\times\text{OEG}$), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- $\gamma\text{Glu-}$

13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин and A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая производное инсулина по любому из пунктов 1–20 и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

22. Фармацевтическая композиция по пункту 21, где фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере 1,5 моль ионов цинка/6 моль ацилированного инсулина; предпочтительно по меньшей мере 2,2 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина; предпочтительно по меньшей мере 3,5 моль ионов цинка/6 моль производных производного инсулина; предпочтительно по меньшей мере 4,5 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина; предпочтительно 2,2–12 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина; более предпочтительно 4,5–10 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина; более предпочтительно 4,5–8 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина; более предпочтительно 4,5–7,5 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина; более предпочтительно 4,5–7,0 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина; или более предпочтительно 4,5–6,5 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина; и/или

фармацевтическая композиция имеет pH в диапазоне от 6,5 до 8,5; предпочтительно pH составляет 6,8–8,2; предпочтительно pH составляет 7,0–8,2; предпочтительно pH составляет 7,2–7,6; более предпочтительно pH составляет 7,4 или 7,6.

23. Фармацевтическая композиция по пункту 22, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит глицерин, фенол, *m*-крезол, NaCl и/или Na₂HPO₄; предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит глицерин, фенол и NaCl; предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит глицерин, фенол, *m*-крезол и NaCl; предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит глицерин, фенол, NaCl и Na₂HPO₄; более предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит глицерин, фенол, *m*-крезол, NaCl и Na₂HPO₄.

24. Фармацевтическая композиция по пункту 23, в которой содержание глицерина

составляет не более примерно 2,5% (масс./масс.), предпочтительно не более примерно 2% (масс./масс.), предпочтительно от примерно 0,3% до примерно 2% (масс./масс.), предпочтительно от примерно 0,5% до примерно 1,8% (масс./масс.), предпочтительно от примерно 0,7% до примерно 1,8% (масс./масс.), более предпочтительно от примерно 1% до примерно 1,8% (масс./масс.); и/или

содержание фенола составляет примерно 16–80 мМ, предпочтительно примерно 25–75 мМ, предпочтительно примерно 30–70 мМ, предпочтительно примерно 45–70 мМ, предпочтительно примерно 45–65 мМ, предпочтительно примерно 45 мМ, примерно 46 мМ, примерно 47 мМ, примерно 48 мМ, примерно 49 мМ, примерно 50 мМ, примерно 51 мМ, примерно 52 мМ, примерно 53 мМ, примерно 54 мМ, примерно 55 мМ, примерно 56 мМ, примерно 57 мМ, примерно 58 мМ, примерно 59 мМ, примерно 60 мМ, примерно 61 мМ, примерно 62 мМ, примерно 63 мМ, примерно 64 мМ или примерно 65 мМ; и/или

содержание *m*-крезола составляет примерно 0–35 мМ, предпочтительно примерно 0–19 мМ, более предпочтительно примерно 0–15 мМ, наиболее предпочтительно примерно 0 мМ, примерно 1 мМ, примерно 2 мМ, примерно 3 мМ, примерно 4 мМ, примерно 5 мМ, примерно 6 мМ, примерно 7 мМ, примерно 8 мМ, примерно 9 мМ, примерно 10 мМ, примерно 11 мМ, примерно 12 мМ, примерно 13 мМ, примерно 14 мМ или примерно 15 мМ; и/или

содержание NaCl составляет примерно 0–150 мМ, предпочтительно примерно 5–120 мМ, предпочтительно примерно 10–120 мМ, предпочтительно примерно 10–100 мМ, более предпочтительно примерно 10–75 мМ, более предпочтительно примерно 10–50 мМ, более предпочтительно примерно 10–30 мМ; и/или

содержание Na_2HPO_4 составляет примерно 0–75 мМ, предпочтительно примерно 5–60 мМ, предпочтительно менее примерно 50 мМ, более предпочтительно менее примерно 25 мМ или, более предпочтительно менее примерно 15 мМ; и/или

содержание ацилированного инсулина составляет более примерно 0,3 мМ, предпочтительно более примерно 0,6 мМ, предпочтительно примерно 0,3–12 мМ, предпочтительно примерно 0,6–9,0 мМ, предпочтительно примерно 0,6–8,4 мМ, предпочтительно примерно 0,6–7,2 мМ, предпочтительно примерно 0,6–6,0 мМ, предпочтительно примерно 0,6–4,2 мМ, предпочтительно примерно 0,6–3,6 мМ, предпочтительно примерно 0,6–3,0 мМ, предпочтительно примерно 0,6–2,4 мМ, предпочтительно примерно 0,6–2,1 мМ, предпочтительно примерно 0,6–1,2 мМ.

25. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 21–24, в которой производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-13×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-14×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-15×OEG), desB30; где предпочтительно ацилированный инсулин представляет собой человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая примерно 0,6–4,2 мМ производного инсулина по любому из пунктов 1–20, от примерно 1% до примерно 1,8% (масс./масс.) глицерина, примерно 45–65 мМ фенола, примерно 4,5–6,5 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина, примерно 10–120 мМ хлорида натрия и примерно 0–15 мМ м-крезола и имеющая рН примерно 7,0–8,2, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG),

desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая от примерно 0,6 до примерно 1,2 мМ производного инсулина по любому из пунктов 1–20, 1,7% (масс./масс.) глицерина, примерно 45 мМ фенола, примерно 10 мМ *m*-крезола, примерно 6,5 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина, примерно 20 мМ хлорида натрия и имеющая рН примерно 7,0–8,0, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

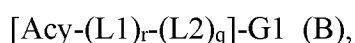
28. Фармацевтическая композиция, содержащая примерно 0,6–4,2 мМ производного инсулина по любому из пунктов 1–20, от примерно 1% до примерно 2% (предпочтительно примерно 1,5–1,7%) (масс./масс.) глицерина, примерно 15–60 мМ (предпочтительно примерно 30–60 мМ; более предпочтительно примерно 45–60 мМ) фенола, примерно 0–25 мМ (предпочтительно примерно 0–10 мМ) *m*-крезола, примерно 1,5–7,0 (предпочтительно примерно 2,2–4,5) моль ионов цинка/6 моль производного инсулина, примерно 10–120 мМ (предпочтительно примерно 20–50 мМ) хлорида натрия и имеющая рН примерно 7,0–8,0, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-11×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-11×OEG),

desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая примерно 1,2–1,5 мМ инсулина по любому из пунктов 1–20, примерно 1,5–1,7% (масс./масс.) глицерина, примерно 45–60 мМ фенола, примерно 0–10 мМ *m*-крезола, примерно 2,2–2,5 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина и примерно 20 мМ хлорида натрия и имеющая pH примерно 7,0–8,0, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×OEG), desB30.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 21–29, дополнительно содержащая инсулинотропное вещество GLP-1, причем предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит инсулинотропное вещество GLP-1, выбранное из группы, включающей пептид *N*-ε²⁶-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноил[Arg34]GLP-1-(7-37), пептид *N*-ε²⁶-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37), пептид *N*-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноиламино]этокс)этокс]ацетиламино)этокс]этокс]ацетил][Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37) и пептид *N*-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноиламино]этокс)этокс]ацетиламино)этокс]этокс]ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37).

31. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 21–29, дополнительно содержащая инсулинотропное вещество GLP-1, представленное формулой (B), или его фармацевтически приемлемую соль, амид или сложный эфир:



где G1 является аналогом GLP-1, несущим Arg и Ala или Gly, соответственно, в положении 34 и в положении 8, соответственно, GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 15), и [Asu-(L1)_r-(L2)_q] является заместителем, присоединенным к ε-аминогруппе остатка Lys в положении 26 аналога GLP-1, где

r — целое число от 1 до 10, а *q* равно 0 или представляет собой целое число от 1 до 10;

Асу представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

L1 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей γ Glu, α Glu, β Asp, α Asp, γ -D-Glu, α -D-Glu, β -D-Asp и α -D-Asp;

L2 представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

Асу, L1 и L2 соединены амидными связями; и

порядок расположения L1 и L2, представленный в формуле (B), может быть изменен независимым образом.

32. Фармацевтическая композиция по пункту 31, в которой:

G1 представляет собой пептид [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) (SEQ ID NO: 16) или пептид [Arg34]GLP-1-(7-37) (SEQ ID NO: 17), и предпочтительно представляет собой пептид [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37); и/или

г равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6; предпочтительно г равно 1, 2, 3 или 4; предпочтительно г равно 1 или 2; предпочтительно г равно 1; и/или

q равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; предпочтительно q равно 0, 1, 2, 3 или 4; более предпочтительно, q равно 0, 1 или 2; и/или

Асу представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–23 атома углерода, и предпочтительно Асу представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20, 21 или 22 атома углерода, причем формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа.

33. Фармацевтическая композиция по пункту 31 или 32, где:

L2 представляет собой: $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$,

$-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-$

$(\text{CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ или $\text{-HN-(CH}_2)_4\text{-O-(CH}_2)_4\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; предпочтительно L2 представляет собой $\text{-HN-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; и/или

L1 выбран из γGlu и βAsp ; предпочтительно L1 представляет собой γGlu ; и/или

Асу представляет собой $\text{HOOC-(CH}_2)_{18}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{19}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{20}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{21}\text{-CO-}$ или $\text{HOOC-(CH}_2)_{22}\text{-CO-}$; предпочтительно Асу представляет собой $\text{HOOC-(CH}_2)_{18}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2)_{20}\text{-CO-}$ или $\text{HOOC-(CH}_2)_{22}\text{-CO-}$.

34. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 31–33, где Асу, L1 и L2 в формуле (В) последовательно соединены амидными связями, и С-конец L2 присоединен к ϵ -аминогруппе остатка Lys в положении 26 аналога GLP-1.

35. Фармацевтическая композиция по пунктам 31–34, где инсулинотропное вещество GLP-1 выбрано из группы, включающей

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-карбоксихекозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[19-карбоксихекозаноиламино]-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-карбоксигептэкозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[21-карбоксигептэкозаноиламино]-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(23-карбокситрикозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[23-карбокситрикозаноиламино]-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(23-карбокситрикозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(19-карбоксихекозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(21-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-карбокситрикозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино)этоксид)этоксид)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[19-карбокситрикозаноиламино]-4(S)-карбоксибутаноиламино)этоксид)этоксид)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино)этоксид)этоксид)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[21-карбоксигенэйкозаноиламино]-4(S)-карбоксибутаноиламино)этоксид)этоксид)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(23-карбокситрикозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино)этоксид)этоксид)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[23-карбокситрикозаноиламино]-4(S)-карбоксибутаноиламино)этоксид)этоксид)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(23-карбокситрикозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(19-карбокситрикозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-(21-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(20-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино)этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[20-карбоксигенэйкозаноиламино]-4(S)-карбоксибутаноиламино)этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(22-карбоксидокозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этоксид)этоксид)ацетиламино)этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),}$

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[22-карбоксидокозаноиламино]-4(*S*)-карбоксибутаноиламино)этокси)этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N - ϵ^{26} -(20-карбоксиэйкозаноиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-(22-карбоксидокозаноиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(20-карбоксиййкозаноиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноиламино]этокс)этокс)ацетиламино)этокс)этокс)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[20-карбоксиэкозаноиламино]-4(S)-карбоксибутаноиламино)этокси)этокси)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(22-карбоксидокозаноиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноиламино]этокс)этокс]ацетиламино)этокс]этокс]ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[22-карбоксидокозаноиламино]-4(S)-карбоксибутаноиламино)этокси]этокси)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N - ϵ^{26} -(20-карбоксиэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37), и

пептид N - ϵ^{26} -(22-карбоксидокозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-
(7-37).

36. Фармацевтическая композиция по пункту 31, где инсулинотропное вещество GLP-1 выбрано из группы, включающей

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-карбоксивинадеканамино)-4(*S*)-карбоксивиноилоамино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[19-карбоксинадеканоиламино]-4(*S*)-карбоксибутаноиламино)этокси)этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N - ϵ^{26} -(19-карбоксихонадеканоиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид N -ε²⁶-(19-карбоксихонадеканоиламино)-4(*S*)-карбоксибутаноил-
[Arg34]GLP-1-(7-37),

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(4-(21\text{-карбоксихенэикозаноиламино})-4(S)\text{-карбоксивуаноиламино)]этоксид)этоксид)ацетиламино)]этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$, и

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[21\text{-карбоксихенэикозаноиламино})-4(S)\text{-карбоксивуаноиламино)]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$;

предпочтительно инсулинотропное вещество GLP-1 представляет собой:

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[19\text{-карбоксивуаноиламино})-4(S)\text{-карбоксивуаноиламино)]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$ или пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21\text{-карбоксихенэикозаноиламино})-4(S)\text{-карбоксивуаноиламино)]этоксид)этоксид)ацетиламино)]этоксид)этоксид)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$.

37. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 21–29, дополнительно содержащая инсулин быстрого действия.

38. Фармацевтическая композиция по пункту 37, в которой инсулин быстрого действия представляет собой один или более инсулинов, выбранных из группы, включающей человеческий инсулин Asp^{B28}, человеческий инсулин Lys^{B28}Pro^{B29}, человеческий инсулин Lys^{B3}Glu^{B29}, человеческий инсулин и человеческий инсулин desB30; предпочтительно инсулин быстрого действия представляет собой человеческий инсулин Asp^{B28}, человеческий инсулин Lys^{B28}Pro^{B29}, человеческий инсулин Lys^{B3}Glu^{B29}, человеческий инсулин или человеческий инсулин desB30.

39. Производное инсулина по любому из пунктов 1–20 или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 21–38 для применения в качестве лекарственного средства.

40. Производное инсулина по любому из пунктов 1–20 или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 21–38 для применения в качестве лекарственного средства для лечения или профилактики сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе.

41. Производное инсулина по любому из пунктов 1–20 или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 21–38 для применения при лечении или профилактике сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе..

