

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291852 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.24

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

(22) Дата подачи заявки
2020.12.29

(54) ПРОИЗВОДНОЕ ИНСУЛИНА

(31) 201911398378.0; 202011057926.6

(32) 2019.12.30; 2020.09.29

(33) CN

(86) PCT/CN2020/141018

(87) WO 2021/136293 2021.07.08

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

(72) Изобретатель:
Гань Чжунжу, Чэнь Вэй, Чжан
Иньин, Сюэ Фанкай, Цай Линъюй, Ню
Цзянхун, Му Бинь (CN)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены производное инсулина, его фармацевтический состав, его фармацевтическая композиция с веществом GLP-1 длительного действия, а также медицинское применение ацилированного инсулина, указанного фармацевтического состава и указанной фармацевтической композиции. По сравнению с инсулином деглудек или другими производными инсулина, данное производное инсулина неожиданно характеризуется значительно повышенной эффективностью, более длительной продолжительностью действия, более длительным периодом полувыведения in vivo и лучшей физической и химической стабильностью.

A1

202291852

202291852

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 является новое производное инсулина (например, ацилированный инсулин). В ходе обширных экспериментов изобретатели неожиданно обнаружили, что новое производное инсулина (например, ацилированный инсулин) характеризуется неожиданно и значимо

повышенной эффективностью или лекарственным эффектом, 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, и альбумин-связывающий остаток связан с исходным инсулином через линкер Lin, где

линкер Lin представляет собой гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере 10, предпочтительно по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 25, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 36, предпочтительно по меньшей мере 15–100, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–59, предпочтительно 30–54 атома углерода; или линкер Lin содержит по меньшей мере 5 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; предпочтительно линкер Lin содержит по меньшей мере 6 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; предпочтительно линкер Lin содержит 5–9 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; или линкер Lin содержит алкиленгликоль, содержащий по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 24, предпочтительно 15–50, предпочтительно 20–39 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):

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

где:

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

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;

или

ацильная группа представлена формулой (A'):

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;

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;

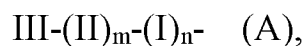
III, II и I' соединены амидными связями; и

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

общее количество атомов углерода в (I')_{n'} составляет 15–100, предпочтительно 20–100, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–59, предпочтительно 30–54.

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 или является целым числом от 1 до 10, и n равно 5, 6, 7, 8 или 9;

I представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

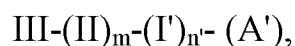
III представляет собой жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–24) атомов углерода, причем, формально, из одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

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'):



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 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–59, предпочтительно 30–54.

В некоторых вариантах осуществления изобретения n равно 5, 6, 7 или 8; 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: $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ 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 $\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{10}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{12}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ или $-\text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_8-\text{CH}_2-\text{CO}-$; 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 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{19}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{21}-\text{CO}-$ или $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CO}-$;

предпочтительно 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 формула (A) связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина посредством С-концевой части I, или формула (A') связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через С-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 исходный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин desB30 (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, представляющие А-цепь и В-цепь, соответственно); человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30 (SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, представляющие А-цепь и В-цепь, соответственно); человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, desB30 (SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, представляющие А-цепь и В-цепь, соответственно); человеческий инсулин (SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, представляющие А-цепь и В-цепь, соответственно); человеческий инсулин A21G (SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, представляющие А-цепь и В-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 ацилированный инсулин выбран из группы, включающей:

человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30;

[illegible]

[illegible]

человеческий инсулин B29K(N(ε)-генэйкозаноил-γGlu-8×OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-5×OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-6×OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-7×OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-8×OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30;
человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30;
человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-
5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-
эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H,
B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий
инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-γGlu-6×OEG),
desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-
5×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-
эйкозандиоил-6×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H,
B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-6×OEG-γGlu-γGlu), desB30; человеческий
инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-5×OEG-γGlu-γGlu),
desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-
βAsp-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-
эйкозандиоил-βAsp-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H,
B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-5×OEG), desB30; человеческий
инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-6×OEG), desB30;
человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-
αGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-
эйкозандиоил-αGlu-αGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E,
B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αAsp-5×OEG), desB30; человеческий
инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αAsp-6×OEG), desB30;
человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-

B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-5×OEG), desB30; человеческий
 инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-6×OEG), desB30;
 человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-
 αGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-
 докозандиоил-αGlu-αGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E,
 B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αAsp-5×OEG), desB30; человеческий
 инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αAsp-6×OEG), desB30;
 человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-
 7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-
 докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H,
 B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий
 инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-γGlu-8×OEG),
 desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-
 7×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-
 докозандиоил-8×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H,
 B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-8×OEG-γGlu-γGlu), desB30; человеческий
 инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-7×OEG-γGlu-γGlu),
 desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-
 βAsp-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-
 докозандиоил-βAsp-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H,
 B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-7×OEG), desB30; человеческий
 инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-8×OEG), desB30;
 человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-
 αGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-
 докозандиоил-αGlu-αGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E,
 B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αAsp-7×OEG), desB30; человеческий
 инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αAsp-8×OEG), desB30;
 человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозаноил-γGlu-
 5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-
 генэйкозаноил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H,
 B25H, B29K(N(ε)-генэйкозаноил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий
 инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозаноил-γGlu-8×OEG), desB30;

инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозаноил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозаноил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозаноил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-13×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-13×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-14×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-14×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-15×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-15×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-16×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-16×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-17×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-17×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×PEG), desB30; и человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-18×PEG), desB30.

В некоторых вариантах осуществления ацилированный инсулин выбран из

группы, включающей человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-гексакозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E,

B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×PEG), desB30 и человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×PEG), desB30.

В некоторых вариантах осуществления ацилированный инсулин выбран из группы, включающей: человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-гексакозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; и человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая производные инсулина, раскрытые в настоящем документе, и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

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

предпочтительно 4,5–6,5 моль ионов цинка/6 моль производных; и/или фармацевтическая композиция имеет рН в диапазоне от 6,5 до 8,5; предпочтительно рН составляет 6,8–8,2; предпочтительно рН составляет 7,0–8,2; предпочтительно рН 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 45–70 мМ, предпочтительно примерно 45–65 мМ, предпочтительно примерно 45 мМ, предпочтительно 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 или предпочтительно примерно 0,6–1,2 мМ.

В некоторых варианта осуществления производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является

фармацевтическая композиция, содержащая примерно 0,6–4,2 мМ производного инсулина настоящего изобретения, описанного выше, от примерно 1% до примерно 1,8% (об./об.) 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-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая примерно 0,6 или 1,2 мМ производного инсулина настоящего изобретения, описанного выше, 1,7% (об./об.) глицерина, примерно 45 мМ фенола, примерно 10 мМ *m*-крезола, примерно 6,5 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 B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×PEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-

6×OEG), desB30;

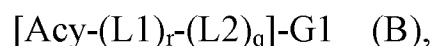
предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×PEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30. В другом аспекте предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая примерно 0,6–4,2 мМ производного инсулина, описанного 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 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 примерно 0–25 мМ (предпочтительно примерно 0–10 мМ) *m*-крезола и имеющая рН примерно 7,0–8,2, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая примерно 0,6–4,2 мМ производного инсулина, описанного выше, примерно 1,5–1,7% (об./об.) глицерина, примерно 45–60 мМ фенола, примерно 2,2–4,5 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина, примерно 20 мМ хлорида натрия, примерно 0–10 мМ *m*-крезола и имеющая значение рН примерно 7,0–8,0, причем

производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит инсулинотропное вещество GLP-1; предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит инсулинотропное вещество 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 $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этокс)этокс]ацетиламино)этокс]этокс)ацетил][Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$, пептид и пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этокс)этокс]ацетиламино)этокс]этокс)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит 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 $[\text{Асу}-(\text{L1})_r-(\text{L2})_q]$ 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.

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

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.

В некоторых вариантах осуществления L2 представляет собой: -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-CH₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-

O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-CO-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-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 L2 представляет собой -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-; и/или

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

предпочтительно инсулинотропное вещество GLP-1 представляет собой:

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

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

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что фармацевтическая композиция или комбинированный препарат производного инсулина (например, ацилированного инсулина), раскрытого в данном документе, и инсулинотропного вещества GLP-1 не снижает физическую стабильность производного инсулина (например, 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). Кроме того установлено, что комбинированный препарат также обеспечивает увеличение химической стабильности производного инсулина (например, ацилированного инсулина) по сравнению с препаратом, содержащем только один компонент.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция 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 $\text{Lys}^{\text{B3}}\text{Glu}^{\text{B29}}$, человеческий инсулин и человеческий инсулин desB30; предпочтительно инсулин быстрого действия представляет собой человеческий инсулин Asp^{B28} , человеческий инсулин $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$, человеческий инсулин $\text{Lys}^{\text{B3}}\text{Glu}^{\text{B29}}$, человеческий инсулин или человеческий инсулин desB30.

В некоторых вариантах осуществления молярное соотношение производного инсулина и инсулина быстрого действия составляет от примерно 60:3 до примерно 0,5:3, предпочтительно от примерно 57:3 до примерно 1:3, предпочтительно от примерно 55:3 до примерно 1,2:3, предпочтительно от примерно 50:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 40:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 30:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 27:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 25:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 22:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 20:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 17:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 15:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 12:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 10:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 9:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 8:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 7:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 6,9:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 6,8:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 6,5:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 6,3:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 6:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 5,8:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 5,5:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 5,3:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 5:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 4,8:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 4,5:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 4,2:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 4:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 3,9:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 3,8:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 3,5:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 3,2:3 до примерно 1,5:3,

[illegible]

примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 4,5:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 4,2:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 4:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 3,9:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 3,8:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 3,5:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 3,2:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 3:3 до примерно 2,4:3, более предпочтительно примерно 1,5:3, более предпочтительно примерно 2:3, более предпочтительно примерно 2,5:3, более предпочтительно примерно 2,75:3 или более предпочтительно примерно 3:3. Изобретатели неожиданно обнаружили, что фармацевтическая композиция, содержащая два инсулиновых компонента — производное инсулина (например, ацилированный инсулин) настоящего изобретения и инсулин аспарт, после введения характеризуется неожиданно повышенным гипогликемическим эффектом по сравнению с фармацевтической композицией, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, и она все же может обеспечивать лучший или сравнимый гипогликемический эффект, когда соотношение доз производного инсулина (например, ацилированного инсулина), раскрытого в данном документе, и инсулина аспарт намного меньше, чем соотношение доз инсулина деглудек и инсулина аспарт.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой описанное выше производное инсулина; предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-

докозандиоил- γ Glu-9 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-7 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-7 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-9 $\times$ OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-9 $\times$ OEG), desB30; более предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; или человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержит примерно 0,09–0,36 мМ производного инсулина, примерно 0,18 мМ человеческого инсулина Asp^{B28}, от примерно 0,85% до примерно 2,0% (об./об.) глицерина, примерно 15–70 мМ фенола, примерно 8–14 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина, примерно 10–120 мМ хлорида натрия и примерно 0–15 мМ м-крезола и имеет значение pH примерно 7,0–8,2, причем производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция

содержит примерно 0,165–0,18 мМ производного инсулина, примерно 0,18 мМ человеческого инсулина Asp^{B28}, примерно 1,5–1,7% (об./об.) глицерина, примерно 20–30 мМ фенола, примерно 9–12 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина, примерно 20–75 мМ хлорида натрия и примерно 10–15 мМ *m*-крезола и имеет рН примерно 7,0–8,2, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является производное инсулина или фармацевтическая композиция, раскрытые в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является производное инсулина или фармацевтическая композиция, раскрытые в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства для лечения или профилактики сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является производное инсулина или фармацевтическая композиция, раскрытые в настоящем документе, для применения при лечении или профилактике сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является производное инсулина или фармацевтическая композиция, раскрытые в настоящем документе, для применения при лечении или профилактики сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе; предпочтительно лекарственное средство применяют 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 применяют 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 большей частотой в течение периода времени по меньшей мере 1 месяц, 6 месяцев или 1 год.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лекарственное средство применяют 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 большей частотой в течение периода времени по меньшей мере 1 месяц, 6 месяцев или 1 год.

Производное инсулина (например, ацилированный инсулин) настоящего изобретения имеет длительный фармакокинетический (далее также называемый ФК) профиль, что делает возможным лечение пациентов с сахарным диабетом с помощью подкожных инъекций два раза в неделю, один раз в неделю или с меньшей частотой.

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 описанных выше производного инсулина или фармацевтической композиции в соответствии с описанным выше настоящим изобретением.

В другом аспекте предметом настоящего изобретения является способ повышения способности производного инсулина связываться с рецептором инсулина в присутствии альбумина, включающий:

соединение альбумин-связывающего остатка с исходным инсулином посредством линкера Lin для получения производного инсулина, причем

исходный инсулин представляет собой природный инсулин или аналог инсулина, и линкер Lin представляет собой гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере 10, предпочтительно по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 25, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 36, предпочтительно 15–100, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–59, предпочтительно 30–54 атома 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 и 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,

III-(II)_m-(I)_n- (A), где

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

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;

формула (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 (I')_{n'} составляет 15–100, предпочтительно 20–100, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–59, предпочтительно 30–54.

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

получение производного инсулина путем соединения альбумин-связывающего остатка с исходным инсулином посредством линкера Lin, причем исходный инсулин представляет собой природный инсулин или аналог инсулина, и линкер Lin представляет собой гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере 10, предпочтительно по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 25, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 36, предпочтительно 15–200, предпочтительно 15–100, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80,

предпочтительно 30–59, предпочтительно 30–54 атома 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

получение производного инсулина путем модификации исходного инсулина с помощью формулы (A) или формулы (A'),

III-(II)_m-(I)_n- (A), где

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

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 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;

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 (I')_n составляет 15–100, предпочтительно 20–100, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–59, предпочтительно 30–54.

В некоторых вариантах осуществления

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и/или

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

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 аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения n равно 5, 6, 7 или 8; и/или

m равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6; предпочтительно, 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: $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ или $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; предпочтительно I представляет собой $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; или I' представляет собой $\text{HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{10}\text{-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{11}\text{-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{12}\text{-CH}_2\text{-CO-}$ или $\text{HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_8\text{-CH}_2\text{-CO-}$; 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 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{19}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{20}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{21}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{22}\text{-CO-}$ или $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{24}\text{-CO-}$; предпочтительно III представляет собой $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{20}\text{-CO-}$ или $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{22}\text{-CO-}$.

В некоторых вариантах осуществления формула (A) связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка природного инсулина или аналога инсулина посредством C-концевой части I, или формула (A') связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка природного инсулина или 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 B29.

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 и длительность действия веществ из примера 2 и примеров 4–5 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 6b в связке с ФИГ. 6a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта веществ из примера 2 и примеров 4–5 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 7a иллюстрирует гипогликемический эффект вещества из примера 1 в настоящем изобретении и растворителя у крыс со стрептозотацин (STZ)-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 7b в связке с ФИГ. 7a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта вещества из примера 1 в настоящем изобретении и растворителя у крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 8a иллюстрирует гипогликемический эффект патентуемых веществ из сравнительного примера 5 и примеров 15 и 16 в настоящем изобретении и растворителя у крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 8b в связке с ФИГ. 8a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта патентуемых веществ из сравнительного примера 5 и примеров 15 и 16 в настоящем изобретении и растворителя у крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 9a иллюстрирует гипогликемический эффект веществ из примеров 2 и 4 в настоящем изобретении и растворителя у самок крыс с STZ-

индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 9b в связке с ФИГ. 9a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта веществ из примера 2 и 4 в настоящем изобретении и растворителя у самок крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 10a иллюстрирует гипогликемический эффект патентуемых веществ из сравнительного примера 5 и примеров 15 и 16 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 10b в связке с ФИГ. 10a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта патентуемых веществ из сравнительного примера 5 и примеров 15 и 16 в настоящем изобретении и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 11a иллюстрирует гипогликемический эффект патентуемых веществ из сравнительного примера 5 и примера 16 в настоящем изобретении и растворителя у крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 11b в связке с ФИГ. 11a, иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта патентуемых веществ из сравнительного примера 5 и примера 16 в настоящем изобретении и растворителя у крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 12a иллюстрирует гипогликемический эффект инсулина аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя у мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 12b в связке с ФИГ. 12a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта инсулина аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя у мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 13a иллюстрирует гипогликемический эффект инсулина аспарт,

фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя у мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 13b в связке с ФИГ. 13a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта инсулина аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя у мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 14a иллюстрирует уровень глюкозы в крови мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1) перед четвертым введением инсулина аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя.

ФИГ. 14b иллюстрирует уровень глюкозы в крови мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1) перед восьмым введением инсулина аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя.

ФИГ. 14c иллюстрирует уровень глюкозы в крови мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1) перед десятым введением инсулина аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и

растворителя.

ФИГ. 15а иллюстрирует уровень глюкозы в крови мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1) через 1 ч после четвертого введения инсулина аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя.

ФИГ. 15b иллюстрирует уровень глюкозы в крови мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1) через 1 ч после восьмого введения инсулина аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя.

ФИГ. 15с иллюстрирует уровень глюкозы в крови мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1) через 1 ч после десятого введения инсулина аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя.

ФИГ. 16 иллюстрирует эффект снижения HbA1c у инсулина аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя у мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 17а иллюстрирует гипогликемический эффект вещества из примера 4 в настоящем изобретении, инсулина деглудек и растворителя у крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 17b в связке с ФИГ. 17а иллюстрирует AUC гипогликемического

эффекта вещества из примера 4 в настоящем изобретении, инсулина деглудек и растворителя у крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 18a иллюстрирует гипогликемический эффект фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя у мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 18b в связке с ФИГ. 18a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя у мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 19 иллюстрирует эффект снижения HbA1c у фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя у мышей C57/6J с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

ФИГ. 20a иллюстрирует гипогликемический эффект фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 20b в связке с ФИГ. 20a иллюстрирует AUC гипогликемического эффекта фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтических композиций, содержащих два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя у мышей линии db/db.

ФИГ. 21а иллюстрирует случайный уровень глюкозы в крови у мышей линии db/db после инъекции фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя.

ФИГ. 21b в связке с ФИГ. 21а иллюстрирует AUC случайного уровня глюкозы в крови у мышей линии db/db после инъекции фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя.

ФИГ. 21c иллюстрирует уровень глюкозы в крови натощак у мышей линии db/db после инъекции фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя.

ФИГ. 21d в связке с ФИГ. 21c иллюстрирует AUC уровня глюкозы в крови натощак у мышей линии db/db после инъекции фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — инсулин деглудек и инсулин аспарт, фармацевтической композиции, содержащей два инсулиновых компонента — раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, и растворителя.

ФИГ. 22 иллюстрирует способность связывания рецепторами вещества из примера 2 и контрольного вещества 2 в настоящем изобретении в присутствии 2% ЧСА и 0% ЧСА, соответственно.