42. Применение производного инсулина по любому из пунктов 1–20 или применение фармацевтической композиции по любому из пунктов 21–38 для получения лекарственного

средства, причем предпочтительно лекарственное средство применяют для лечения или профилактики сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе.

43. Применение по пункту 42, где лекарственное средство применяется для лечения сахарного диабета; производное инсулина вводят одному и тому же пациенту один раз в два дня или с меньшей частотой и, в среднем, производное инсулина не вводят одному и тому же пациенту с более высокой частотой в течение периода длительностью по меньшей мере 1 месяц, 6 месяцев или 1 год.

44. Применение по пункту 42 или 43, где лекарственное средство применяется для лечения сахарного диабета; производное инсулина вводят два раза в неделю или с меньшей частотой и, в среднем, производное инсулина не вводят одному и тому же пациенту с более высокой частотой в течение периода длительностью по меньшей мере 1 месяц, 6 месяцев или 1 год.

45. Применение по любому из пунктов 42–44, где лекарственное средство применяется для лечения сахарного диабета; производное инсулина вводят один раз в неделю или с меньшей частотой и, в среднем, производное инсулина не вводят одному и тому же пациенту с более высокой частотой в течение периода длительностью по меньшей мере 1 месяц, 6 месяцев или 1 год.

46. Способ лечения или профилактики сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе, включающий введение терапевтически эффективного количества производного инсулина по любому из пунктов 1–20 или фармацевтической композиции по любому из пунктов 21–38.

47. Способ увеличения способности производного инсулина связываться с рецептором инсулина в присутствии альбумина, включающий:

присоединение альбумин-связывающего остатка к природному инсулину или аналогу инсулина посредством линкера Lin для получения производного инсулина, где линкер Lin представляет собой гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 40, предпочтительно по меньшей мере 50, предпочтительно по меньшей мере 65, предпочтительно 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180 или предпочтительно 72–120 атомов углерода; альбумин-связывающий остаток содержит 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-

связывающий остаток содержит линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты или одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа; или

модифицирован природный инсулин или аналог инсулина с формулой (A) или формулой (A') для получения производного инсулина,

(A) представляет собой $\text{III}-(\text{II})_m-(\text{I})_n$ - (A), где

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и n является целым числом от 11 до 30, предпочтительно n равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20;

I представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

III представляет собой альбумин-связывающий остаток, содержащий линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I, представленных в формуле (A), может быть изменен независимым образом;

(A') представляет собой $\text{III}-(\text{II})_m-(\text{I}')_{n'}$ - (A'),

где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и n' является целым числом;

I' представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

III представляет собой альбумин-связывающий остаток, содержащий линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода;

предпочтительно III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I' соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I', представленных в формуле (A'), может быть изменен независимым образом; и

общее количество атомов углерода в (I')_n составляет 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 42–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120.

48. Способ увеличения активности производного инсулина, включающий:

присоединение альбумин-связывающего остатка к природному инсулину или аналогу инсулина посредством линкера Lin для получения производного инсулина, где линкер Lin представляет собой гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 40, предпочтительно по меньшей мере 50, предпочтительно по меньшей мере 65, предпочтительно 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120 атомов углерода; альбумин-связывающий остаток содержит 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток содержит линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты или одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа; или

модифицирован природный инсулин или аналог инсулина с формулой (A) или формулой (A') для получения производного инсулина,

(A) представляет собой III-(II)_m-(I)_n (A), где

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и n является целым числом от 11 до 30, предпочтительно n равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20;

I представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный

остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

III представляет собой альбумин-связывающий остаток, содержащий линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I, представленных в формуле (A), может быть изменен независимым образом;

(A') представляет собой $\text{III}-(\text{II})_m-(\text{I}')_{n'}$ (A'),

где:

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и n' является целым числом;

I' представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

III представляет собой альбумин-связывающий остаток, содержащий линейную или разветвленную липофильную группу, содержащую 20–40 атомов углерода; предпочтительно III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 атомов углерода (более предпочтительно жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–24 атома углерода), причем формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I' соединены амидными связями; и

порядок расположения II и I', представленных в формуле (A'), может быть изменен независимым образом; и

общее количество атомов углерода в $(\text{I}')_{n'}$ составляет 20–200, предпочтительно 30–180, предпочтительно 42–180, предпочтительно 61–180, предпочтительно 66–180, предпочтительно 72–120.

49. Способ по пункту 47 или 48, где природный инсулин или аналог инсулина

содержит по меньшей мере один остаток лизина, а линкер Lin, формула (A) или формула (A') связаны с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина.

50. Способ по пункту 47 или 48, где

n равно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18; предпочтительно n равно 11, 12, 13, 14, 15 или 16; предпочтительно n равно 11, 12, 13, 14 или 15; и/или

m является целым числом от 1 до 6; предпочтительно m равно 1, 2, 3 или 4; предпочтительно m равно 1 или 2; предпочтительно m равно 1; и/или

III представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–23) атомов углерода, и предпочтительно III представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20, 21 или 22 атома углерода, причем, формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа; и/или

исходный инсулин содержит один остаток лизина.

51. Способ по пункту 47 или 48, где

I представляет собой: $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ или $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$; предпочтительно I представляет собой $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$; или I' представляет собой $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{20}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{22}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{24}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ или $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{15}-\text{CH}_2-\text{CO}-$; и/или

II представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей γGlu , αGlu , βAsp , αAsp , $\gamma\text{-D-Glu}$, $\alpha\text{-D-Glu}$, $\beta\text{-D-Asp}$ и $\alpha\text{-D-Asp}$; предпочтительно II выбран из γGlu и βAsp ; и/или

III представляет собой $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{19}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{21}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CO}-$ или $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{24}-\text{CO}-$; предпочтительно III

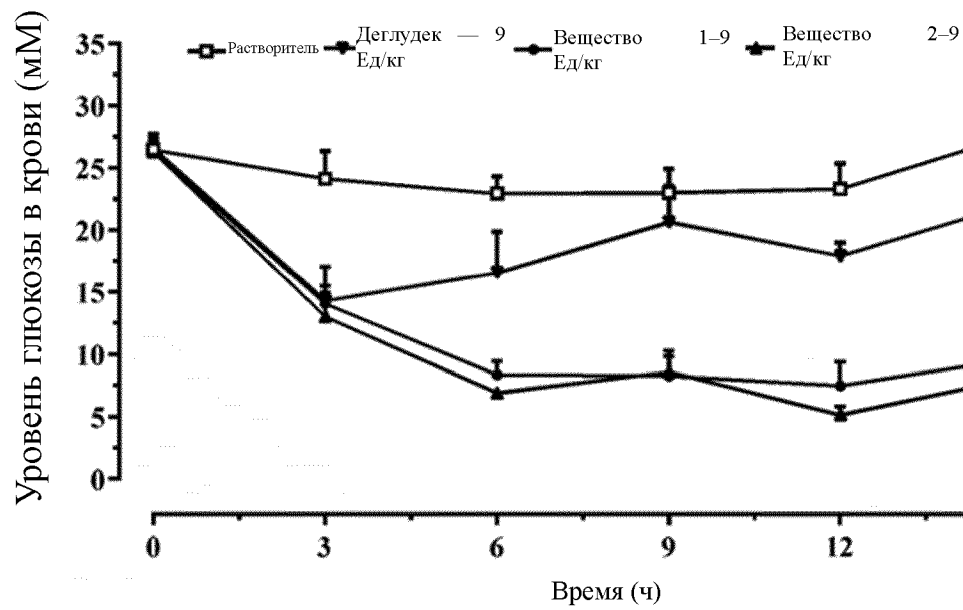
представляет собой $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CO}-$ или $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CO}-$.