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 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$. 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 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ или $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 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, процесса 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.

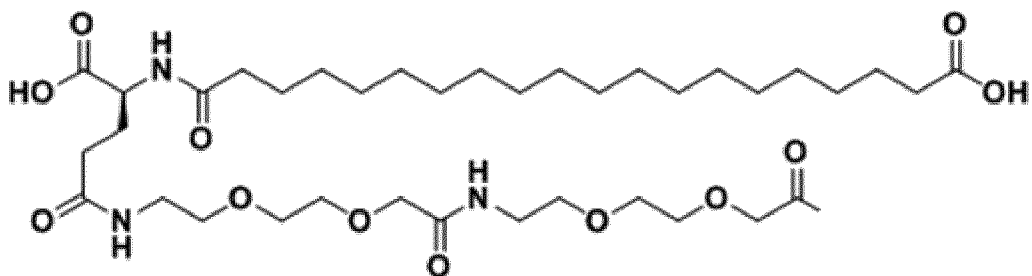
Сахарный диабет I типа, также известный как инсулинозависимый сахарный диабет (ИЗСД) и ювенильный диабет, вызывается разрушением β -клеток и часто приводит к абсолютному дефициту инсулина. Сахарный диабет II типа, также известный как инсулиннезависимый сахарный диабет (ИНСД) и диабет взрослых, связан 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

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.

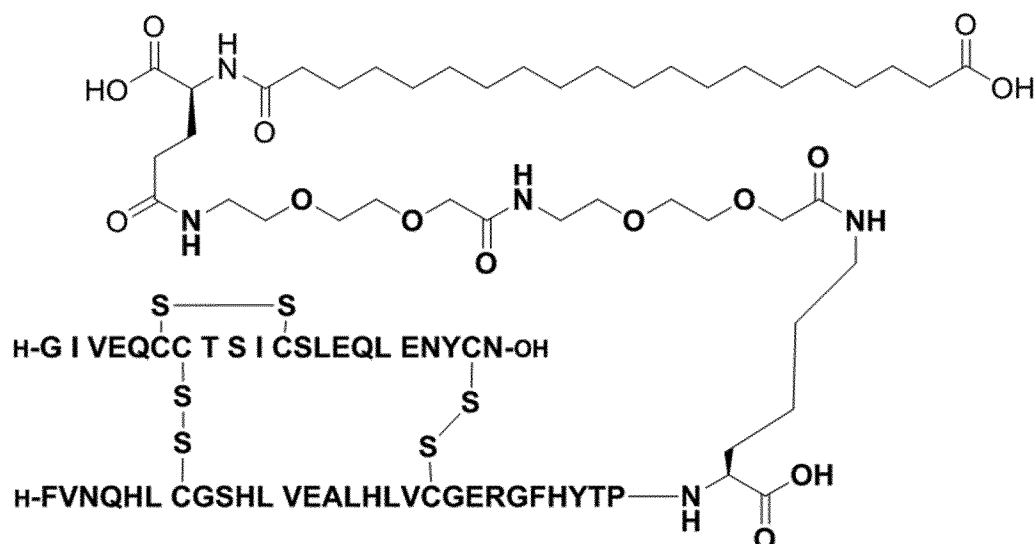
Используемое в настоящем документе наименование инсулина или веществ GLP-1 соответствует следующему принципу: названия даются в соответствии с мутациями и модификациями (например, ацилированием) относительно человеческого инсулина или мутациями и модификациями (например, ацилированием) природного GLP-1(7-37).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



53

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-карбоксихекозаноилоамино)-4(S)-карбоксивалерианоилоамино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)ацетил]» или «[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-карбоксихекозаноилоамино)валерианоил]-амино]-этокси]-этокси]ацетил]амино]этокси]этокси]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 $^{\epsilon}$ -эйкозандиоил- γ Glu-2 $\times$ OEG), desB30» или «человеческий инсулин B29K(N $^{\epsilon}$ -эйкозандиоил-gGlu-2 $\times$ OEG), desB30», что указывает на то, что аминокислота К в положении B29 человеческого инсулина была модифицирована путем ацилирования остатком эйкозандиоил-gGlu-2 $\times$ OEG по ϵ -азоту (обозначаемому как N $^{\epsilon}$ или (N(ϵ))) остатка лизина в положении B29, а аминокислота Т в положении B30 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 $^{\epsilon}$ -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 H, аминокислота К в положении B29 человеческого инсулина была модифицирована путем ацилирования остатком эйкозандиоил-gGlu-2 $\times$ OEG по ϵ -азоту (обозначаемому как N $^{\epsilon}$) остатка лизина в положении B29, а аминокислота Т в положении B30 человеческого инсулина была удалена.



Используемый в данном документе «n×PEG» относится к группе -NH(CH₂CH₂O)_nCH₂CO-, где n представляет собой целое число. Например, «12×PEG» относится к группе -NH(CH₂CH₂O)₁₂CH₂CO-.

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 выполняться 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 С-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;

AE EA: 2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)уксусная кислота;

OH: гидроксил;

CH_3CN : ацетонитрил;

Gly: глицин;

Arg: аргинин;

TFA: трифторуксусная кислота;

HbA1c: гликированный гемоглобин;

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

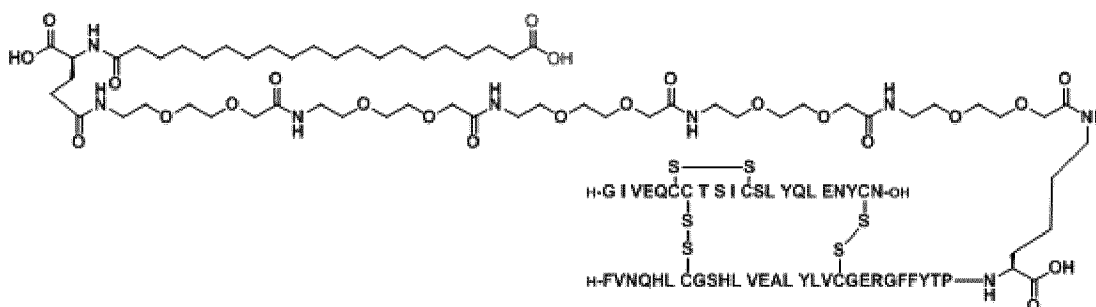
RU: единица отклика.

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 Na₂HPO₄ (150 мл) и добавляли ацетонитрил (100 мл). Доводили pH до 10–12,5 с помощью 1 N NaOH. Трет-бутил-эйкозандиоил-γGlu-(5×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): $m/z = 1377,53[M+5H]^{5+}$

3. Получение промежуточного вещества *трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(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 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): $m/z = 496,36(M+1)^+$

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*-бутилметилловый 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 $\times$ 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× 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-γGlu-(2×OEG-OH)-OtBu (30,75 г; выход 93%).

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

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

Трет-бутил-эйкозандиоил-γGlu-(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 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-γGlu-(2×OEG-OSu)-OtBu (31,09 г; выход 91%).

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

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

Трет-бутил-эйкозандиоил-γGlu-(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 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-(5 $\times$ OEG-OH)-OtBu (38,99 г; выход 93%).

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

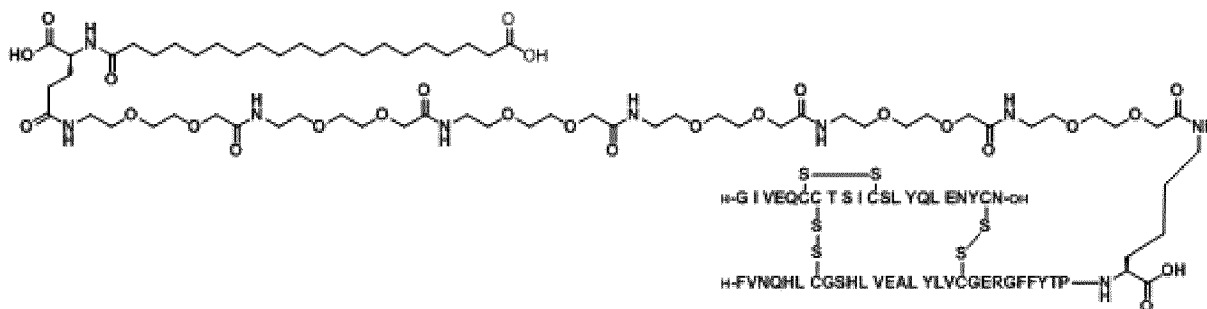
3.7 *Трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(5 $\times$ OEG-OSu)-OtBu

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 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-(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.

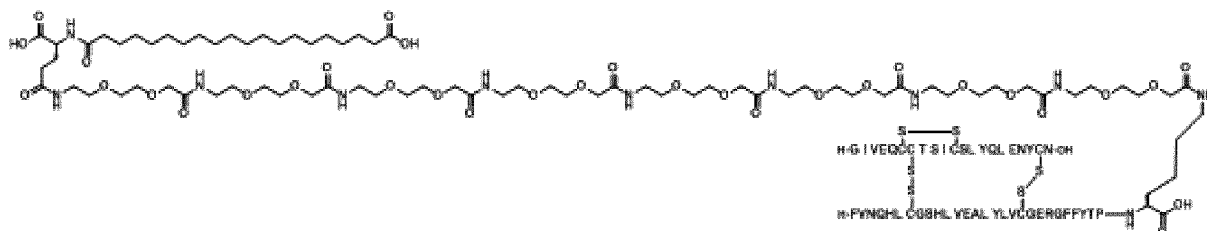
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1406,28[M+5H]^{5+}$

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

ЖХ-МС (Scie $\times$ 100API): $m/z = 1551,90(M+1)^+$

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.

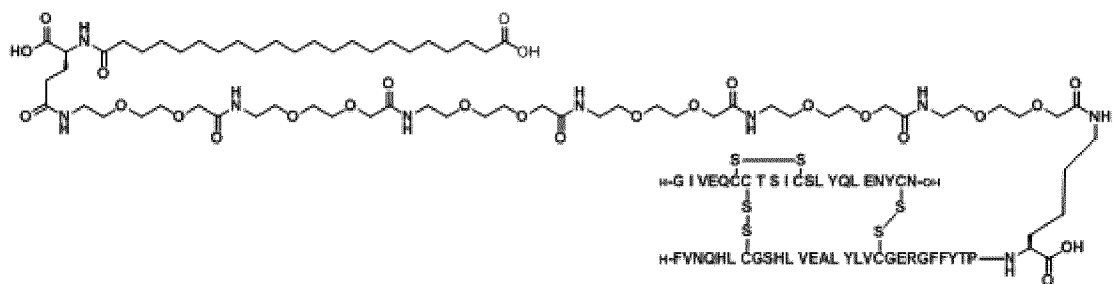
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1464,30[M+5H]^{5+}$

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

ЖХ-МС (Scie $\times$ 100API): $m/z = 1814,02(M+1)^+$

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.

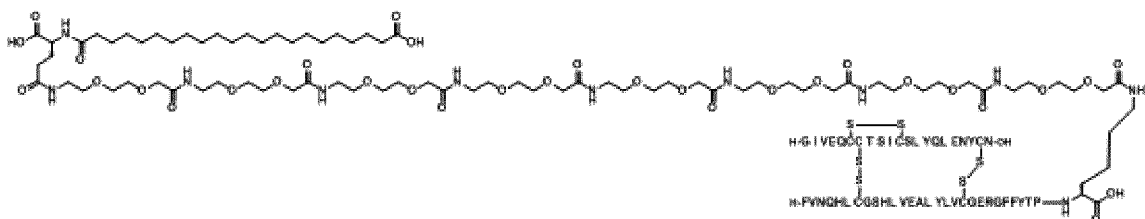
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1411,88[M+5H]^{5+}$

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

ЖХ-МС (Scie $\times$ 100API): $m/z = 1579,94(M+1)^+$

Пример 5.

Человеческий инсулин B29K($N(\epsilon)$ -докозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30 (вещество 5)



Вещество 5 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 1.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1469,91[M+5H]^{5+}$

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

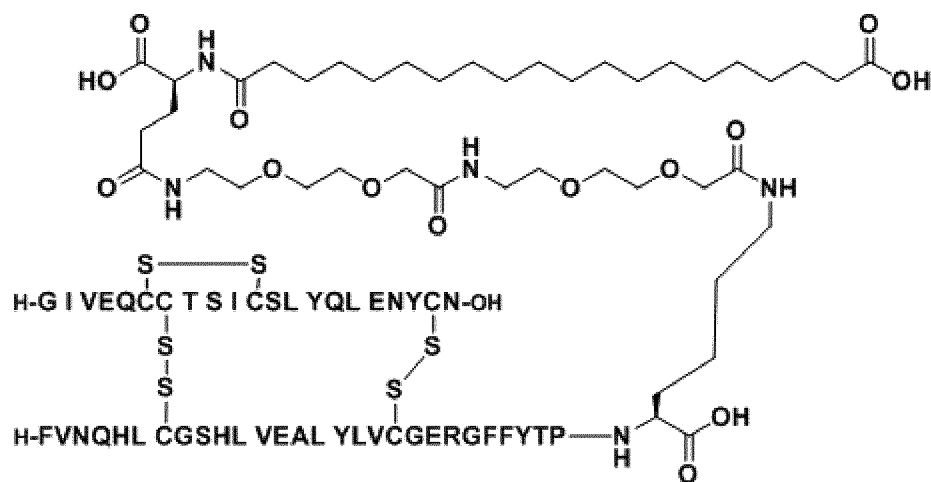
ЖХ-МС (Scie $\times$ 100API): $m/z = 1870,08(M+1)^+$

Сравнительный пример 1.

Человеческий инсулин B29K($N(\epsilon)$ -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.

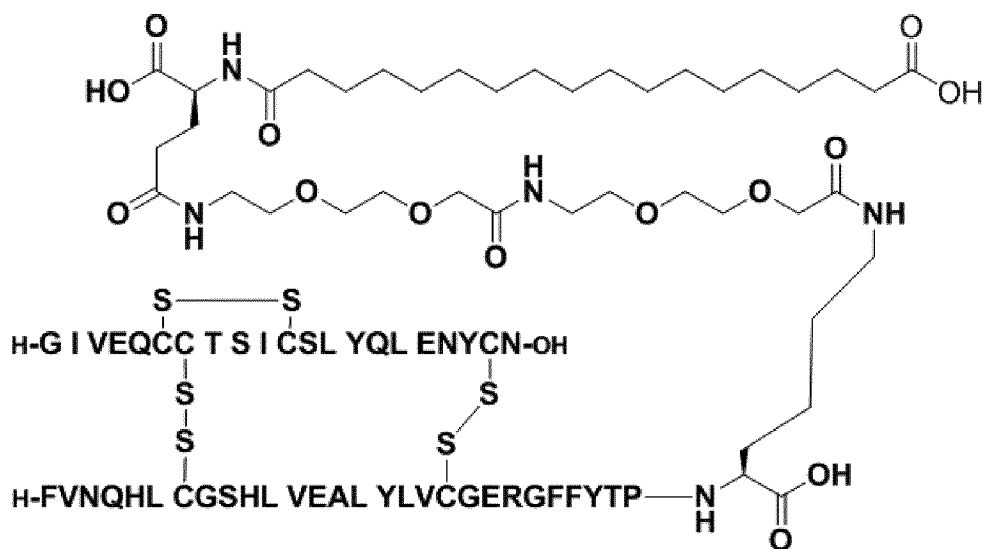
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1290,22[M+5H]^{5+}$

Промежуточное вещество трет-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)

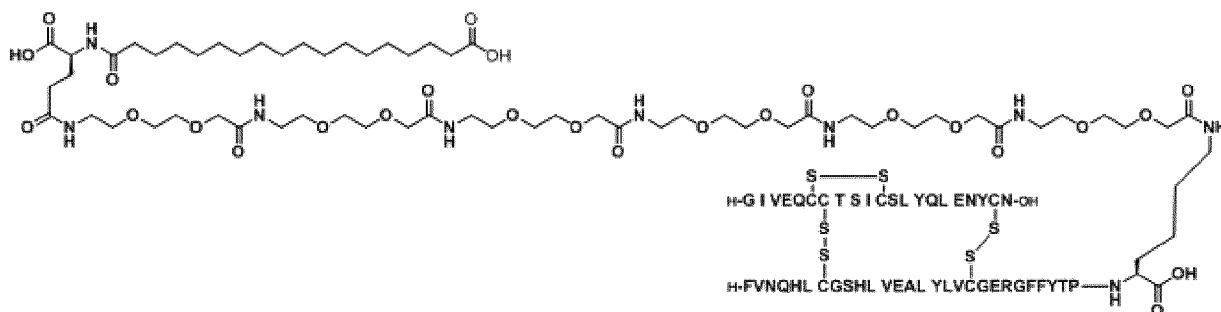


Контрольное вещество 3 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 1.

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 6.

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 1–5 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-6b 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.

На ФИГ. 6a–6b показано, что вещество 4, вещество 5 и вещество 2, 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 41-часовой временной точке.

Пример 7.

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

Самцы крыс породы Вистар 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, условия в помещении контролировали на уровне 40–60% относительной влажности и 22–24 °С. После периода адаптации в течение 4 дней крысы голодали в течение 12 ч, и им внутривенно 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 крысы с уровнем глюкозы крови выше 20 ммоль/л отбирали в качестве модельных крыс с СДТ1 для последующих экспериментов.

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. Каждую из крыс 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 ацилированного инсулина (3 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 pH 7,6.

Ацилированный инсулин растворяли в растворителе до концентрации введения 1,5 Ед/мл, и объем введения составлял 2 мл/кг (т. е. 0,2 мкл/100 г массы тела). Введение осуществляли однократно путем подкожной инъекции (п/к) в загривок. Ацилированный инсулин вводили примерно в 9:30 (момент времени 0), и уровень глюкозы в крови крыс определяли в моменты времени 2 ч и 4 ч после введения. Пероральные тесты на толерантность к глюкозе (ПТТГ) проводили в 4-часовые и 7-часовые временные точки, соответственно (подробности см. ниже).

Пероральный тест на толерантность к глюкозе (ПТТГ)

Время определения: кровь забирали из кончика хвоста в указанной временной точке для определения уровня глюкозы в крови натощак (0 мин), с последующим внутрижелудочным введением раствора глюкозы (100 мг/мл или 200 мг/мл, 10 мл/кг), а затем определяли уровень глюкозы в крови через 30 мин, 60 мин, 120 мин и 180 мин после гликемической нагрузки.

Хвост каждой крысы очищали ватным тампоном, смоченным спиртом, и капли крови собирали из хвоста с помощью одноразовой иглы для забора крови и проводили измерения с помощью глюкометра (Roche) и прилагаемых к нему тест-полосок.