52. Способ по любому из пунктов 47–51, где формула (A) или формула (A') связана с аминогруппой остатка лизина или с N-концевым аминокислотным остатком природного инсулина либо аналога инсулина через C-конец I.

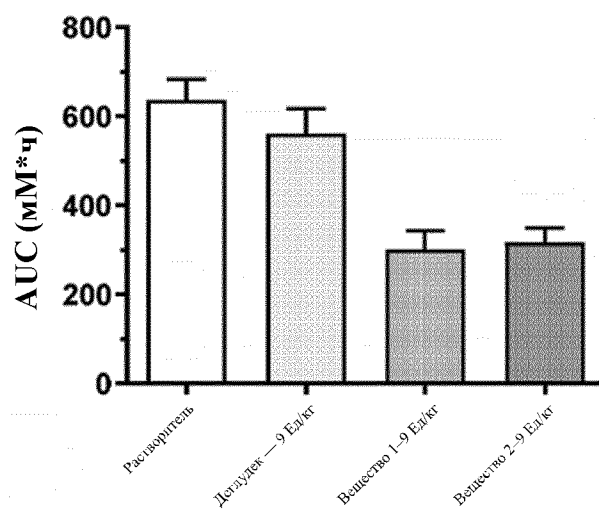
53. Способ по любому из пунктов 47–52, где формула (A) или формула (A') связана с ϵ -аминогруппой остатка лизина исходного инсулина.

54. Способ по любому из пунктов 47–53, где остаток лизина природного инсулина или аналога инсулина находится в положении B29.

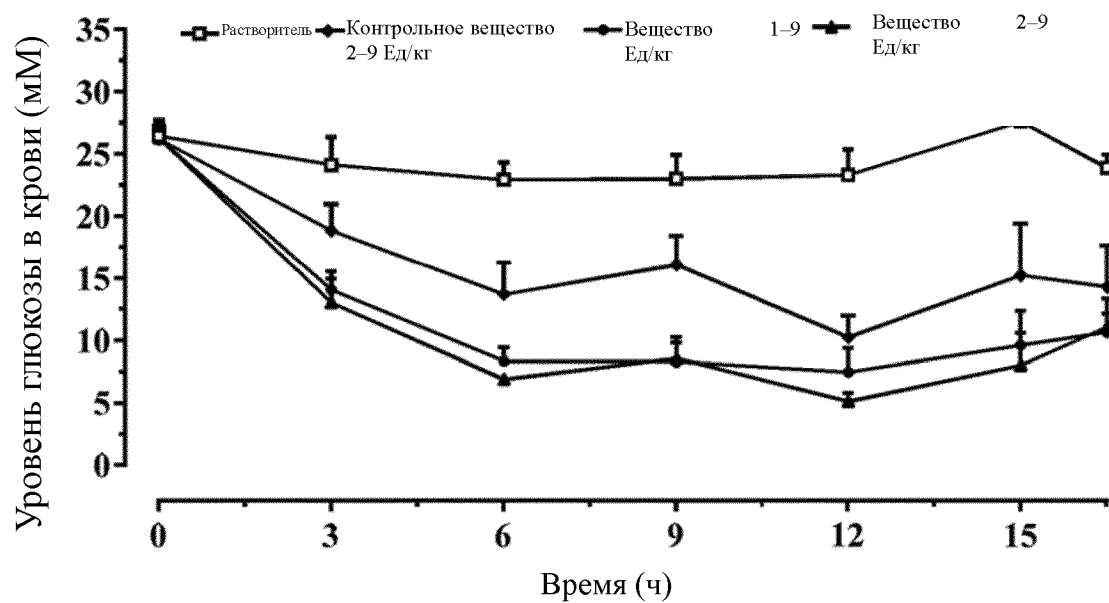
55. Способ по любому из пунктов 47–54, где природный инсулин или аналог инсулина выбран из группы, включающей человеческий инсулин desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, desB30; человеческий инсулин; человеческий инсулин A21G; человеческий инсулин A21G, desB30; и человеческий инсулин B28D; предпочтительно исходный инсулин представляет собой человеческий инсулин desB30 или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30.



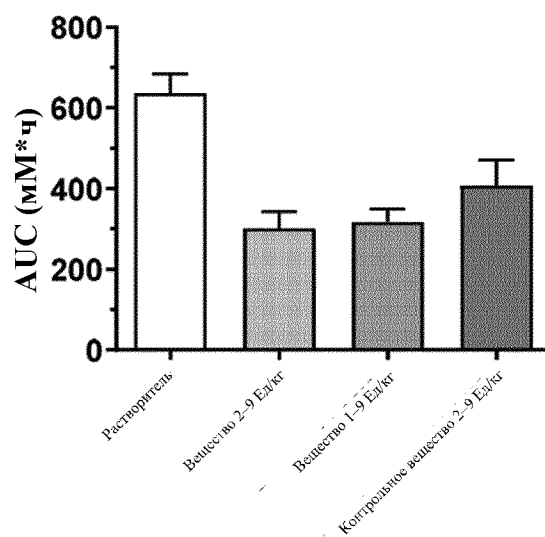
ФИГ. 1а



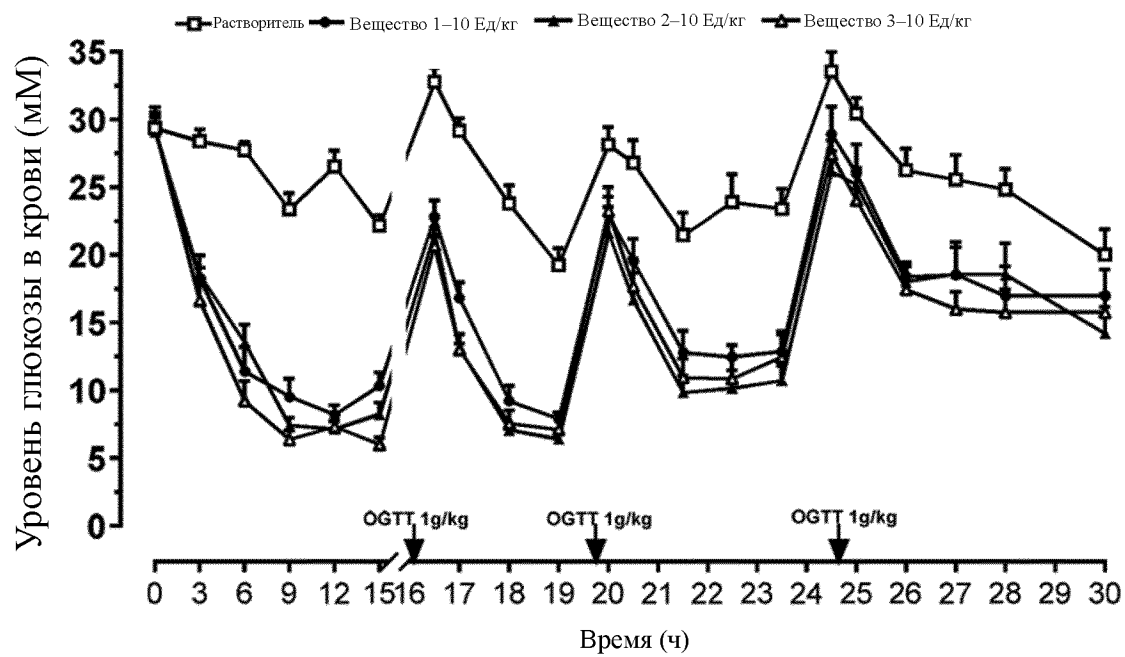
ФИГ. 1б



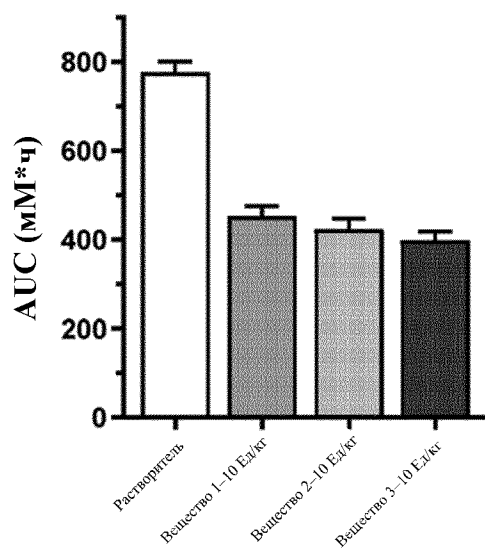
ФИГ. 2а



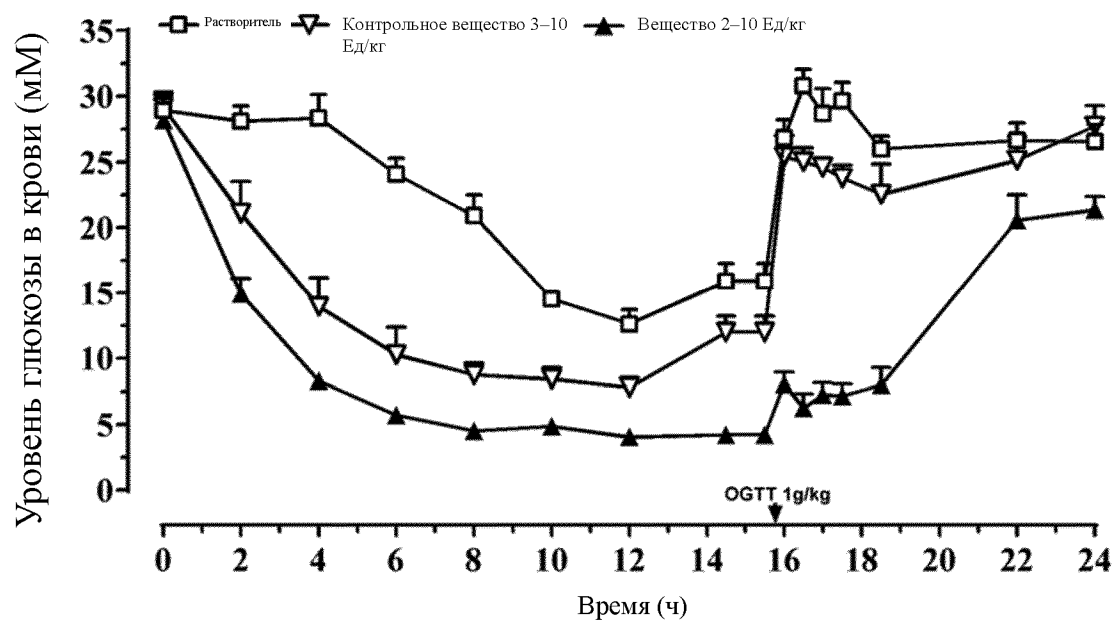
ФИГ. 2b