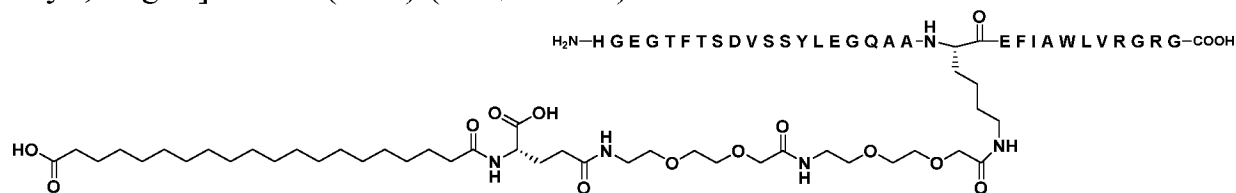
Для каждой отдельной дозы ацилированного инсулина строили кривую зависимости ответа от дозы по изменению уровня глюкозы крови во времени. Для иллюстрации влияния ацилированных инсулинов на уровень глюкозы в крови, для каждой индивидуальной кривой зависимости ответа от дозы рассчитывали площадь под кривой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

На ФИГ. 7a–7b показано, что ацилированный инсулин, раскрытый в данном

документе, также характеризуются очень хорошим гипогликемическим эффектом, т. е. очень хорошим лекарственным эффектом у крыс с сахарным диабетом I типа (СДТ1).

Пример 8.

Пептид N - ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-карбоксихекодеcanoиламино)-4(*S*)-карбоксивутианоиламино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) (вещество 6)



1. Получение пептида N - ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-карбоксихекодеcanoиламино)-4(*S*)-карбоксивутианоиламино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)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 Na_2HPO_4 (150 мл) и добавляли ацетонитрил (100 мл). Доводили pH до 10–12,5 с помощью 1 N NaOH. *Трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu(2 $\times$ 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- γ Glu-(2 $\times$ 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 (Scie $\times$ 100API): $m/z = 584,44(M+1)^+$

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*-бутилметилловый 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 (Scie $\times$ 100API): $m/z = 681,46(M+1)^+$

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): $m/z = 874,59(M+1)^+$

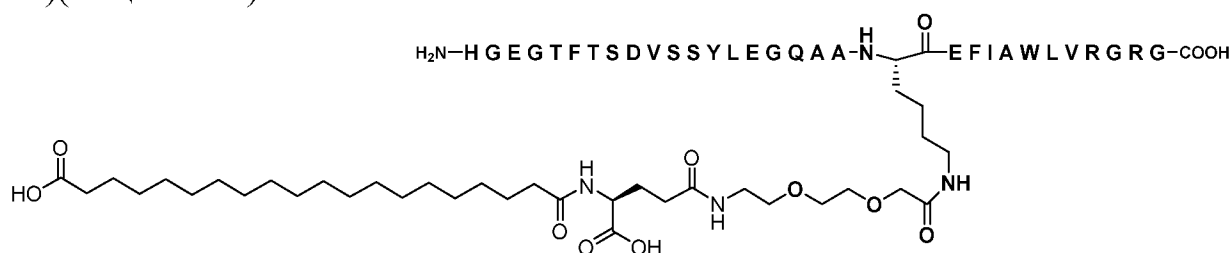
2.5 *Трет*-бутил эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OSu)-OtBu

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 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 $\times$ OEG-OSu)-OtBu (31,09 г; выход 91%).

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

Пример 9.

Пептид N - ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[19-карбоксихекозаноиламино]-4(*S*)-карбоксивалерианоиламино)этокси]этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)(вещество 7)



Пептид N - ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[19-карбоксихекозаноиламино]-4(*S*)-карбоксивалерианоиламино)этокси]этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)

получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 примера 8.

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

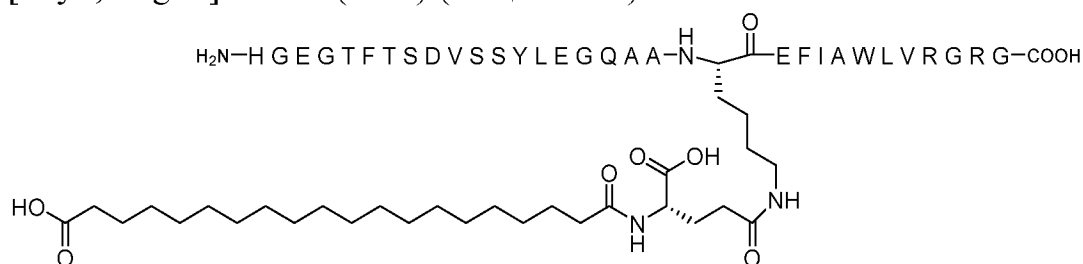
Промежуточное вещество *трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(OEG-OSu)-OtBu

получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 8.

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

Пример 10.

Пептид N - ϵ^{26} -(19-карбоксихнадеканамино)-4(*S*)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) (вещество 8)



Пептид N - ϵ^{26} -(19-карбоксихнадеканамино)-4(*S*)-карбоксибутаноил-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 примера 8.

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

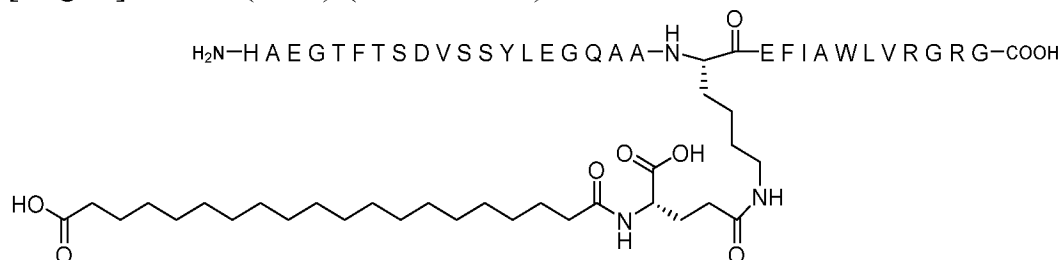
Промежуточное вещество *трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(OSu)-OtBu

получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 8.

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

Пример 11.

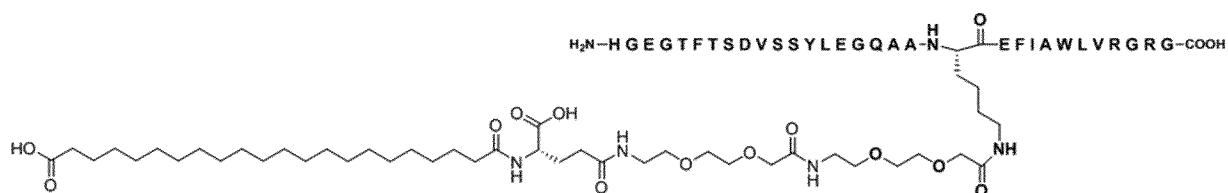
Пептид N - ϵ^{26} -(19-карбоксихнадеканамино)-4(*S*)-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37) (вещество 9)



Пептид N - ϵ^{26} -(19-карбоксихнадеканамино)-4(*S*)-карбоксибутаноил-[Arg34]GLP-1-(7-37) получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 примера 8.

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

Пептид N - ε^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) (вещество 12)



Пептид N - ε^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-карбоксигенэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 примера 8.

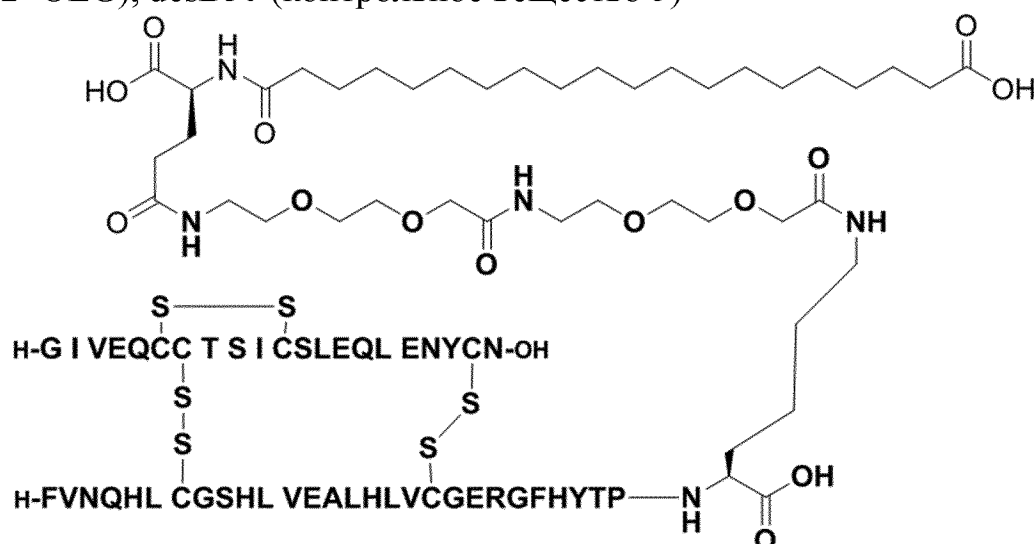
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1035,80[M+4H]^{4+}$

Промежуточное вещество *трет*-бутил-докозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 8.

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 999,64(M+1)^+$

Сравнительный пример 5.

Человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K($N(\varepsilon)$ -эйкозандиоил- γ Glu-2 $\times$ OEG), desB30 (контрольное вещество 5)



1. Получение человеческого инсулина A14E, B16H, B25H, B29K($N(\varepsilon)$ -эйкозандиоил- γ Glu-2 $\times$ 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 Na_2HPO_4 (150 мл) и добавляли ацетонитрил (100 мл). Доводили pH до 10–12,5 с помощью 1 N NaOH. *Трет*-бутил-эйкозандиоил- $\gamma\text{Glu}-(2\times\text{OEG-OSu})-\text{OtBu}$ (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): $m/z = 1063,6852[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$

2. Получение промежуточного вещества *трет*-бутил-эйкозандиоил- $\gamma\text{Glu}-(2\times\text{OEG-OSu})-\text{OtBu}$ 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 (Scie×100API): $m/z = 496,36(M+1)^+$

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 (Scie×100API): $m/z = 584,44(M+1)^+$

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*-бутилметилэфир, 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 (Scie $\times$ 100API): $m/z = 681,46(M+1)^+$

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 (Scie $\times$ 100API): $m/z = 874,59(M+1)^+$

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

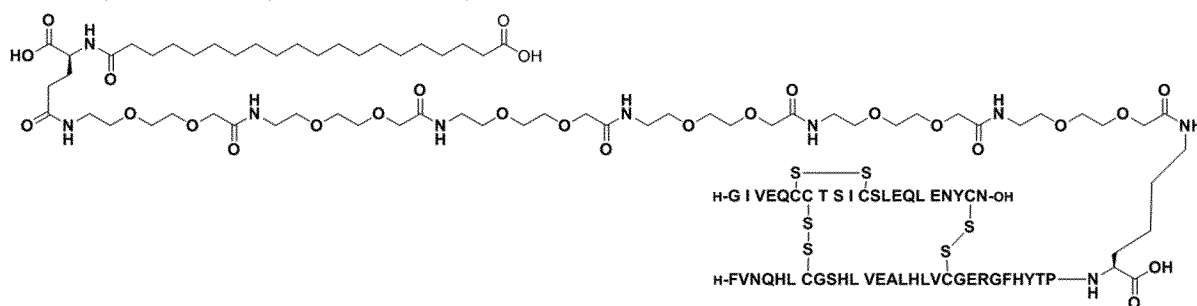
Трет-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(2 $\times$ OEG-OH)-OtBu (30,75 г, 35,18 ммоль) растворяли в дихлорметане (300 мл) в атмосфере азота, и добавляли триэтиламин (9,03 мл). Смесь перемешивали в течение 10 мин, и добавляли NHS (4,05 г, 35,18 ммоль), с последующим добавлением DCC (7,98 г, 38,70 ммоль). Реакционную 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 $\times$ 100API): $m/z = 971,61(M+1)^+$

Пример 15.

Человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30 (вещество 13)



Вещество человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 сравнительного примера 5.

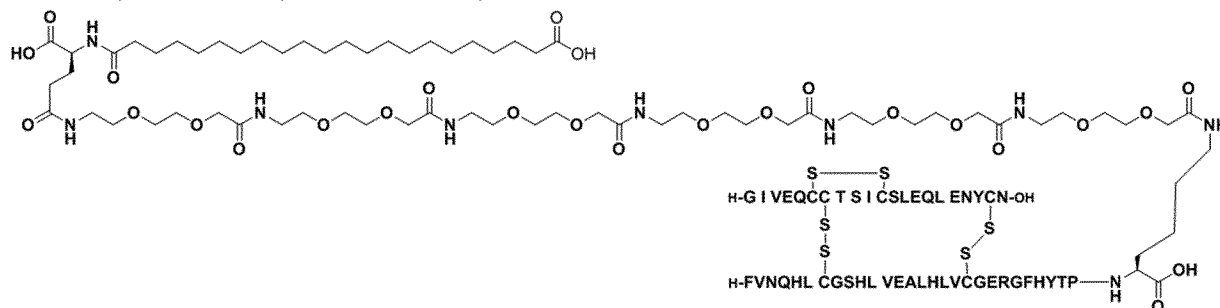
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1160,3997[M+6H]^{6+}$

Промежуточное вещество *трет*-бутил-эйкозандиоил- γ Glu-(6 $\times$ OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 сравнительного примера 5.

ЖХ-МС (Scie $\times$ 100API): $m/z = 1551,90(M+1)^+$

Пример 16.

Человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30 (вещество 14)



Вещество человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 1 сравнительного примера 5.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1165,0674[M+6H]^{6+}$

Промежуточное вещество *трет*-бутил-докозандиоил-γGlu-(6×OEG-OSu)-OtBu получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 сравнительного примера 5.

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

Пример 17.

Использованы аналогичные экспериментальные методики из примера 7 для фармакодинамического исследования у крыс со стрептозотоцин (STZ)-индуцированным диабетом I типа (СДТ1).

В момент времени -1 ч (9:30) в день эксперимента до его начала у крыс определяли исходный уровень глюкозы в крови и массу тела. Каждую из крыс 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 подкожная инъекция патентуемых веществ из сравнительного примера 5, примера 15 и примера 16 (контрольное вещество 5, вещество 13 и вещество 14) в дозах 33,5 Ед/кг, причем растворитель содержал: 5,65 мг/мл фенола, 15 мг/мл глицерина, 0,708 мг/мл гидрофосфата динатрия и 0,585 мг/мл хлорида натрия с pH 7,6.

Каждый из ацилированных инсулинов растворяли в растворителе до концентрации введения 33,5 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), и уровень глюкозы в крови крыс отслеживали в моменты времени 3 ч, 6 ч, 9 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч и 120 ч после введения.

Для каждой отдельной дозы ацилированного инсулина (контрольное вещество 5, вещество 14 и вещество 13) 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. Чем меньше значение AUC, тем лучше гипогликемический эффект и тем лучше лекарственный эффект.

На ФИГ. 8a–8b показано, что ацилированные инсулины, раскрытые в данном документе, характеризуются неожиданно повышенным лекарственным эффектом. Например, по сравнению с патентуемым веществом сравнительного примера 5, вещества 13 и 14 (патентуемые вещества из примеров 15 и 16) характеризуются лучшим гипогликемическим действием, т. е. лучшим лекарственным эффектом, у крыс с STZ-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

Пример 18.

Использовали аналогичные экспериментальные процедуры из примера 17 для фармакодинамического исследования у самок крыс со стрептозотоцин (STZ)-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1), за исключением того, что используемые ацилированные инсулины представляли собой патентуемые вещества из примеров 2 и 4 (вещество 2 и вещество 4), вводимые в дозе 67 Ед/кг.

Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 9a–9b, на которых показано, что ацилированные инсулины (вещество 2 и вещество 4), раскрытые в данном документе, также характеризуются очень хорошим гипогликемическим эффектом, т. е. очень хорошим лекарственным эффектом у самок крыс с сахарным диабетом I типа (СДТ1).

Пример 19.

Фармакодинамическое исследование у мышей линии db/db

Использованы аналогичные экспериментальные методики из примера 6 для изучения патентуемых веществ из сравнительного примера 5 и примеров 15 и 16 (т. е. контрольного вещества 5, вещества 13 и вещества 14) в исследовании с использованием одной дозы в модели мышей с ожирением и сахарным диабетом (мыши линии db/db). Гипогликемический эффект ацилированных инсулинов изучали для дозы 9 Ед/кг.

Самцов мышей линии db/db (BKS/Lepr) 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% 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 подкожная инъекция ацилированных инсулинов в дозе 9 Ед/кг, причем растворитель содержал: 5,65 мг/мл фенола, 15 мг/мл глицерина, 0,708 мг/мл гидрофосфата динатрия и 0,585 мг/мл хлорида натрия со значением рН 7,6.

Каждый из ацилированных инсулинов растворяли в растворителе до концентрации введения 1,8 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 и 21,5 ч после введения. В ходе изучения для имитации приема пищи начинали пероральный тест на толерантность к глюкозе (ПТТГ) после измерения глюкозы в крови в 21,5-часовой временной точке. Уровень глюкозы в крови измеряли в моменты 30 мин, 60 мин, 120 мин и 360 мин после внутрижелудочного введения раствора глюкозы (100 мг/мл, 7,5 мл/кг). После прохождения 360-минутной временной точки измеряли глюкозу в крови в первом тесте ПТТГ, начинали второй тест ПТТГ, и уровень глюкозы крови измеряли в моменты 30 мин, 90 мин, 210 мин и 360 мин после внутрижелудочного введения раствора глюкозы (50 мг/мл, 10 мл/кг). После прохождения 360-минутной временной точки измеряли глюкозу в крови во втором тесте ПТТГ, начинали третий тест ПТТГ, и глюкозу в крови измеряли в моменты 30 мин, 60 мин и 120 мин после внутрижелудочного введения

раствора глюкозы (50 мг/мл и 10 мл/кг). Лекарственный эффект испытуемых веществ не исчез во время последнего теста ПТТГ, и тест был прекращен после определения уровня глюкозы в крови в 36-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 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.

На ФИГ. 10a–10b показано, что относительно контрольного вещества 5, ацилированные инсулины (вещество 14 и вещество 13), раскрытые в данном документе, значительно улучшили гипогликемический эффект у мышей линии db/db с сахарным диабетом II типа.

Пример 20.

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

Крыс линии SD (половина —самки и 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, условия в помещении контролировали на уровне 40–60% относительной влажности и 22–24 °C. После периода адаптации в течение 4 дней крысы голодали в течение 12 ч, и 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 значение глюкозы в крови превышало 20 ммоль/л отбирали в качестве модельных крыс с СДТ1 для последующих

экспериментов.

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. Каждую из крыс 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 подкожная инъекция патентуемых веществ из сравнительного примера 5 и примера 16 (т. е. контрольное вещество 5 и вещество 14) в дозах 25 Ед/кг, причем растворитель содержал: 5,65 мг/мл фенола, 15 мг/мл глицерина, 0,708 мг/мл гидрофосфата динатрия и 0,585 мг/мл хлорида натрия с 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.