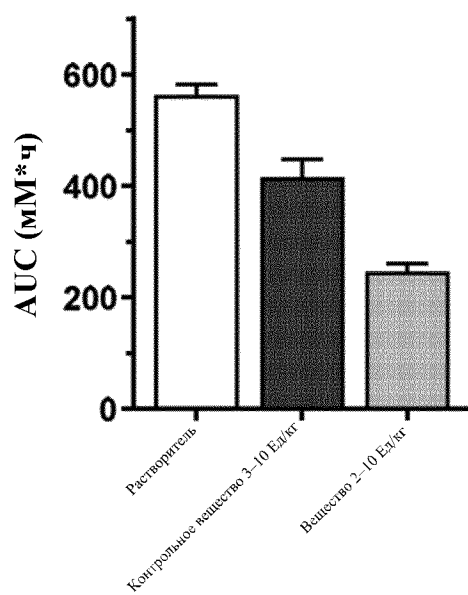
ФИГ. 3а



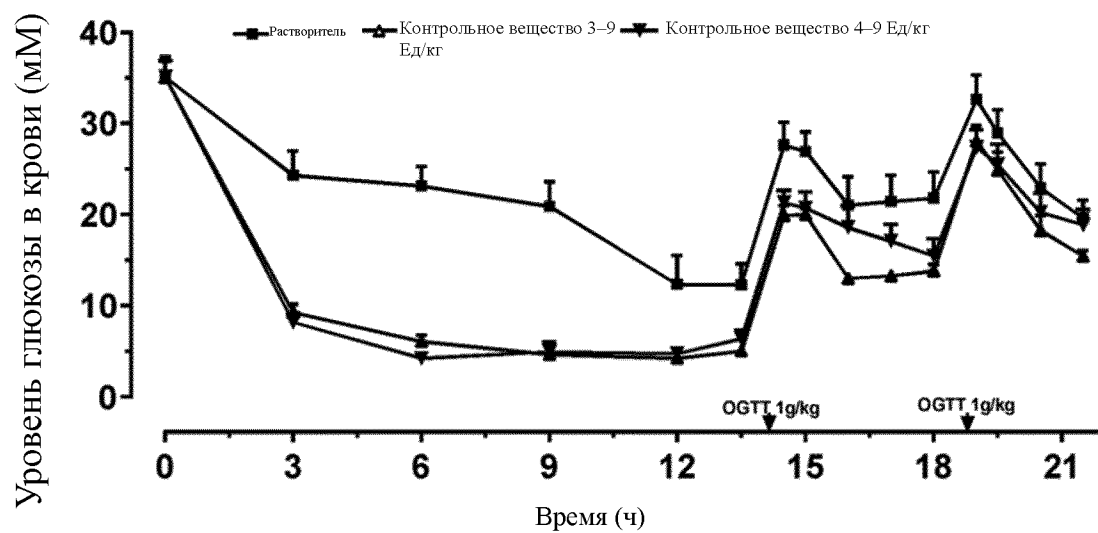
ФИГ. 3б



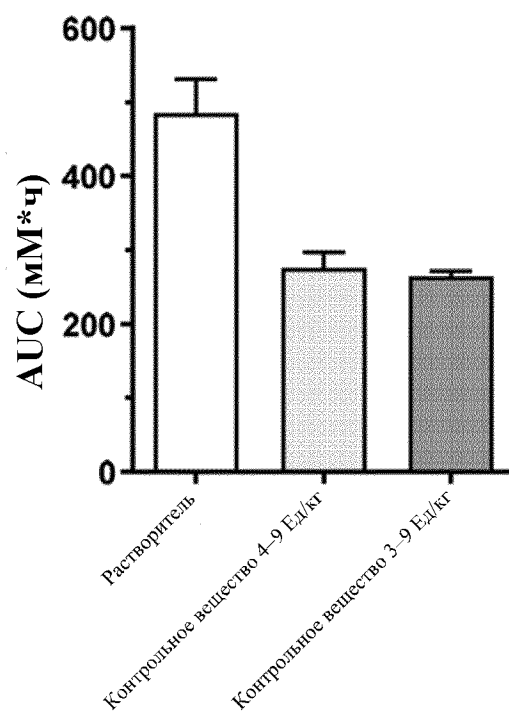
ФИГ. 4а



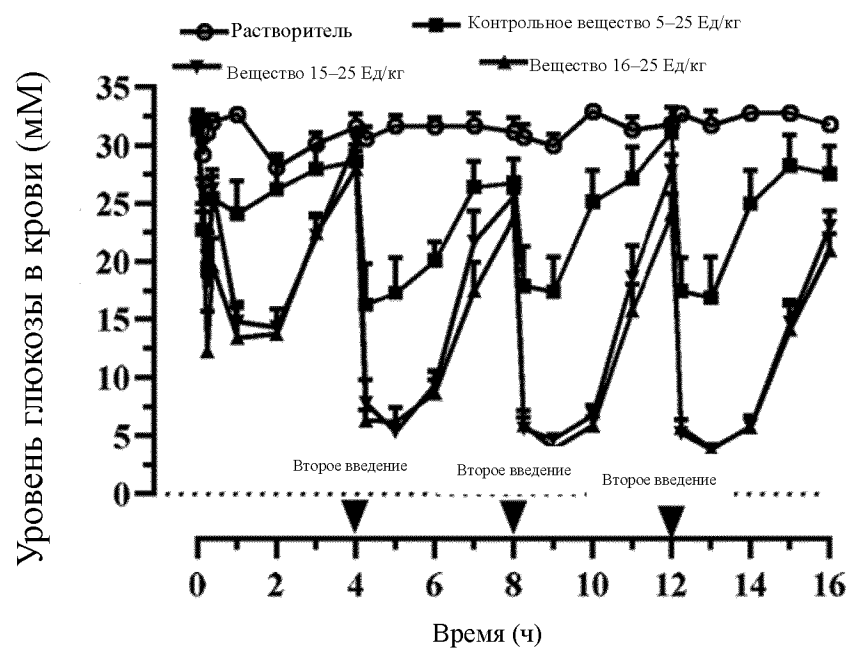
ФИГ. 4б