Как показано на ФИГ. 11a–11b, относительно контрольного вещества 5 ацилированный инсулин, раскрытый в данном документе, после введения характеризуется неожиданно повышенным гипогликемическим эффектом у крыс с сахарным диабетом I типа (СДТ1), и гипогликемический эффект вещества 14 значительно превосходит эффект контрольного вещества 5.

Пример 21.

Фармакодинамическое исследование у мышей C57/6J со стрептозотоцин (STZ)-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1)

Данное исследование предназначалось для демонстрации регуляторного эффекта композиции, содержащей раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, на уровень глюкозы в крови (BG) у мышей C57/6J со стрептозотоцин (STZ)-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

Самцов мышей линии C57/6J (приобретенных у Vital River) возрастом 4–6 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% ОВ и 22–24 °С. После периода адаптации длительностью 1–2 недели мышей использовали в эксперименте.

После периода адаптации мыши голодали в течение 12 ч, и им внутрибрюшинно вводили раствор стрептозотоцина (Sigma) (10 мг/мл, в 0,1 М цитратном буфере) в дозе 150 мг/кг. Через 3 дня после введения стрептозотоцина проводили выборочное определение уровня глюкозы в крови, и мышей, у которых уровень глюкозы в крови превышал 20 ммоль/л отбирали в качестве модельных мышей с СДТ1 для последующих экспериментов.

В день эксперимента до его начала у мышей определяли случайный 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. Всего было 5 групп по 8 мышей в каждой, и лечение групп было следующим: подкожная инъекция растворителя; подкожная инъекция инсулина аспарт (0,36 Ед/кг); подкожная инъекция фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, дозы инсулина деглудек и инсулина аспарт составляли 0,84 Ед/кг и 0,36 Ед/кг, соответственно; подкожная инъекция двух фармацевтических композиций, содержащих вещество 4 (патентуемое вещество из примера 4 настоящего изобретения) и инсулин аспарт, при инъекции данных двух

композиций дозы вещества 4 составляли 0,82 Ед/кг и 0,64 Ед/кг, соответственно, и доза инсулина аспарт составляла 0,36 Ед/кг, причем растворитель содержал: 19,6 мг/мл глицерина, 1,5 мг/мл фенола, 1,72 мг/мл м-крезола и 55 мкг/мл ионов цинка, с рН 7,6.

Каждый из предварительно смешанных растворов вещества 4 и инсулина аспарт растворяли в растворителе до концентрации введения 0,072 Ед/мл (на основе концентрации инсулина аспарт в предварительной смеси), 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. Введение выполняли примерно в 16:00 (момент времени 0), и во время лечения мыши голодали, но имели свободный доступ к воде, а уровень глюкозы в крови мышей определяли в моменты времени 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 6 ч и 15 ч после введения.

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). Строили кривую зависимости ответа от дозы по изменению уровня глюкозы крови во времени. Для иллюстрации влияния предварительно смешанных инсулинов, раскрытых 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.

На ФИГ. 12a–12b показано, что после введения фармацевтическая композиция, содержащая раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, характеризуется неожиданно повышенным гипогликемическим эффектом у мышей с сахарным диабетом I типа (СДТ1) относительно фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, и сохраняет возможность давать лучший или сравнимый гипогликемический эффект, когда соотношение доз вещества 4 и инсулина аспарт меньше соотношения инсулина деглудек и инсулина аспарт.

Пример 22.

С помощью методик, аналогичных описанным в примере 21, изучали регуляторный эффект композиции, содержащей раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, на уровень глюкозы в крови (BG) у мышей C57/6J со стрептозотоцин (STZ)-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

В день эксперимента до его начала у мышей определяли случайный 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. Всего было 7 групп по 8 мышей в каждой, и лечение групп было следующим: подкожная инъекция растворителя; подкожная инъекция инсулина аспарт (3 Ед/кг); подкожная инъекция фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, дозы инсулина деглудек и инсулина аспарт составляли 7 Ед/кг и 3 Ед/кг, соответственно; подкожная инъекция четырех фармацевтических композиций, содержащих вещество 4 (патентуемое вещество из примера 4 настоящего изобретения) и инсулин аспарт, при инъекции данных четырех композиций дозы вещества 4 составляли 6,79 Ед/кг, 5,34 Ед/кг, 3,84 Ед/кг и 2,39 Ед/кг, соответственно, и доза инсулина аспарт всегда составляла 3 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 pH 7,6.

Каждый из предварительно смешанных растворов вещества 4 и инсулина аспарт растворяли в растворителе до концентрации введения 0,6 Ед/мл (на основе концентрации инсулина аспарт в предварительной смеси), и объем введения составлял 5 мл/кг (т. е. 50 мкл/10 г массы тела). Введение осуществляли путем подкожной инъекции (п/к) в загривок. Введение выполняли ежедневно примерно в 17:00 (момент времени 0) в течение 10 последовательных дней, и во время лечения мыши имели свободный доступ к пище и воде. У мышей определяли уровень глюкозы в крови перед четвертым, восьмым и десятым введениями (0 ч) и случайный уровень глюкозы в крови в момент времени 1 ч после четвертого, восьмого и десятого введений, а также измеряли уровень глюкозы в крови перед восьмым введением (0 ч) и

случайный уровень глюкозы в крови в моменты времени 0,5 ч, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 16 ч и 24 ч после этого введения. Мыши голодали в течение 1 ч после последнего введения, а затем у них отбирали кровь из глазной орбиты и измеряли процент гликированного гемоглобина (Hb1Ac) в цельной крови.

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). После восьмого введения строили кривую зависимости ответа от дозы по уровню глюкозы крови во времени. Для иллюстрации влияния предварительно смешанных инсулинов, раскрытых данным документе, на уровень глюкозы в крови, после восьмого введения для каждой индивидуальной кривой зависимости ответ от дозы рассчитывали площадь под кривой изменения 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.

На ФИГ. 13a–16 показано, что после введения фармацевтические композиции, содержащие раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, характеризуются неожиданно повышенным гипогликемическим эффектом у мышей с сахарным диабетом I типа (СДТ1) и также превосходным кумулятивным гипогликемическим эффектом относительно фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт.

Конкретно, на ФИГ. 13a–13b показано, что после введения композиции, содержащие раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, характеризуются неожиданно повышенным гипогликемическим эффектом у мышей с сахарным диабетом I типа (СДТ1) относительно фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, и сохраняют возможность давать лучший гипогликемический эффект, когда соотношение доз вещества 4 и инсулина аспарт намного меньше соотношения инсулина деглудек и инсулина аспарт.

На ФИГ. 14a–14c показаны уровни глюкозы в крови у мышей в каждой группе введения перед четвертым, восьмым и десятым введениями (0 ч),

соответственно, указывающие на то, что фармацевтические композиции, содержащие раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, характеризуются лучшим лекарственным эффектом и более выраженным кумулятивным гипогликемическим эффектом относительно фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт.

На ФИГ. 15a–15c показаны уровни глюкозы в крови у мышей на момент 1 ч после четвертого, восьмого и десятого введений, соответственно, указывающие на то, что фармацевтические композиции, содержащие раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, характеризуются лучшим лекарственным эффектом и более выраженным кумулятивным гипогликемическим эффектом относительно фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт.

На ФИГ. 16 показано, что после введения композиции, содержащие раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, характеризуются лучшим снижающим Hb1Ac эффектом относительно фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, и сохраняют возможность давать лучший снижающий Hb1Ac эффект, когда соотношение доз вещества 4 и инсулина аспарт намного меньше соотношения инсулина деглудек и инсулина аспарт.

Пример 23.

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

Композиции с ацилированными инсулинами

Вещество 4 (патентуемое вещество из примера 4 настоящего изобретения) растворяли в 0,1% растворе NaOH до конечной концентрации 4,8 мМ (с pH примерно 10–11), и последовательно добавляли фенол, м-крезол, ацетат цинка, глицерин и хлорид натрия в соответствии с количеством каждого компонента, указанным в следующей таблице, для получения составов 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 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 2 показано увеличение количества ВМБ при температурах 25 °С и 37 °С на день 14 и день 20 относительно дня 0.

Таблица 2

1,2 мМ вещества 4 10 мМ <i>m</i> -крезола 17 мг/мл глицерина рН 7,4	25 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	25 °С Увеличение количества ВМБ на день 20 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 20 относительно 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	0,03	0,04	0,16	0,28

инс. + 30 мМ NaCl				
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 рН 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 3 показано увеличение количества родственных соединений при температуре 37 °С в 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	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 24.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности композиций с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе. Готовили составы с ацилированными инсулинами из таблиц 4–6, в соответствии с количеством каждого компонента, указанного ниже в таблицах 4–6, по методикам, аналогичным описанным в примере 23. Кроме того, изменения в количестве ВМБ и родственных соединений определяли по методикам, аналогичным описанным в примере 23. В таблицах 4–6, приведенных ниже, показаны изменения количества ВМБ и родственных соединений в составах с ацилированными инсулинами различных формул.

Таблица 4

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 5

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	37 °C Увеличение количества ВМБ на день	37 °C Степень увеличения за сутки
--	--	--	--

pH 7,4	26 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 6

0,6 мМ вещества 2 60 мМ фенола 15 мг/мл глицерина 5 мМ дигидрофосфат 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 Na_2HPO_4 , из чего следует, что все составы с ацилированными инсулинами, полученными по настоящему изобретению, характеризуются хорошей химической стабильностью.

Пример 25.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности композиций с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе. Готовили составы с ацилированными инсулинами из таблицы 7, в соответствии с количеством каждого компонента, указанного ниже в таблице 8, по методикам, аналогичным описанным в примере 23. Кроме того, изменение в количестве ВМБ и родственных соединений определяли по методикам, аналогичным описанным в примере 26. В таблице, приведенной ниже, показаны изменения количества ВМБ и родственных соединений в составах с ацилированными инсулинами различных формул.

Таблица 7

60 мМ фенола 4,5 Zn/6 инс. 15 мг/мл глицерина 5 мМ дигидрофосфат натрия 10 мМ м-крезола 10 мМ 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 мМ (100 Ед) вещества 4	0,77	1,62
2,1 мМ (350 Ед) вещества 4	0,57	1,08
3,0 мМ (500 Ед) вещества 4	0,53	1,03
4,2 мМ (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 26.

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

Крыс линии SD (половина —самки и половина —самцы) возрастом 8 недель и массой 170–250 г содержали в клетках для кормления соответствующего размера (4 крысы/клетка) в огороженном пространстве со свободным доступом к стандартной пище и очищенной воде, условия в помещении контролировали на уровне 40–70% относительной влажности и 22–26 °С. После периода адаптации в течение 4 дней крысы голодали в течение 12 ч, и им внутрибрюшинно вводили раствор стрептозотоцина (Sigma) (10 мг/мл, в 0,1 М цитратном буфере) в дозе 60 мг/кг. Через 4 дня и 8 дней после введения стрептозотоцина проводили выборочное определение уровня глюкозы в крови, и крыс, у которых уровень глюкозы в крови превышал 20 ммоль/л отбирали в качестве модельных крыс с СДТ1 для последующего эксперимента.

Эксперимент начали через 8 дней после отбора групп. За день до введения у крыс отслеживали исходный уровень глюкозы в крови и массу тела. Каждую из крыс 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, подкожная инъекция инсулина деглудек (50 Ед/мл) или подкожная инъекция вещества 4 (25 Ед/кг или 40 Ед/кг), причем растворитель содержал: 60 мМ фенола, 15 мг/мл глицерина, 10 мМ *m*-крезола и 0,585 мкг/мл хлорида натрия с pH 7,4.

Ацилированный инсулин растворяли в растворителе до концентрации введения 25 Ед/мл или 40 Ед/мл, и объем введения составлял 1 мл/кг (т. е. 0,1 мл/100 г массы тела). Введение осуществляли путем подкожной инъекции (п/к) в загривок один раз в два дня и повторяли 11 раз, и во время эксперимента крысы линии SD имели свободный доступ к пище и воде.

Ацилированный инсулин вводили примерно в 9:30–10:30. Уровень глюкозы в крови крыс отслеживали в моменты времени 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 24 ч и 48 ч после первого введения, а уровень глюкозы в крови крыс отслеживали в моменты времени 4 ч, 24 ч и 48 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.

Как показано на ФИГ. 17a–17b, относительно инсулина деглудек ацилированный инсулин, раскрытый в данном документе, после введения характеризуется неожиданно повышенным гипогликемическим эффектом у крыс с сахарным диабетом I типа (СДТ1), и гипогликемический эффект вещества 4 значительно превосходит эффект инсулина деглудек.

Пример 27.

С помощью методик, аналогичных описанным в примере 21, изучали регуляторный эффект композиции, содержащей раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, на уровень глюкозы в крови (BG) у мышей C57/6J со стрептозотоцин (STZ)-индуцированным сахарным диабетом I типа (СДТ1).

В день эксперимента до его начала у мышей определяли случайный 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. Всего было 8 групп по 9 мышей (5 самцов мышей и 4 самки мыши) в каждой, и лечение групп было следующим: подкожная инъекция растворителя; подкожная инъекция фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, дозы инсулина деглудек и инсулина аспарт составляли 7 Ед/кг и 3 Ед/кг, соответственно; подкожная инъекция шести фармацевтических композиций, содержащих вещество 4 (патентуемое вещество из примера 4 настоящего изобретения) и инсулин аспарт, при инъекции данных шести фармацевтических композиций

дозы вещества 4 составляли 1,49 Ед/кг, 1,99 Ед/кг, 2,45 Ед/кг, 2,85 Ед/кг, 3,43 Ед/кг и 3,92 Ед/кг, соответственно, и доза инсулина аспарт всегда составляла 3 Ед/кг, причем растворитель содержал: 60 мМ фенола, 10 мМ *m*-крезола, 15 мг/мл глицерина и 15 мМ Na_2HPO_4 , с рН 7,6.

Каждый из предварительно смешанных растворов вещества 4 и инсулина аспарт растворяли в растворителе до концентрации введения 0,6 Ед/мл (на основе концентрации инсулина аспарт в предварительной смеси), и объем введения составлял 5 мл/кг (т. е. 50 мкл/10 г массы тела). Введение осуществляли путем подкожной инъекции (п/к) в загривок. Введение выполняли ежедневно примерно в 16:00 (момент времени 0) в течение 15 последовательных дней, и во время лечения мыши имели свободный доступ к пище и воде. У мышей определяли случайный уровень глюкозы в крови перед первым, вторым, пятым, восьмым и пятнадцатым введениями (0 ч) и через 1 ч после этих введений, и измеряли уровень глюкозы в крови перед вторым, пятым, восьмым и пятнадцатым введениями (0 ч) и случайный уровень глюкозы в крови в моменты времени через 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 16 ч, 20 ч и 24 ч после этих введений. Мыши голодали в течение 2 ч после последнего введения, а затем у них отбирали кровь из глазной орбиты и измеряли процент гликированного гемоглобина (Hb1Ac) в цельной крови.

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). После пятнадцатого введения строили кривую зависимости ответа от дозы по изменению уровня глюкозы крови во времени. Для иллюстрации влияния предварительно смешанных инсулинов, раскрытых данном документе, на уровень глюкозы в крови, после пятнадцатого введения для каждой индивидуальной кривой зависимости ответа от дозы рассчитывали площадь под кривой изменения 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.

На ФИГ. 18a–18b показано, что после введения композиции, содержащие

раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, характеризуются неожиданно повышенным гипогликемическим эффектом у мышей с сахарным диабетом I типа (СДТ1) относительно фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, и сохраняют возможность давать лучший гипогликемический эффект, когда соотношение доз вещества 4 и инсулина аспарт намного меньше соотношения инсулина деглудек и инсулина аспарт.

На ФИГ. 19 показано, что после введения композиции, содержащие раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, характеризуются лучшим снижающим Hb1Ac эффектом относительно фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, и сохраняют возможность давать лучший снижающий Hb1Ac эффект, когда соотношение доз вещества 4 и инсулина аспарт намного меньше соотношения инсулина деглудек и инсулина аспарт.

Пример 28.

Фармакодинамическое исследование у мышей линии db/db

Данное исследование предназначалось для демонстрации регуляторного эффекта комбинации, содержащей раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, на уровень глюкозы в крови (BG) у модельных мышей с сахарным диабетом и ожирением (мыши линии db/db) в условиях индукции сахарного диабета.

Самцов мышей линии db/db (BKS/Lepr) 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% ОВ и 22–24 °С. После периода адаптации длительностью 1–2 недели мышей использовали для эксперимента.

В день эксперимента до его начала у мышей определяли случайный 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 Всего было 5 групп по 8 мышей в каждой, и лечение групп было следующим: подкожная инъекция растворителя;

подкожная инъекция фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, дозы инсулина деглудек и инсулина аспарт составляли 7 Ед/кг и 3 Ед/кг, соответственно; подкожная инъекция трех фармацевтических композиций, содержащих вещество 4 (патентуемое вещество из примера 4 настоящего изобретения) и инсулин аспарт, при инъекции данных трех фармацевтических композиций дозы вещества 4 составляли 2,0 Ед/кг, 2,4 Ед/кг и 3,84 Ед/кг, соответственно, и доза инсулина аспарт всегда составляла 3 Ед/кг, причем растворитель содержал: 60 мМ фенола, 10 мМ *m*-крезола, 15 мг/мл глицерина и 15 мМ Na_2HPO_4 , с pH 7,6.

Каждый из ацилированных инсулинов растворяли в растворителе до концентрации введения 0,6 Ед/мл, и объем введения составлял 5 мл/кг (т. е. 50 мкл/10 г массы тела). Введение осуществляли четыре раза путем подкожной инъекции (п/к) в загривок. Ацилированные инсулины вводили примерно в 9:30 (момент времени 0), и во время лечения мыши голодали, но имели свободный доступ к воде, а глюкозу в крови мышей определяли в моменты времени 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч и 12 ч после введения.

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 ацилированного инсулина, раскрытого 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.

На ФИГ. 20a–20b показано, что после введения композиции, содержащие раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, характеризуются неожиданно повышенным гипогликемическим эффектом у модельных мышей с ожирением и сахарным диабетом (мышь линии db/db)

относительно фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, и сохраняют возможность давать лучший гипогликемический эффект, когда соотношение доз вещества 4 и инсулина аспарт намного меньше соотношения инсулина деглудек и инсулина аспарт.

Пример 29.

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

Композиции с ацилированными инсулинами

Вещество 4 (патентуемое вещество из примера 4) растворяли в 0,03% растворе NaOH до концентрации 2,4 мМ, а затем довели 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 довели pH до 7,4. К раствору вещества 4 добавляли ацетат цинка тремя равными порциями в соответствии с количеством, указанным в таблице ниже, и довели 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 (внутр. диам. ID 8,0 мм × L 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 8 показано увеличение количества ВМБ при температурах 25 °С и 37 °С на день 14 и день 21 относительно дня 0.

Таблица 8

1,2 мМ вещества 4 10 мМ м-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 °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: 0,1 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 9 показано увеличение количества родственных соединений при температуре 37 °С на день 21 по сравнению с днем 0.

Таблица 9

1,2 мМ вещества 4 10 мМ м-крезола 17 мг/мл глицерина 45 мМ фенола 6,5 Zn/6 инс. 20 мМ NaCl	37 °С Увеличение количества родственных соединений в день 21 относительно дня 0 (%)
рН 7,0	2,43
рН 7,2	2,44
рН 7,4	2,22
рН 7,6	2,29
рН 8,0	3,34

Из таблицы, приведенной выше, можно видеть, что в пределах указанного выше диапазона рН 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 30.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности композиций с ацилированными инсулинами, раскрытыми в данном документе. Готовили составы с ацилированными инсулинами из таблиц 10 и 11, в соответствии с количеством каждого компонента, указанного ниже в таблицах 10 и 11, по методикам, аналогичным описанным в примере 29.

Кроме того, изменения в количестве ВМБ и родственных соединений определяли по методикам, аналогичным описанным в примере 29. В таблицах 10 и 11, приведенных ниже, показаны изменения количества ВМБ и родственных соединений в составах с ацилированными инсулинами различных формул.

Таблица 10

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 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 родственных соединений в день 42 относительно дня 0 (%)	37 °C Увеличение количества родственных соединений в день 21 относительно дня 0 (%)	37 °C 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 31.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности комбинированных составов ацилированного инсулина и инсулина аспарт, раскрытых в данном документе.

Касательно комбинированных составов ацилированного инсулина и инсулина аспарт, комбинации 1–5 получали в соответствии с количеством каждого компонента, приведенным в таблице 12, содержание Zn в веществе 4 выражено как Zn/6 моль ацилированного инсулина (сокращенно «Zn/6 инс.»).

Таблица 12

	Комбинация 1	Комбинация 2	Комбинация 3	Комбинация 4	Комбинация 5
Вещество 4	0,18 мМ (или 30 Ед/мл)				
Инсулин аспарт	0,18 мМ (или 30 Ед/мл)				
Ацетат цинка (мкг/мл)	22,46	22,46	26,38	22,46	24,42
п из Zn/6 инс.	11,5	11,5	13,51	11,5	12,51
Фенол (мМ)	40	40	40	70	55
NaCl (мМ)	45	75	45	45	60
Другие вспомогательные вещества	10 мМ <i>m</i> -крезола 8,5 мг/мл глицерина pH 7,4				

О химической стабильности композиций, описанных в этом примере, можно судить по изменению количества высокомолекулярного белка (ВМБ) после 14 и 28 дней хранения при температуре 37 °С относительно дня 0.

Определение содержания высокомолекулярного белка (ВМБ)

Содержание высокомолекулярного белка (ВМБ) определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Waters TSKgel G2000 SWXL (7,8×300 мм, 5 мкм) (температура колонки: 30 °С;

температура кюветы для образцов: 10 °С; подвижная фаза: 400 мл изопропанола, 300 мл ледяной уксусной кислоты и 300 мл воды; скорость потока: 0,5 мл/мин). Длина волны детектирования составляла 276 нм, а объем образца составлял 10 мкл. В таблице 13 показано увеличение количества ВМБ при температуре 37 °С в день 14 и день 28 относительно дня 0.

Таблица 13

Комбинированный состав	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 28 относительно дня 0 (%)
Комбинация 1	0,34	1,03
Комбинация 2	0,32	0,73
Комбинация 3	0,35	0,76
Комбинация 4	0,47	1,32
Комбинация 5	0,37	1,02

Из таблицы, приведенной выше, можно видеть, что количество ВМБ в приведенных выше комбинированных составах с ацилированным инсулином и инсулином аспарт, раскрытых в данном документе, очень медленно увеличивается с течением времени, из чего следует, что все приведенные выше комбинированные составы характеризуются превосходной химической стабильностью.

Пример 32.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности комбинированных составов ацилированного инсулина и инсулина аспарт, раскрытых в данном документе.

Готовили комбинации 6–10 в соответствии с количеством каждого компонента, указанным ниже в таблице 14. Кроме того, изменения в количестве ВМБ определяли по методикам, аналогичным описанным в примере 31. В таблице 15, приведенной ниже, показаны изменения количества ВМБ в составах с ацилированными инсулинами различных формул.

Таблица 14

	Комбинация 6	Комбинация 7	Комбинация 8	Комбинация 9	Комбинация 10
Вещество 4	0,165 мМ (или 27,5 Ед/мл)				
Инсулин аспарт	0,18 мМ (или 30 Ед/мл)				
Ацетат цинка (мкг/мл)	16,78	16,78	20,54	16,78	18,75
Zn/6 инс.	9,38	9,38	11,49	9,38	10,48
Фенол (мМ)	20	20	20	35	27,5
м-крезол (мМ)	16	10	10	10	16
Другие вспомогательные вещества	20 мМ NaCl 17 мг/мл глицерина рН 7,4				

Таблица 15

Комбинированный состав	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 14 относительно дня 0 (%)	37 °С Увеличение количества ВМБ на день 28 относительно дня 0 (%)
Комбинация 6	0,33	1,03
Комбинация 7	0,28	0,79
Комбинация 8	0,35	1,64
Комбинация 9	0,40	1,50
Комбинация 10	0,34	1,17

Из таблицы, приведенной выше, можно видеть, что количество ВМБ в приведенных выше комбинированных составах с ацилированным инсулином и инсулином аспарт, раскрытых в данном документе, очень медленно увеличивается с течением времени, из чего следует, что все приведенные выше комбинированные составы характеризуются превосходной химической стабильностью.

Пример 33.

Этот эксперимент предназначен для определения химической стабильности комбинированных составов раскрытого в данном документе ацилированного инсулина и инсулина аспарт.

Готовили комбинации 11 и 12 в соответствии с количеством каждого компонента, указанным ниже в таблице 16. Кроме того, изменения в количестве ВМБ определяли по методикам, аналогичных описанным в примере 31. В таблице 17, приведенной ниже, показаны изменения количества ВМБ в составах с ацилированными инсулинами различных формул.

Таблица 16

	Комбинация 11	Комбинация 12
Вещество 4	0,18 мМ (или 30 Ед/мл)	0,165 мМ (или 27,5 Ед/мл)
Инсулин аспарт	0,18 мМ (или 30 Ед/мл)	0,18 мМ (или 30 Ед/мл)
Ацетат цинка (мкг/мл)	18,75	18,75
Zn/6 инс.	9,61	10,48
Другие вспомогательные вещества	28 мМ фенола 10 мМ <i>m</i> -крезола 17 мг/мл глицерина 20 мМ NaCl pH 7,4	

Таблица 17

Комбинированный состав	37 °C Увеличение количества ВМБ на день 21 относительно дня 0 (%)	37 °C Увеличение количества ВМБ на день 28 относительно дня 0 (%)
Комбинация 11	0,63	0,87
Комбинация 12	0,77	1,18

Из таблицы, приведенной выше, можно видеть, что количество ВМБ в приведенных выше комбинированных составах с ацилированным инсулином и инсулином аспарт, раскрытых в данном документе, очень медленно увеличивается с течением времени, из чего следует, что оба приведенных

выше комбинированных состава характеризуются превосходной химической стабильностью.

Пример 34.

Фармакодинамическое исследование у мышей линии db/db

Данное исследование предназначалось для демонстрации регуляторного эффекта композиции, содержащей раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, на уровень глюкозы в крови (BG) у модельных мышей с сахарным диабетом и ожирением (мыши линии db/db) в условиях индукции диабета.

Использованы аналогичные экспериментальные методики из примера 28 для получения мышей линии db/db для экспериментов. В день эксперимента до его начала у мышей определяли случайный 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. Всего было 4 группы по 5 мышей в каждой, и лечение групп было следующим: подкожная инъекция растворителя; подкожная инъекция фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, дозы инсулина деглудек и инсулина аспарт составляли 9,3 Ед/кг и 4 Ед/кг, соответственно; подкожная инъекция фармацевтической композиции, содержащей вещество 4 (патентуемое вещество из примера 4 настоящего изобретения) и инсулин аспарт, при инъекции данной фармацевтической композиции дозы вещества 4 и инсулина аспарт составляли 3,7 Ед/кг и 4 Ед/кг, соответственно, причем растворитель содержал: 55 мМ фенола, 10 мМ м-крезола, 8,5 мг/мл глицерина и 60 мМ NaCl, с pH 7,6.

Раствор для инъекции ацилированного инсулина и такой раствор инсулина аспарт растворяли в растворителе до соответствующей концентрации введения, и объем введения составлял 5 мл/кг (т. е. 50 мкл/10 г массы тела). Введение осуществляли путем подкожной инъекции один раз в день. Во время лечения мыши получали свободный доступ к пище и воде, и у них определяли случайный уровень глюкозы в крови в моменты времени 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч и 8 ч после введения в день 21 последовательного процесса введения и

уровень глюкозы в крови натошак в моменты времени 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч и 8 ч и 10 ч после введения в день 18 последовательного процесса введения. 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 инъекции ацилированного инсулина и инсулина аспарт строили кривую зависимости ответа от дозы по изменению уровня глюкозы крови во времени.

Для иллюстрации влияния фармацевтической композиции, содержащей ацилированный инсулин и инсулин аспарт, раскрытой в данном документе, на уровень глюкозы в крови, для каждой индивидуальной кривой зависимости ответа от дозы рассчитывали площадь под кривой изменения 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.

На ФИГ. 21a–21d показано, что после введения фармацевтическая композиция, содержащая раскрытый в данном документе ацилированный инсулин и инсулин аспарт, характеризуется неожиданно повышенным гипогликемическим эффектом у модельных мышей с ожирением и сахарным диабетом (мыши линии db/db) относительно фармацевтической композиции, содержащей инсулин деглудек и инсулин аспарт, и сохраняет возможность давать лучший гипогликемический эффект и может обеспечивать большую длительность гликемического эффекта, когда соотношение доз вещества 4 и инсулина аспарт намного меньше соотношения инсулина деглудек и инсулина аспарт.

Пример 35.

Фармакокинетика

Данный пример предназначен для иллюстрации фармакокинетического профиля *in vivo* раскрытых в данном документе веществ.

Фармакокинетика у крыс SD

24 крысы SD распределяли в группу низкой дозы вещества 4 (патентуемое

вещество из примера 4), группу средней дозы вещества 4, группу высокой дозы вещества 4 и группу инсулина деглудек (по 6 крыс в каждой группе, половина — самки и половина — самцы), и крысам из этих четырех групп подкожно вводили 2 ЕД/кг вещества 4, 6 ЕД/кг вещества 4, 18 ЕД/кг вещества 4 и 14 ЕД/кг инсулина деглудек соответственно. У крыс из групп низкой, средней и высокой доз вещества 4 и группы инсулина деглудек перед введением (0 мин) и в моменты времени 0,5 ч, 1,5 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч после введения отбирали образцы крови для измерения концентрации в плазме. С использованием некомпартментной модели и программного обеспечения WinNonLin вер. 8.0 рассчитывали такие фармакокинетические параметры, как $C_{\max}$, $T_{\max}$, $T_{1/2}$, AUC_{0-t} , V_d , Cl и CBU . Результаты показаны в таблице 18.

Таблица 18. Фармакокинетические параметры у крыс SD после подкожной инъекции вещества 4 и инсулина деглудек

Доза (ЕД/кг)	$t_{1/2}$ (ч)	$T_{\max}$ (ч)	$C_{\max}$ (нг/мл)	AUC_{0-t} (ч*нг/мл)	AUC_{INF} (ч*нг/мл)	V_d МЕ/(нг/мл)/кг	Cl МЕ/(ч*нг/мл)/кг	CBU (ч)
Вещество 4 2 ЕД/кг	6,09	2,75	52,75	507,94	563,67	1336,24	152,02	6,36
Вещество 4 6 ЕД/кг	9,37	4,25	121,65	1879,09	2275,89	1589,15	115,39	8,54
Вещество 4 18 ЕД/кг	8,49	5,67	346,07	6054,42	6770,48	1375,99	113,09	10,88
Деглудек 14 ЕД/кг	2,76	2	1443,24	8896,67	8920,49	0,0063	0,0016	4,65

$C_{\max}$ — максимальная концентрация, $T_{\max}$ — время достижения максимальной концентрации, $T_{1/2}$ — период полного полувыведения, AUC_{0-t} — площадь под кривой «концентрация в плазме — время» с момента времени 0–t, AUC_{INF} — площадь по кривой «концентрация в плазме — время» от момента введения до бесконечности, V_d — кажущийся объем распределения, Cl — клиренс, CBU — среднее время удержания

Фармакокинетика у собак породы бигль

36 собак распределяли в группу низкой дозы вещества 4 (подкожно вводили

0,3 Ед/кг вещества 4), группу средней дозы вещества 4 (подкожно вводили 0,6 Ед/кг вещества 4), группу высокой дозы вещества 4 (подкожно вводили 1,2 Ед/кг вещества 4), группу внутривенной инъекции вещества 4 (внутривенно вводили 0,6 Ед/кг вещества 4), группу инсулина деглудек (подкожно вводили 0,6 Ед/кг инсулина деглудек) и группу внутривенной инъекции инсулина деглудек (внутривенно вводили 0,6 Ед/кг инсулина деглудек) (по 6 собак в каждой группе, половина — самки и половина — самцы). У собак из группы внутривенной инъекции вещества 4 и группы внутривенной инъекции инсулина деглудек перед введением и в моменты времени 2 мин, 10 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 30 ч, 36 ч и через 48 ч после введения отбирали образцы крови для измерения концентрации в плазме, у собак из групп низкой дозы вещества 4, высокой дозы вещества 4 и подкожной инъекции инсулина деглудек перед введением и в моменты времени 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 30 ч, 36 ч и через 48 ч после введения отбирали образцы крови для измерения концентрации в плазме, и собак из группы средней дозы вещества 4 подвергали 7-дневному последовательному введению, и перед введением и в моменты времени 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 30 ч, 36 ч, 48 ч и 72 ч (последнее введение) после введения для первого введения и последнего введения отбирали образцы крови для измерения концентрации в плазме. С использованием некомпартментной модели и программного обеспечения WinNonLin вер. 8.0 рассчитывали такие фармакокинетические параметры, как $C_{\max}$, $T_{\max}$, $T_{1/2}$, AUC_{0-t} и СБУ. Результаты показаны в таблице 19.

Таблица 19. Фармакокинетические параметры у собак породы бигль после инъекции вещества 4 и инсулина деглудек

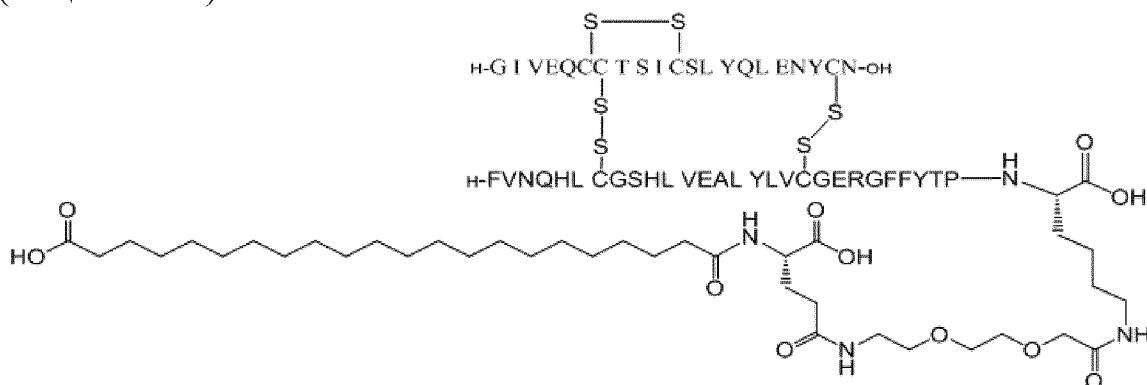
Доза (Ед/кг)	$T_{1/2}$ (ч)	$T_{\max}$ (ч)	$C_{\max}$ (нг/мл)	AUC_{0-t} (ч*нг/мл)	AUC_{INF} (ч*нг/мл)
Вещество 4 0,3 Ед/кг	6,79	5,34	11,5	170	182
Вещество 4 0,6 Ед/кг	6,2	5,33	35,9	598	617
Вещество 4	6	3,67	82,7	1117	1139

1,2 Ед/кг					
Вещество 4, внутривенная инъекция 0,6 Ед/кг	2,46	-	482	852	860
Деглудек 0,6 Ед/кг	3,205	3,665	84,145	645,07	649,575
Деглудек, внутривенная инъекция 0,6 Ед/кг	3,02	-	357,99	779,17	801,92

Из приведенных выше экспериментальных результатов видно, что вещество 4 — ацилированное производное инсулина, раскрытое в данном документе, демонстрирует более длительный период полувыведения и более стабильный гипогликемический эффект у крыс и собак породы бигль.

Пример 36.

Человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-OEG), desB30 (вещество 20)



Человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-OEG), desB30 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 1.

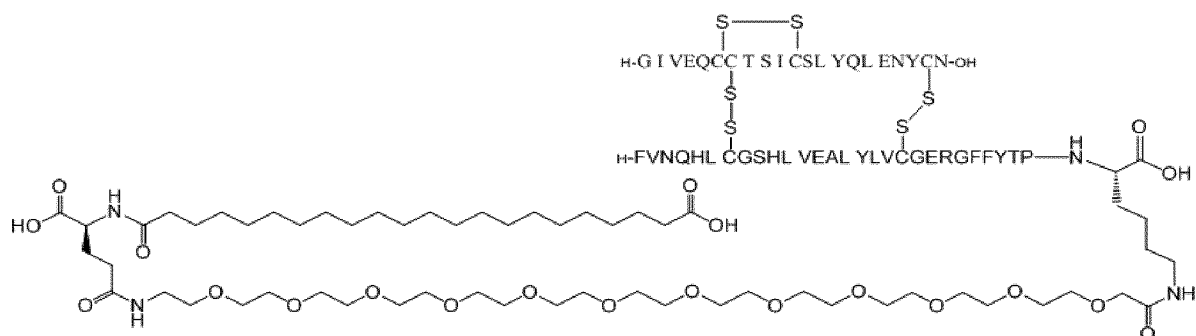
ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1266,8122[M+5H]^{5+}$

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

ЖХ-МС (Sciex100API): $m/z = 854,57(M+1)^+$

Пример 37.

Человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×PEG), desB30 (вещество 21)



Человеческий инсулин — вещество B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×PEG), desB30 получали по методикам, аналогичным описанным в разделе 2 примера 1.

ЖХ-МС (ИЭР): $m/z = 1354,8667[M+5H]^{5+}$

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

ЖХ-МС (Scie×100API): $m/z = 1294,83(M+1)^+$

Пример 38.