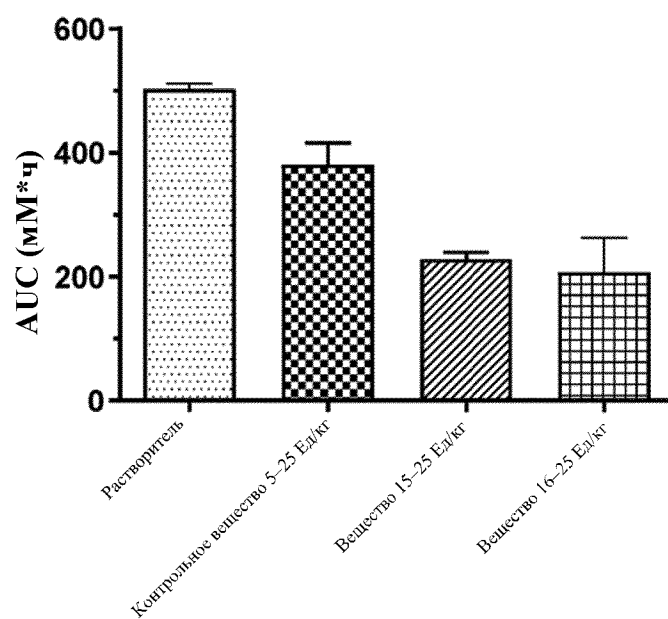
ФИГ. 5а



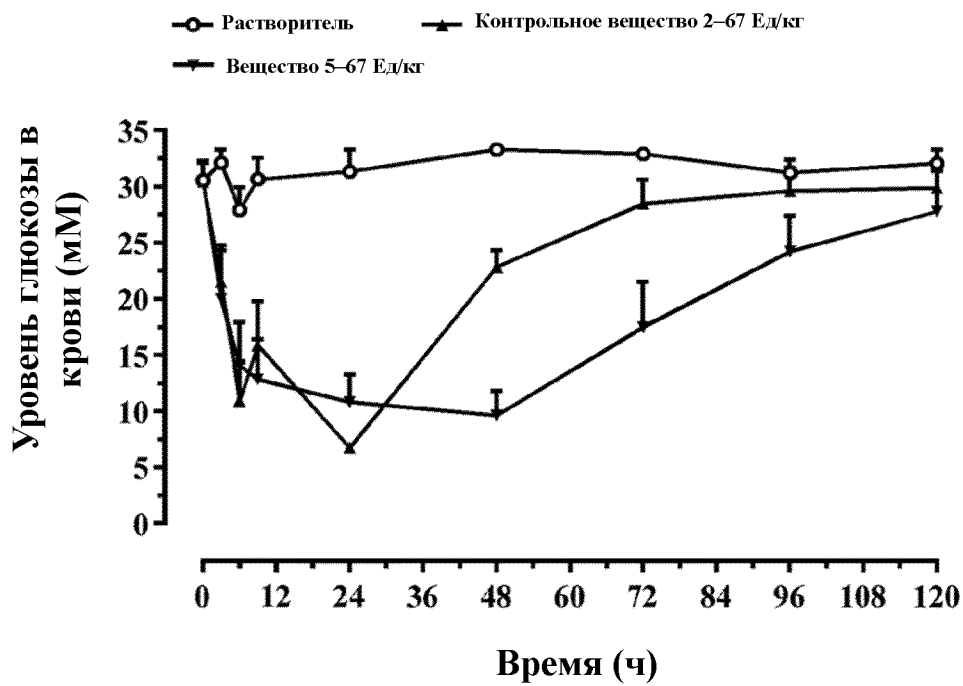
ФИГ. 5b



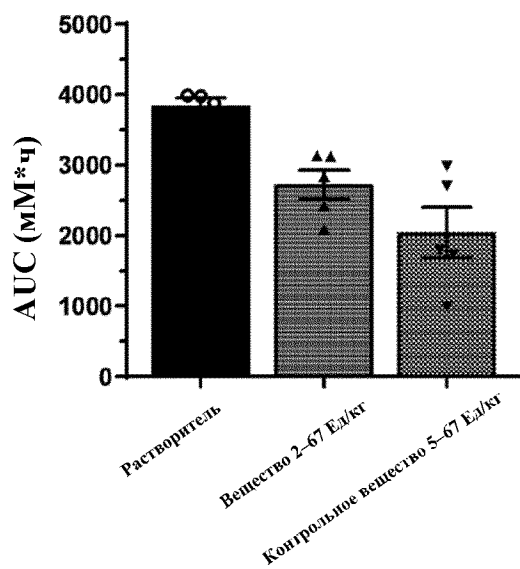
ФИГ. 6а



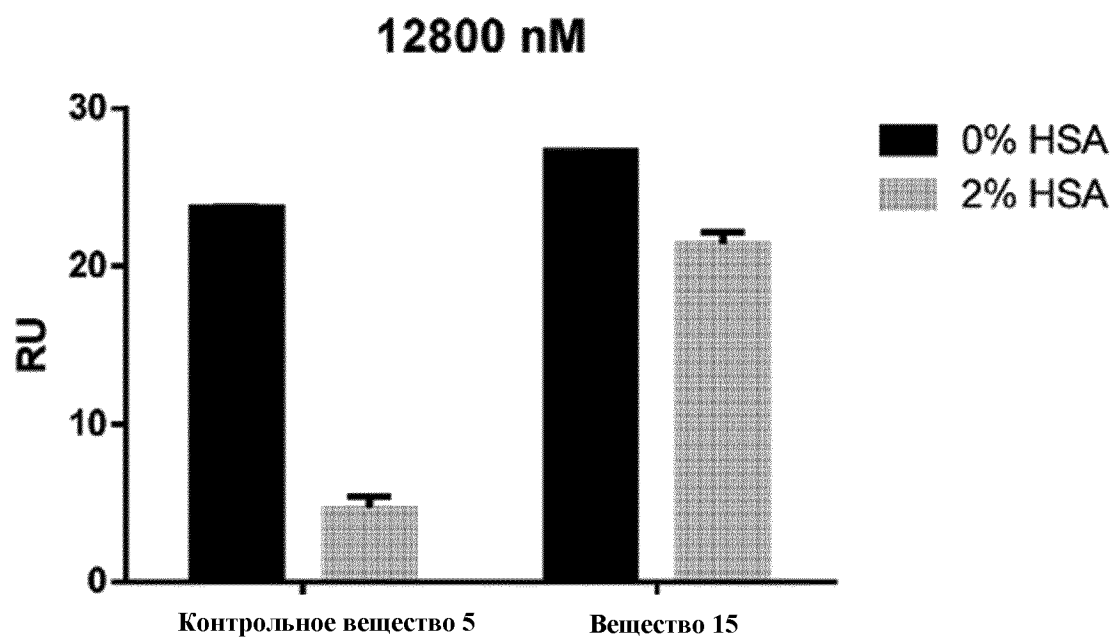
ФИГ. 6б



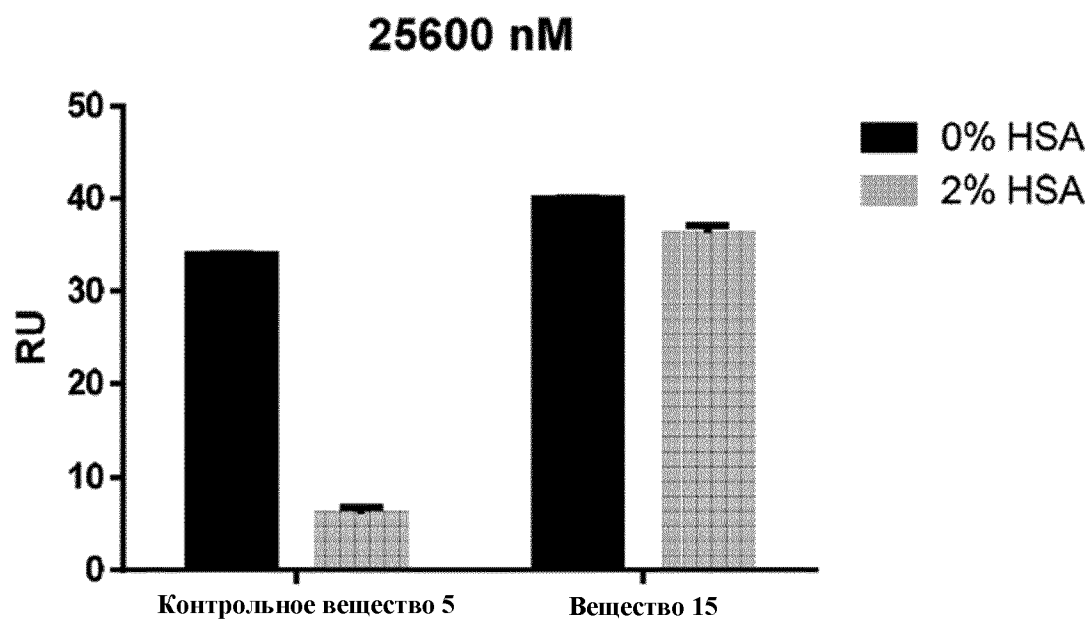