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 2, раскрытое в данном документе, и контрольное вещество 2 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.

Образы разводили подвижным буфером (Cytiva) или подвижным буфером, содержащим 2,0% ЧСА, так что концентрация вещества 2 в испытуемом образце и концентрация контрольного вещества 2 составляли 400 нМ в обоих вариантах условий. Выбирали чувствительный чип NTA (Cytiva) для проведения анализа ППР на приборе Biacore T200 (Cytiva) при температуре 25 °С. Вводили 0,5 М 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 мМ 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 результата исследования, характеризующего способность связывания с рецептором, выбирали значение отклика за первые 4 с диссоциации образца; для каждого образца исследование повторяли 3 раза.

На ФИГ. 22 показана способность связывания с рецептором вещества 2 и контрольного вещества 2 в присутствии 2% ЧСА (имитация физиологических условий) относительно 0% ЧСА. Из ФИГ. 22 можно видеть, что вещество 2 характеризуется значительно улучшенной способностью связывания с рецептором в присутствии 2% ЧСА относительно контрольного вещества 2, и альбумин влияет на способность вещества 2, раскрытого в данном документе, связываться с рецептором в значительно меньшей степени, чем в случае контрольного вещества 2.

Это говорит о том, что в присутствии альбумина производные инсулина, раскрытые в данном документе, например вещество 2, характеризуются неожиданно и значительно улучшенной способностью связывания с рецептором относительно контрольного вещества 2, и альбумин влияет на способность производных инсулина, раскрытых в данном документе, связываться с рецептором в значительно меньшей степени, чем в случае контрольного вещества 2.

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)

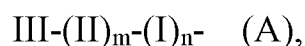
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Производное инсулина, содержащее 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 10, предпочтительно по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 25, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 36, предпочтительно 15–100, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–59, предпочтительно 30–54 атома углерода; или линкер Lin содержит по меньшей мере 5 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; предпочтительно линкер Lin содержит по меньшей мере 6 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; предпочтительно линкер Lin содержит 5–9 нейтральных и алкиленгликоль-содержащих аминокислотных остатков; или линкер Lin содержит алкиленгликоль, содержащий по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 24, предпочтительно 15–50, предпочтительно 20–39 атомов углерода; и альбумин-связывающий остаток содержит 20–40 атомов углерода; предпочтительно альбумин-связывающий остаток является линейной или разветвленной липофильной группой, содержащей 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 аминогруппой 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 равно 5, 6, 7, 8 или 9;

I представляет собой нейтральный и алкиленгликоль-содержащий аминокислотный остаток;

II представляет собой кислотный аминокислотный остаток;

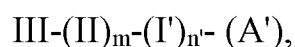
III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–24) атомов углерода, причем, формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I соединены амидными связями; и

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

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;

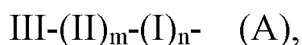
III представляет собой жирную кислоту или жирную дикислоту, содержащую 20–26 (предпочтительно 20–24) атомов углерода, причем, формально, из карбоксильной группы жирной кислоты и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа;

III, II и I' соединены амидными связями;

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

общее количество атомов углерода в (I')_n составляет 15–100, предпочтительно 20–100, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–59, предпочтительно 30–54.

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 или является целым числом от 1 до 10, и n равно 5, 6, 7, 8 или 9;

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;

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

или

ацильная группа представлена формулой (A'):

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;

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;

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

общее количество атомов углерода в (I')_n составляет 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–59, предпочтительно 30–54.

6. Производное инсулина по пункту 4 или 5, где

n предпочтительно 5, 6, 7 или 8; 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.

7. Производное инсулина по любому из пунктов 4–5, где

I представляет собой: -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-CH₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-

CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-CO-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-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)₁₀-CH₂-CO-, -HN-(CH₂-CH₂-O)₁₁-CH₂-CO-, -HN-(CH₂-CH₂-O)₁₂-CH₂-CO- или -HN-(CH₂-CH₂-CH₂-O)₈-CH₂-CO-; и/или

II 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; предпочтительно II выбран из γGlu и βAsp; 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 C-концевую часть I, или формула (A') связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина через C-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 или 5, где ацилированный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-5×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-6×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-6×OEG-γGlu-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-5×OEG-γGlu-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-βAsp-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-βAsp-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-αGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-αGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αAsp-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αAsp-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-7×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-8×OEG-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-8×OEG-γGlu-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-7×OEG-γGlu-γGlu), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-βAsp-7×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-βAsp-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-αGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-

человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-αGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αGlu-αGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αAsp-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-αAsp-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозаноил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозаноил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозаноил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-генэйкозаноил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-трикозансаноил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-тетракозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-12×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-12×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-13×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-13×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-14×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-14×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-15×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-15×PEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-16×PEG), desB30;

человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-16×PEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-17×PEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-17×PEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-18×PEG), desB30;
 человеческий инсулин и человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-18×PEG), desB30.

13. Производное инсулина по пункту 4 или 5, причем ацилированный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-гексакозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-

эйкозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-7 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-7 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-9 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-9 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-12 $\times$ PEG), desB30; и человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-12 $\times$ PEG), desB30.

14. Производное инсулина по пункту 4 или 5, причем ацилированный инсулин выбран из группы, включающей человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин и человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG).

15. Фармацевтическая композиция, содержащая производное инсулина, по любому из пунктов 1–14, и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

16. Фармацевтическая композиция по пункту 15, причем фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере 1,5 моль ионов цинка/6 моль производного 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 производного инсулина; предпочтительно по меньшей мере 4,5 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина; предпочтительно 4,5–12 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина; более предпочтительно 4,5–10 моль ионов цинка/6 молей производного инсулина; более предпочтительно 4,5–8 моль ионов цинка/6 молей производного инсулина; более предпочтительно 4,5–7,5 моль ионов цинка/6 молей 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 рН в диапазоне от 6,5 до 8,5; предпочтительно рН составляет 6,8–8,2; предпочтительно рН составляет 7,0–8,2; предпочтительно рН составляет 7,2–7,6; более предпочтительно рН составляет 7,4 или 7,6. 17. Фармацевтическая композиция по пункту 16, причем 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.

18. Фармацевтическая композиция по пункту 17, где 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 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 производного 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.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 15–18, где производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ε)-

докозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая примерно 0,6–4,2 мМ производного инсулина, по любому из пунктов 1–14, от примерно 1% до примерно 1,8% (об./об.) 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- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая примерно 0,6 или 1,2 мМ производного инсулина по любому из пунктов 1–14, 1,7% (об./об.) глицерина, примерно 45 мМ фенола, примерно 10 мМ *m*-крезола, примерно 6,5 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 B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(N(ϵ)-

докозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-12 $\times$ PEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30;

предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-12 $\times$ PEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30.

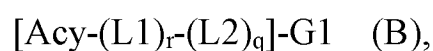
22. Фармацевтическая композиция, содержащая примерно 0,6–4,2 мМ инсулина, по любому из пунктов 1–14, от примерно 1% до примерно 2% (предпочтительно примерно 1,5–1,7%) (об./об.) глицерина, примерно 15–60 мМ (предпочтительно примерно 30–60 мМ, более предпочтительно примерно 45–60 мМ) фенола, примерно 1,5–7,0 (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 примерно 0–25 мМ (предпочтительно примерно 0–10 мМ) *m*-крезола и имеющая pH примерно 7,0–8,2, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-5 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин B29K(*N*(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-8 $\times$ OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-эйкозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30 или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(*N*(ϵ)-докозандиоил- γ Glu-6 $\times$ OEG), desB30.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая примерно 1,2–1,5 мМ инсулина, по любому из пунктов 1–14, примерно 1,5–1,7% (об./об.) глицерина, примерно 45–60 мМ фенола, примерно 2,2–4,5 моль ионов цинка/6 моль

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

24. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 15–23, дополнительно содержащая инсулинотропное вещество GLP-1; предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит инсулинотропное вещество 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 $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)ацетил][Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$; и пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-карбоксигептадеканоиламино)-4(S)-карбоксибутаноиламино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси]этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$.

25. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 15–23, 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;

Asu 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;

Asu, L1 и L2 соединены амидными связями; и

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

26. Фармацевтическая композиция по пункту 25, где

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

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

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

27. Фармацевтическая композиция по пункту 25 или 26, где

L2 представляет собой: $-HN-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-CO-$, $-HN-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-CO-$, $-HN-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-CO-$, $-HN-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-CO-$, $-HN-(CH_2)_3-O-(CH_2)_4-O-(CH_2)_3-NH-CO-$, $-HN-(CH_2)_3-O-(CH_2)_4-O-(CH_2)_3-NH-$

CO-CH₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-CH₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-CO-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-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 L2 представляет собой -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-; и/или

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

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

28. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 25–27, где Асу, L1 и L2 в формуле (В) последовательно соединены амидными связями, и С-конец L2 связан с ε-аминогруппой остатка Lys в положении 26 аналога GLP-1.

29. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 25–27, где инсулинотропное вещество GLP-1 выбрано из группы, включающей:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-карбоксивинонадеканоилами́но)-4(S)-карбоксивутаноиламино]этокси)этокси)ацетилами́но)этокси]этокси)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

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

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-карбоксивинэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксивутаноиламино]этокси)этокси)ацетилами́но)этокси]этокси)ацетил][Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

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

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

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

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

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

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

пептид $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(20-карбоксивэйкозаноиламино)-4(S)-карбоксивутаноиламино]этокси)этокси)ацетилами́но)этокси]этокси)ацетил][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)}$,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

30. Фармацевтическая композиция по пункту 25, где инсулинотропное вещество GLP-1 выбрано из группы, включающей

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

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

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

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

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

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

предпочтительно инсулинообразное вещество GLP-1 представляет собой:

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

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

31. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 15–23, дополнительно содержащая инсулин быстрого действия.

32. Фармацевтическая композиция по пункту 31, где инсулин быстрого действия представляет собой один или более инсулинов, выбранных из группы, включающей человеческий инсулин Asp^{B28} , человеческий инсулин $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$, человеческий инсулин $\text{Lys}^{\text{B3}}\text{Glu}^{\text{B29}}$, человеческий инсулин и человеческий инсулин desB30 ; предпочтительно инсулин быстрого действия представляет собой человеческий инсулин Asp^{B28} , человеческий инсулин $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$, человеческий инсулин $\text{Lys}^{\text{B3}}\text{Glu}^{\text{B29}}$, человеческий инсулин или человеческий инсулин desB30 .

33. Фармацевтическая композиция по пункту 31 или 32, где молярное соотношение производного инсулина и инсулина быстрого действия составляет от примерно 60:3 до примерно 0.5:3, предпочтительно от примерно 57:3 до примерно 1:3, предпочтительно от примерно 55:3 до примерно 1,2:3, предпочтительно от примерно 50:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 40:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 30:3 до примерно 1,5:3, предпочтительно от примерно 27:3 до примерно 1,5:3,

[illegible]

предпочтительно от примерно 5,3:3 до примерно 2:3, предпочтительно от примерно 5:3 до примерно 2:3, предпочтительно от примерно 4,8:3 до примерно 2:3, предпочтительно от примерно 4,5:3 до примерно 2:3, предпочтительно от примерно 4,2:3 до примерно 2:3, предпочтительно от примерно 4:3 до примерно 2:3, предпочтительно от примерно 3,9:3 до примерно 2:3, предпочтительно от примерно 3,8:3 до примерно 2:3, предпочтительно от примерно 3,5:3 до примерно 2:3, предпочтительно от примерно 3,2:3 до примерно 2:3, предпочтительно от примерно 3:3 до примерно 2:3, предпочтительно от примерно 15:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 12:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 10:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 9:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 8:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 7:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 6,9:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 6,8:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 6,5:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 6,3:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 6:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 5,8:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 5,5:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 5,3:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 5:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 4,8:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 4,5:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 4,2:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 4:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 3,9:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 3,8:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 3,5:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 3,2:3 до примерно 2,4:3, предпочтительно от примерно 3:3 до примерно 2,4:3, более предпочтительно примерно 1,5:3, более предпочтительно примерно 2:3, более предпочтительно примерно 2,5:3, более предпочтительно примерно 2,75:3 или более предпочтительно примерно 3:3.

34. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 31–33, где производное инсулина представляет собой производное инсулина по любому из пунктов 12–14; предпочтительно производное инсулина представляет

собой человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30;
 человеческий инсулин B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30;
 человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-7×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-докозандиоил-γGlu-9×OEG), desB30; более предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин B29K(NN(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30 или человеческий инсулин B29K(N(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30.

35. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 31–34, содержащая примерно 0,09–0,36 мМ производного инсулина, примерно 0,18 мМ человеческого инсулина Asp^{B28}, от примерно 0,85% до примерно 2,0% (об./об.) глицерина, примерно 15–70 мМ фенола, примерно 8–14 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина, примерно 10–120 мМ хлорида натрия и

примерно 0–15 мМ *m*-крезола и имеет рН примерно 7,0–8,2, причем производное инсулина представляет собой человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин А14Е, В16Н, В25Н, В29К(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; или человеческий инсулин А14Е, В16Н, В25Н, В29К(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30.

36. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 31–35, содержащая примерно 0,165–0,18 мМ производного инсулина, примерно 0,18 мМ человеческого инсулина Asp^{B28}, примерно 1,5–1,7% (об./об.) глицерина, примерно 20–30 мМ фенола, примерно 9–12 моль ионов цинка/6 моль производного инсулина, примерно 20–75 мМ хлорида натрия и примерно 10–15 мМ *m*-крезола и имеет рН примерно 7,0–8,2, причем предпочтительно производное инсулина представляет собой человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-5×OEG), desB30; человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-6×OEG), desB30; человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-эйкозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30; человеческий инсулин В29К(*N*(ε)-докозандиоил-γGlu-8×OEG), desB30.

37. Производное инсулина по любому из пунктов 1–14 или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 15–36 для применения в качестве лекарственного средства.

38. Производное инсулина по любому из пунктов 1–14 или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 15–36 для применения в качестве лекарственного средства для лечения или профилактики сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе.

39. Производное инсулина по любому из пунктов 1–14 или фармацевтическая

композиция по любому из пунктов 15–36 для применения при лечении или профилактике сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе.

40. Применение производного инсулина по любому из пунктов 1–14 или применение фармацевтической композиции по любому из пунктов 15–36 для получения лекарственного средства, причем предпочтительно лекарственное средство применяют для лечения или профилактики сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе.

41. Применение по пункту 40, где 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 более высокой частотой в течение периода времени по меньшей мере 1 месяц, 6 месяцев или 1 год.

42. Применение по любому из пункта 40 или 41, где лекарственное средство применяют 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 большей частотой в течение периода времени по меньшей мере 1 месяц, 6 месяцев или 1 год.

43. Применение по любому из пунктов 40–42, где лекарственное средство применяют 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 большей частотой в течение периода времени по меньшей мере 1 месяц, 6 месяцев или 1 год.

44. Способ лечения или профилактики сахарного диабета, гипергликемии и/или нарушения толерантности к глюкозе, включающий введение терапевтически эффективного количества производного инсулина по любому из пунктов 1–14 или фармацевтической композиции по любому из пунктов 15–36.

45. Способ повышения способности производного инсулина связываться с рецептором инсулина в присутствии альбумина, включающий:

соединение альбумин-связывающего остатка с природным инсулином или аналогом инсулина с получением производного инсулина посредством линкера Lin, причем линкер Lin представляет собой гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере 10, предпочтительно по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 25, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 36, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–59 или предпочтительно 30–54 атома 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 и 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,

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

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

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;

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

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

общее количество атомов углерода (I')_{n'} составляет 15–100, предпочтительно
20–100, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно
30–59, предпочтительно 30–54.

46. Способ увеличения активности производного инсулина, включающий:

получение производного инсулина путем соединения альбумин-
связывающего остатка с природным инсулином или аналогом инсулина
посредством линкера Lin, причем линкер Lin представляет собой
гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере 10, предпочтительно по
меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 25, предпочтительно по
меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 36, предпочтительно 15–
100, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–
59, предпочтительно 30–54 атома 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 и одной из карбоксильных групп жирной дикислоты удалена гидроксильная группа; или модификация натурального инсулина или аналога инсулина при помощи формулы (A) или формулы (A') для получения производного инсулина, III-(II)_m-(I)_n- (A), где

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

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 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;

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 (I')_n составляет 15–100, предпочтительно 20–100, предпочтительно 25–90, предпочтительно 30–80, предпочтительно 30–59, предпочтительно 30–54.

47. Способ по пункту 45 или 46, где m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и/или

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

48. Способ по пункту 45 или 46, где природный инсулин или аналог инсулина содержит по меньшей мере один остаток лизина, и линкер Lin, формула (A) или формула (A') связаны с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка исходного инсулина.

49. Способ по пункту 45 или 46, где

n равно 5, 6, 7 или 8; и/или

m равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6; предпочтительно, 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.

50. Способ по пункту 45 или 46, где

I представляет собой: $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ или $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; предпочтительно I представляет собой $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; или I' представляет собой $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{10}\text{-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{11}\text{-CH}_2\text{-CO-}$, $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{12}\text{-CH}_2\text{-CO-}$ или $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_8\text{-CH}_2\text{-CO-}$; 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

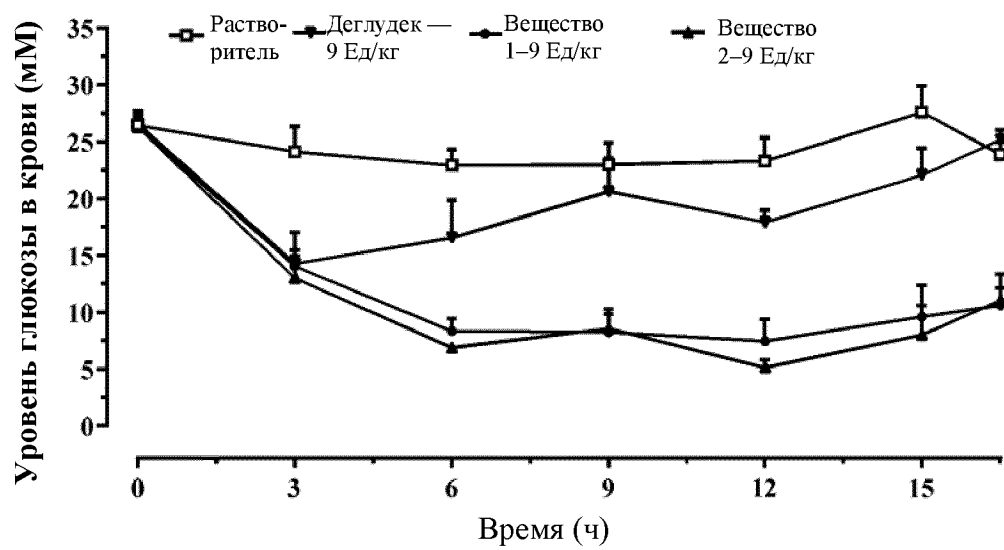
III представляет собой $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{19}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{20}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{21}\text{-CO-}$, $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{22}\text{-CO-}$ или $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{24}\text{-CO-}$; предпочтительно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

51. Способ по пункту 45 или 46, где формула (A) связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка природного инсулина или аналога инсулина посредством C-концевой части I, или формула (A') связана с аминогруппой остатка лизина или N-концевого аминокислотного остатка природного инсулина или аналога инсулина через C-концевую часть I'.

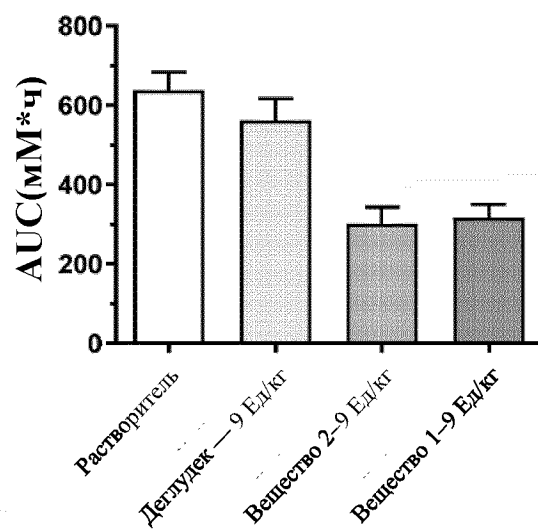
52. Способ по любому из пунктов 45–51, где формула (A) или формула (A') связана с ϵ -аминогруппой остатка лизина исходного инсулина.

53. Способ по любому из пунктов 45–52, где остаток лизина природного инсулина или аналога инсулина находится в положении B29.

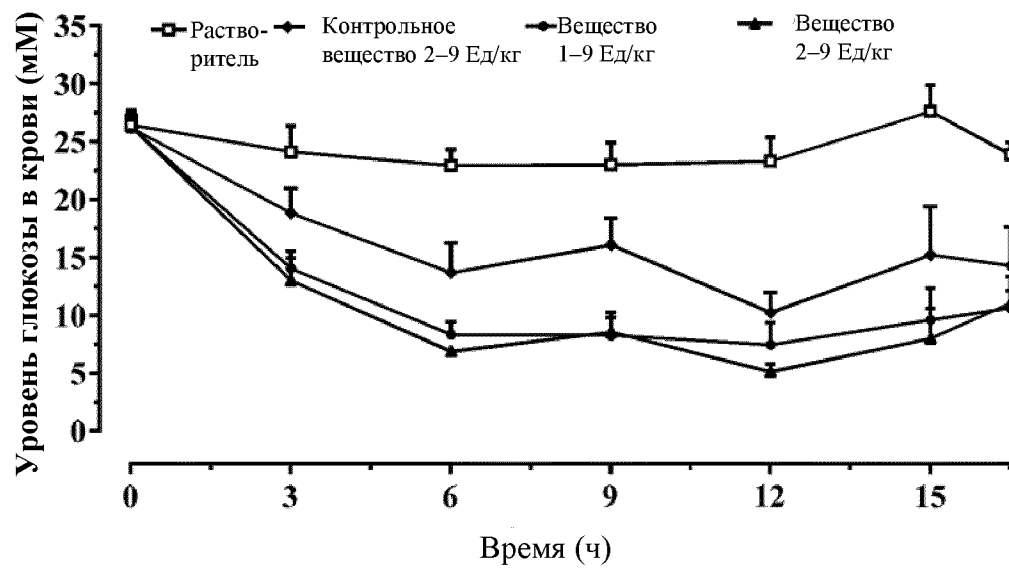
54. Способ по любому из пунктов 45–53, где природный инсулин или аналог инсулина выбран из группы, включающей человеческий инсулин desB30; человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30; человеческий инсулин A14E, B16E, B25H, desB30; человеческий инсулин; человеческий инсулин A21G; человеческий инсулин A21G, desB30; и человеческий инсулин B28D; предпочтительно исходный инсулин представляет собой человеческий инсулин desB30 или человеческий инсулин A14E, B16H, B25H, desB30.