ФИГ. 7а



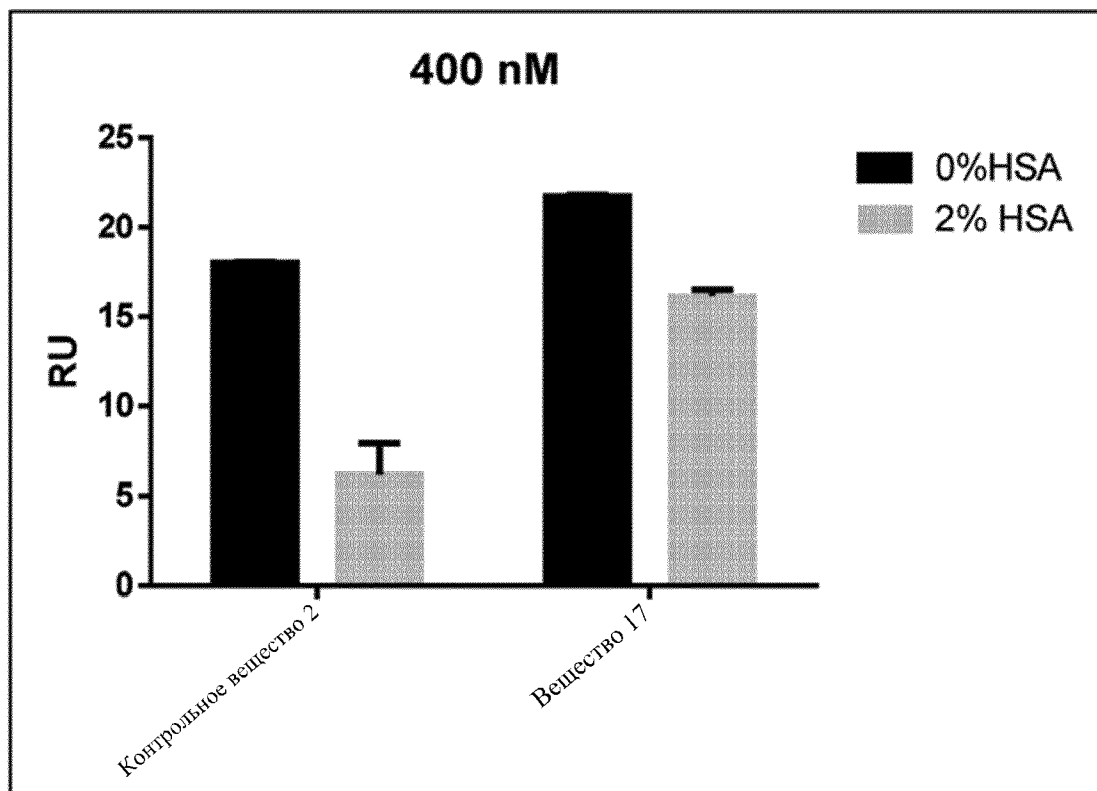
ФИГ. 7б



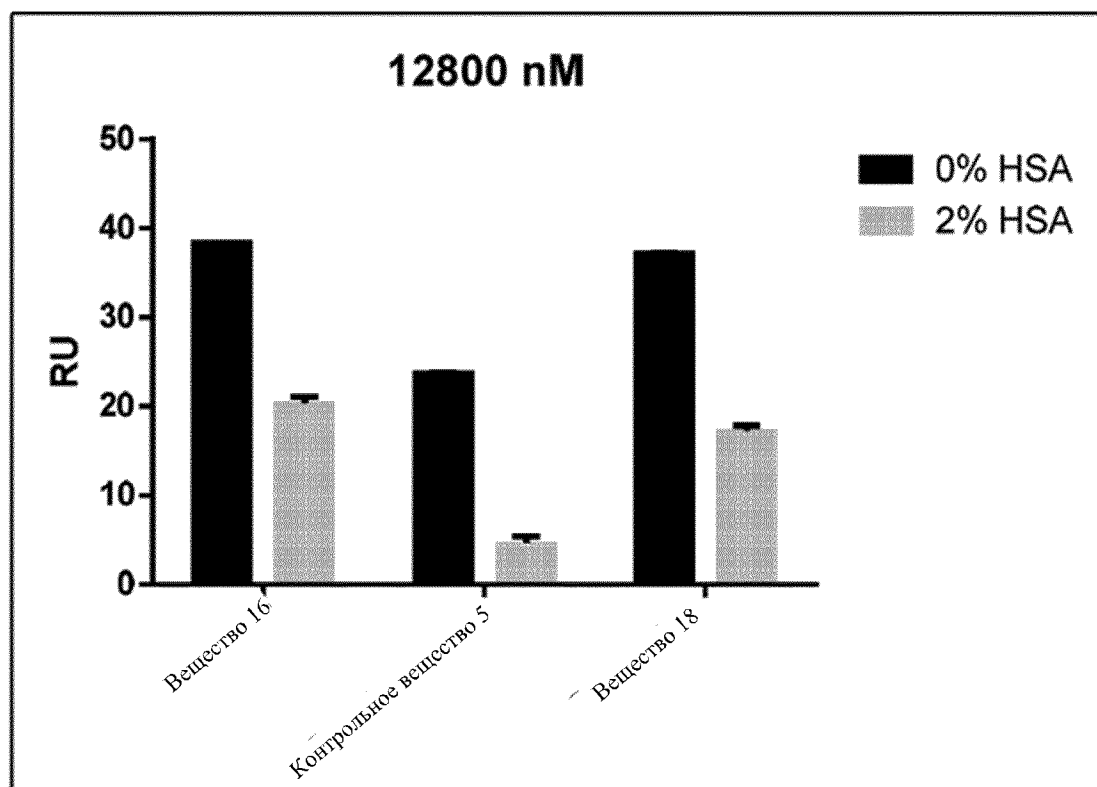
ФИГ. 8a



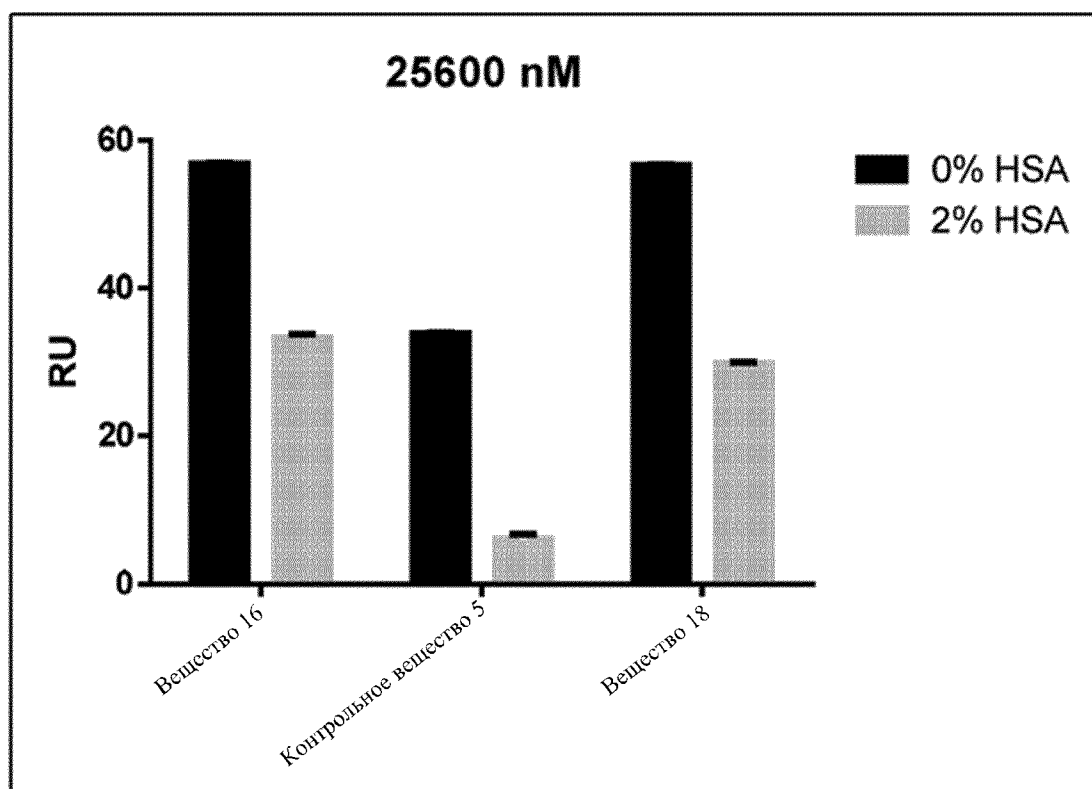
ФИГ. 8b



ФИГ. 9



ФИГ. 10а



ФИГ. 10b