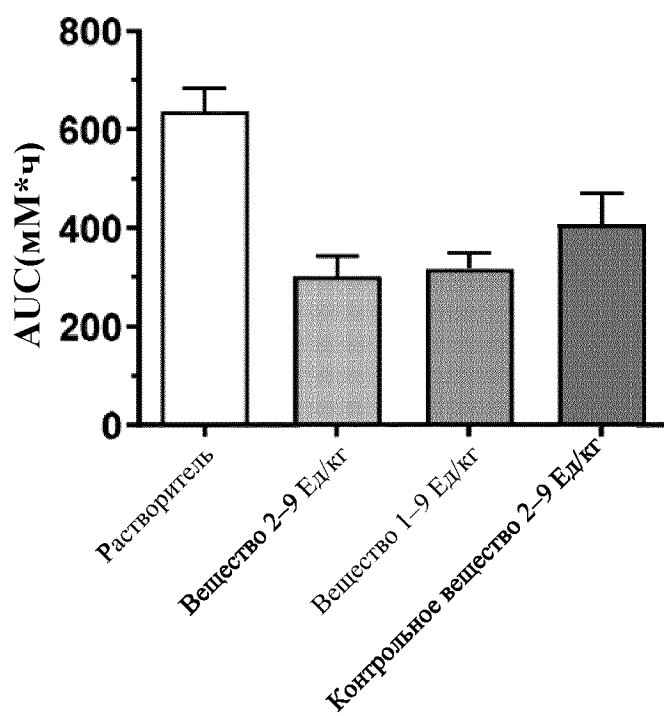
ФИГ. 1a



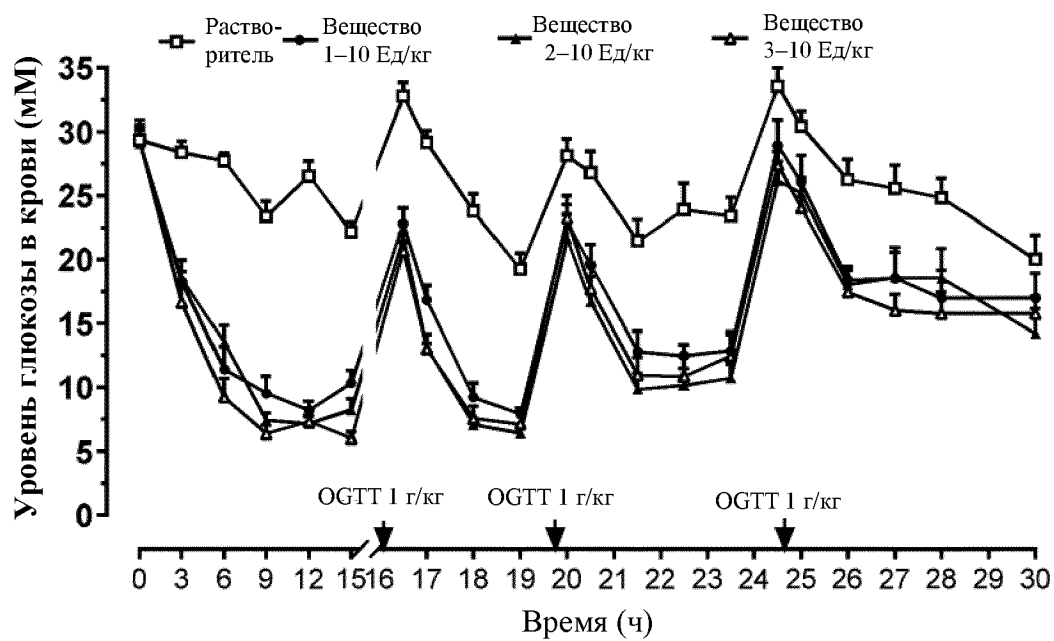
ФИГ. 1b



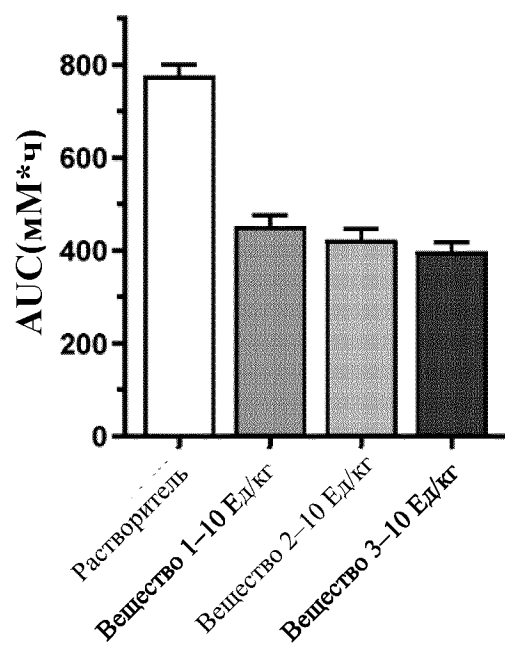
ФИГ. 2а



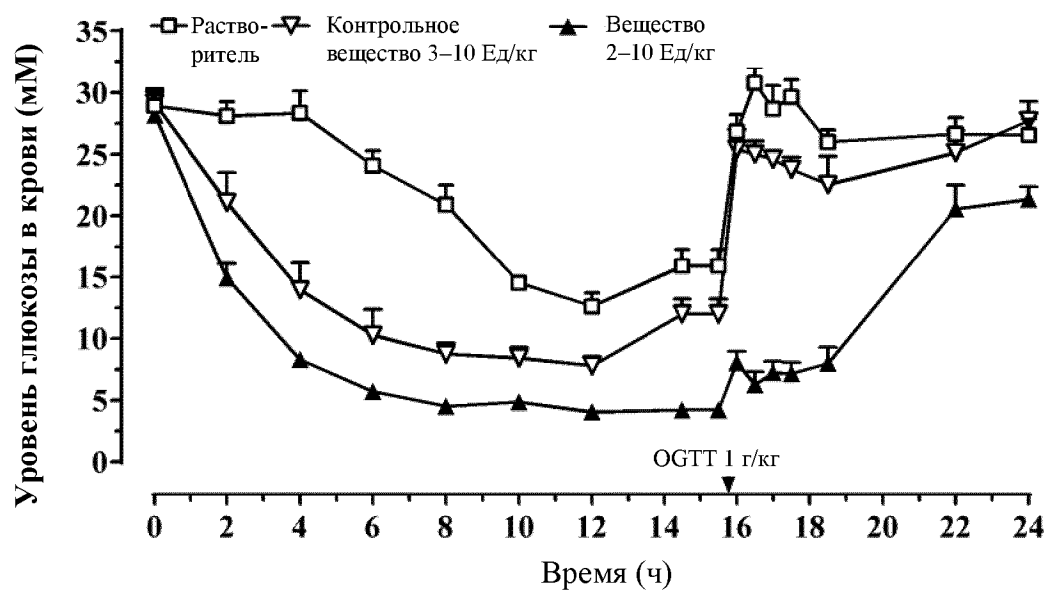
ФИГ. 2б



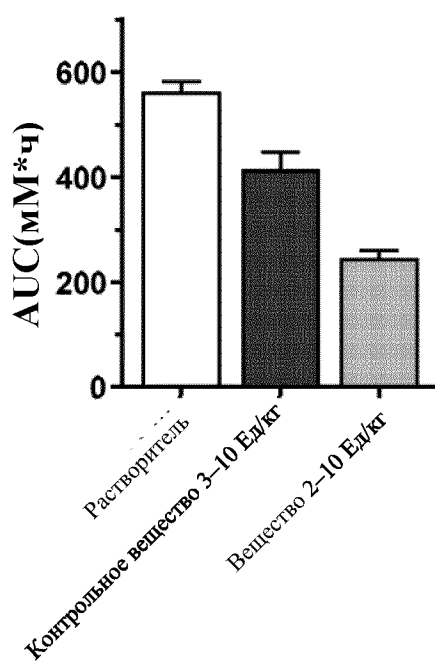
ФИГ. 3а



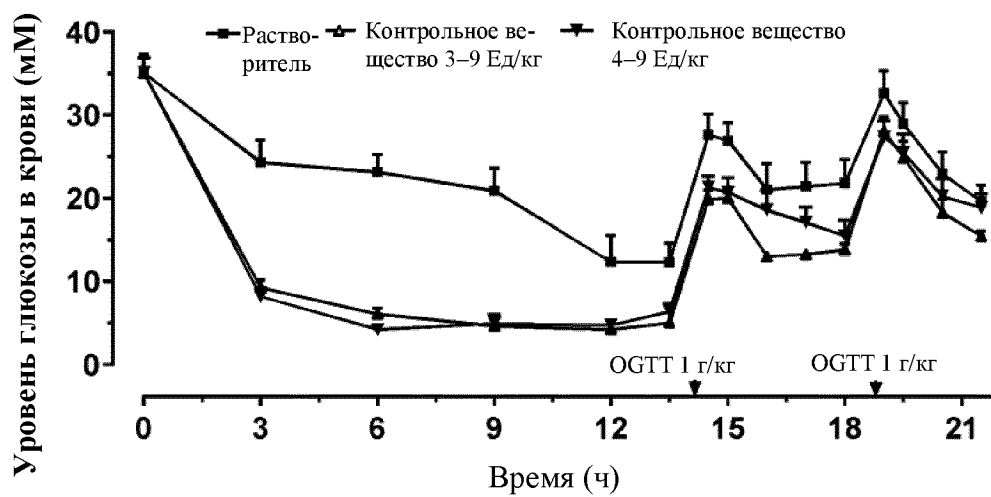
ФИГ. 3б



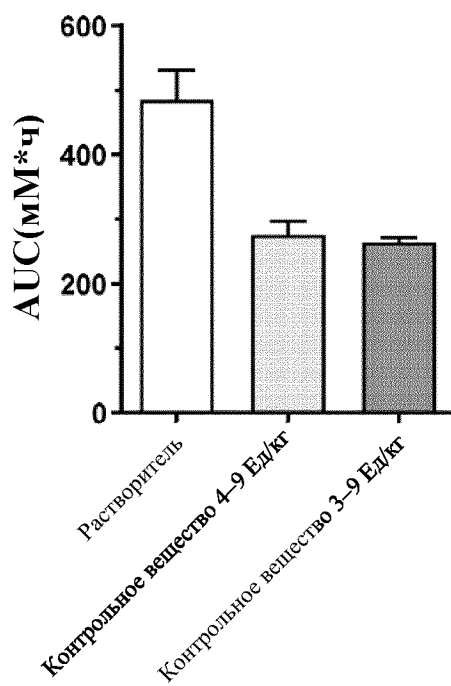
ФИГ. 4а



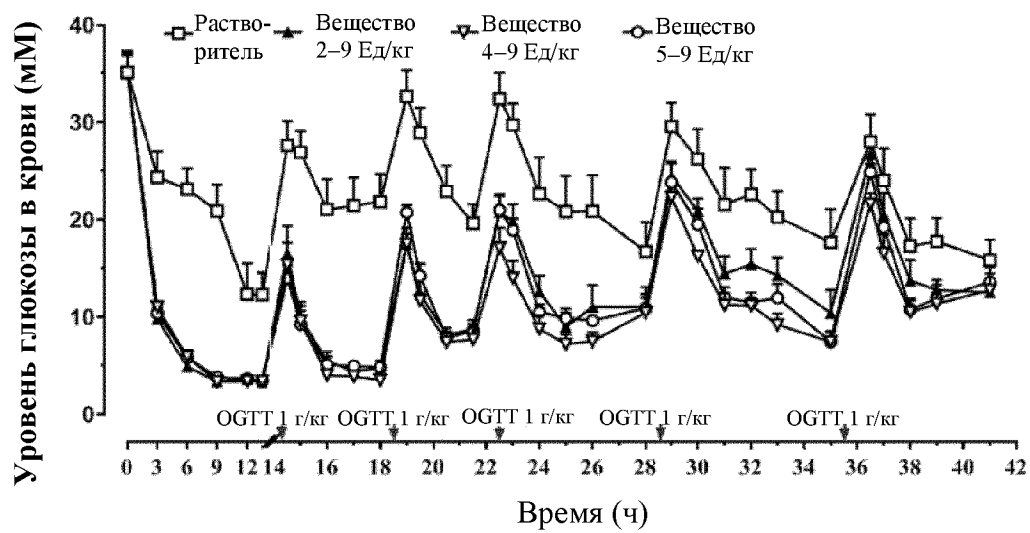
ФИГ. 4б



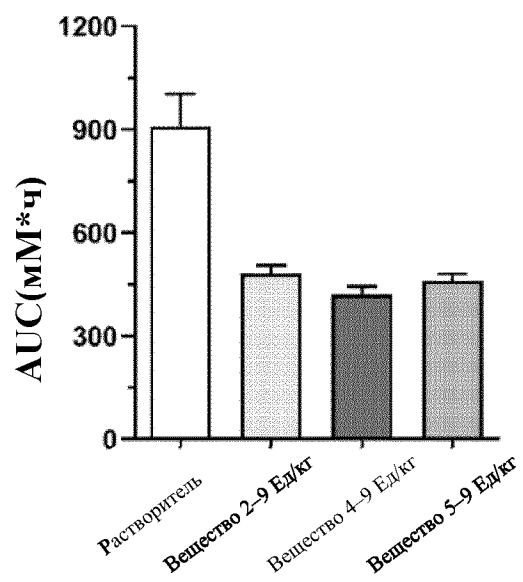
ФИГ. 5а



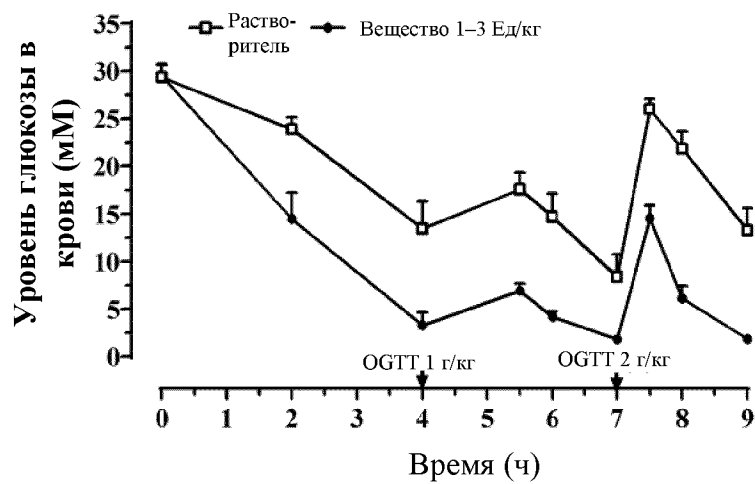
ФИГ. 5b



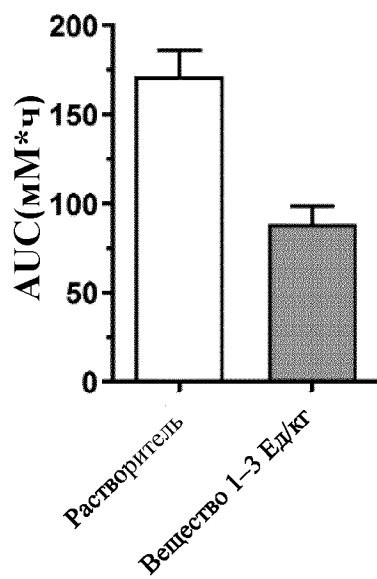
ФИГ. 6а



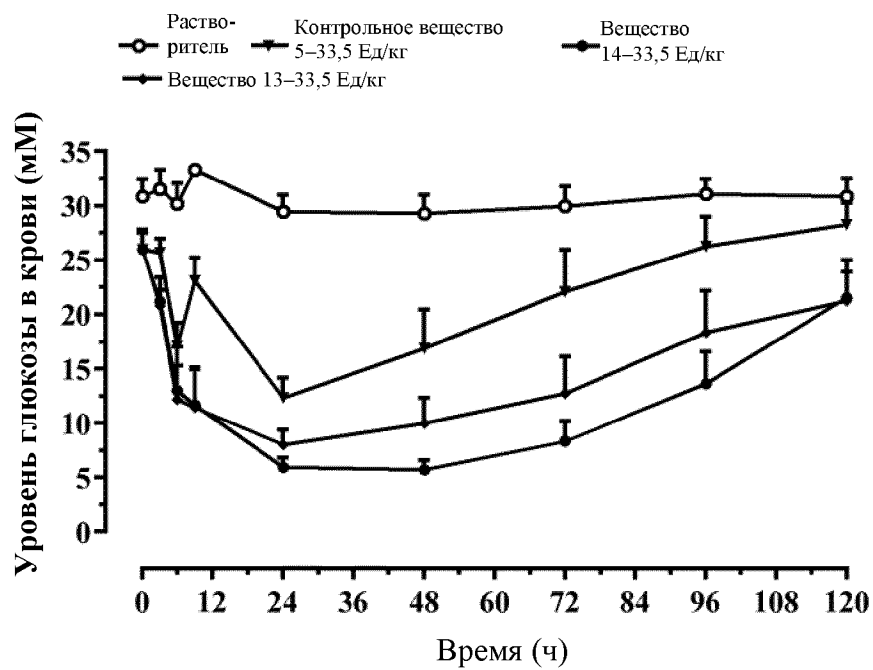
ФИГ. 6б



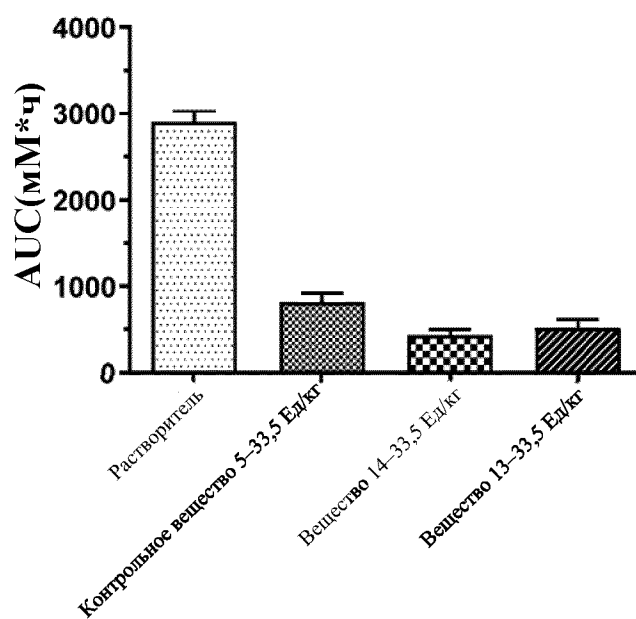
ФИГ. 7а



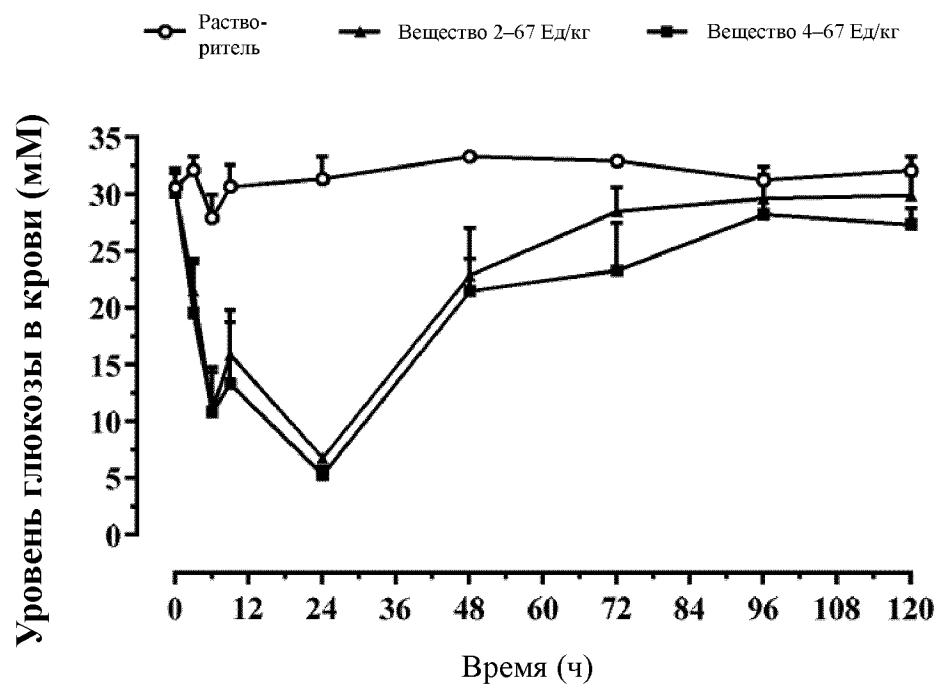
ФИГ. 7б



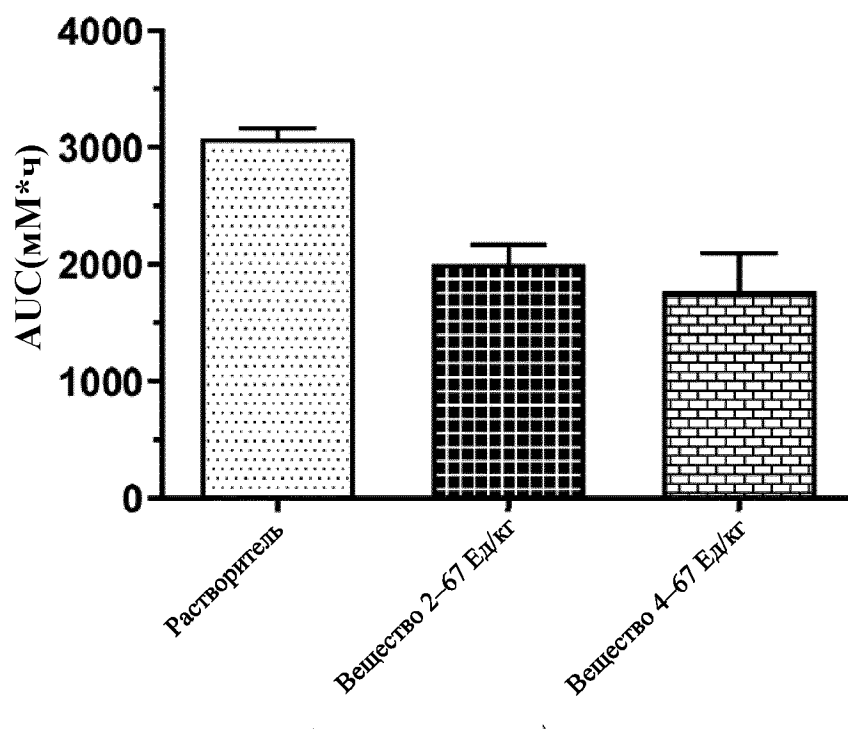
ФИГ. 8a



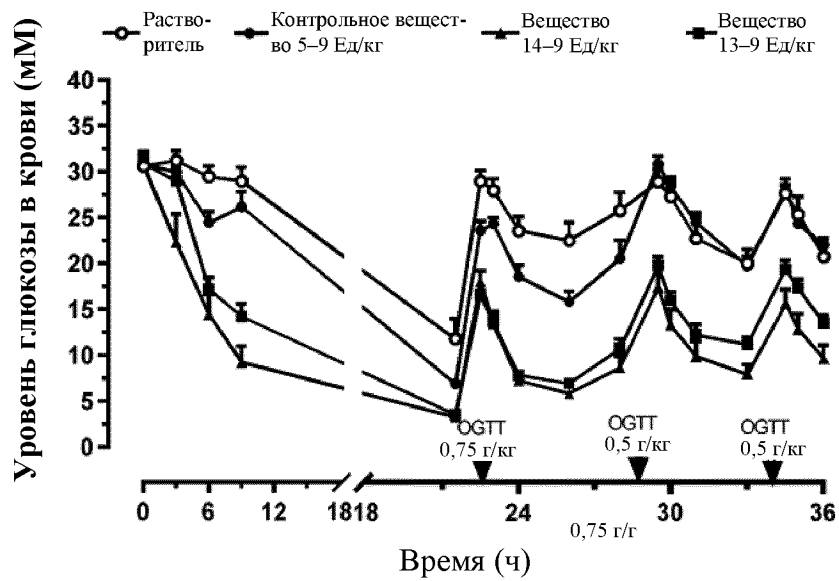
ФИГ. 8b



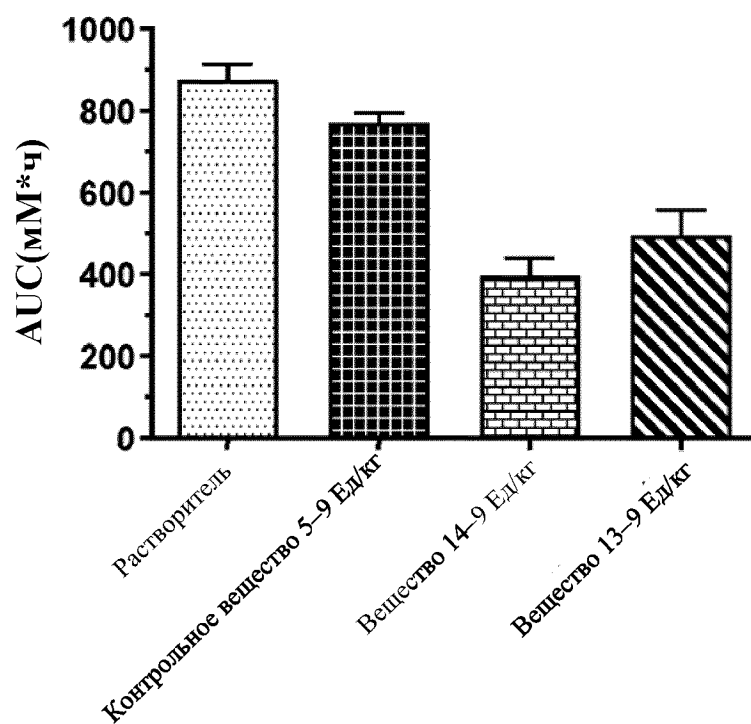
ФИГ. 9а



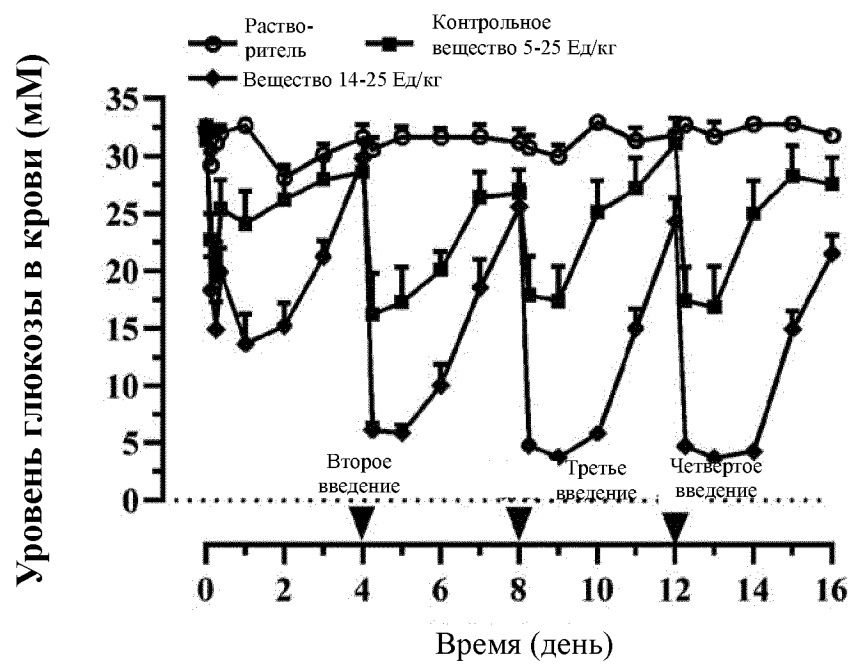
ФИГ. 9б



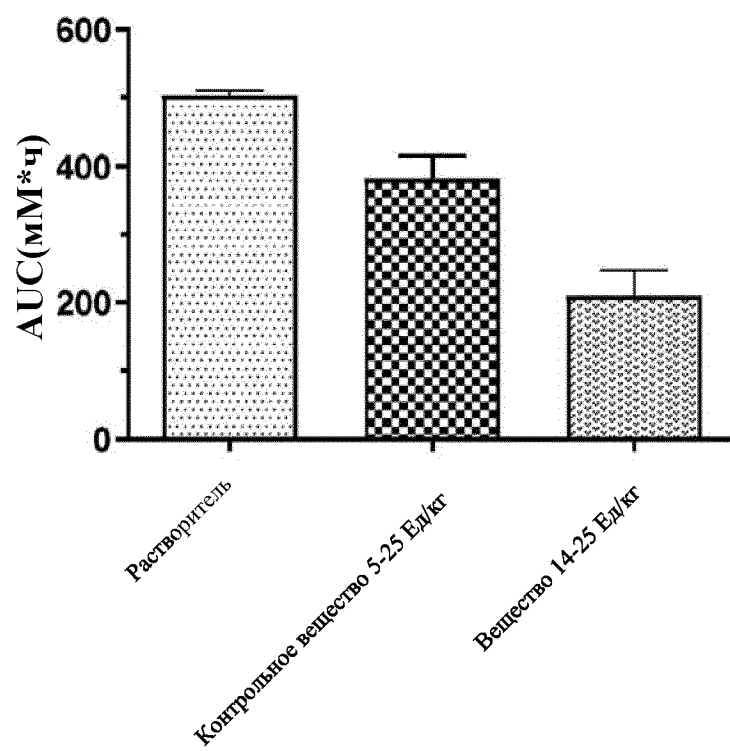
ФИГ. 10а



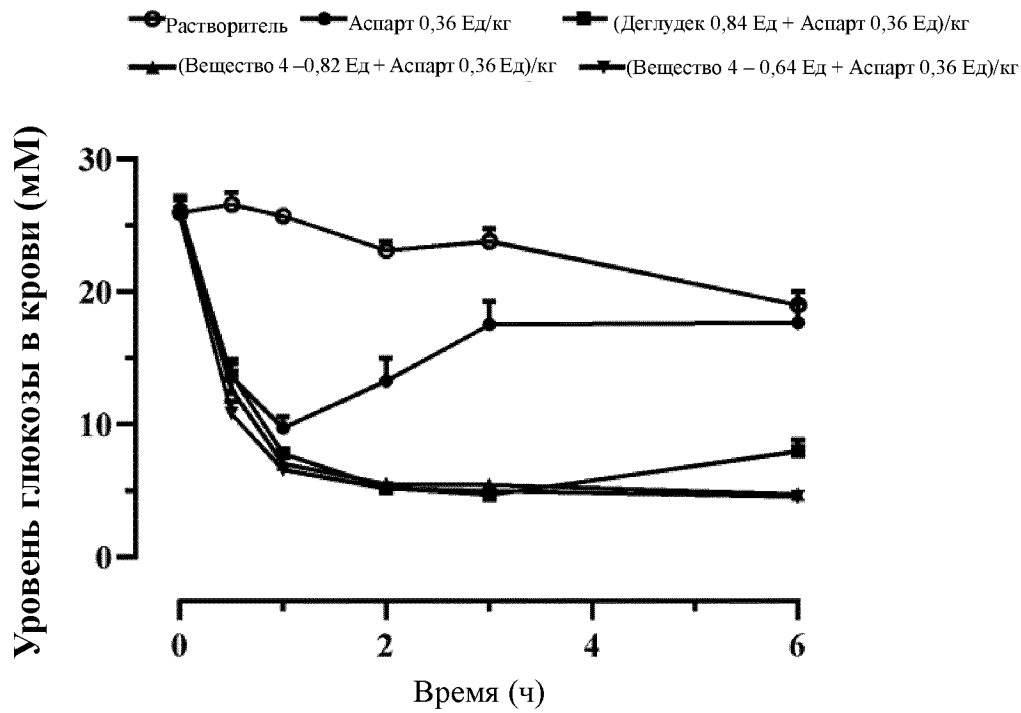
ФИГ. 10б



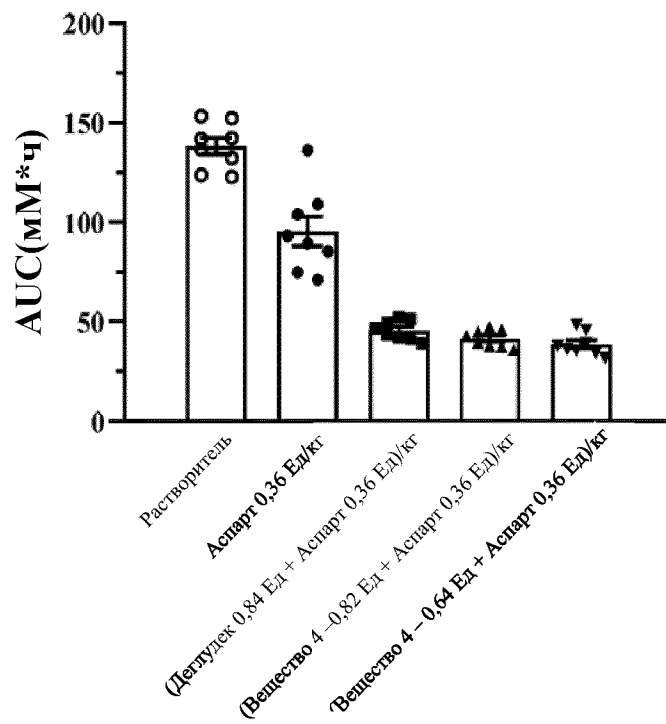
ФИГ. 11a



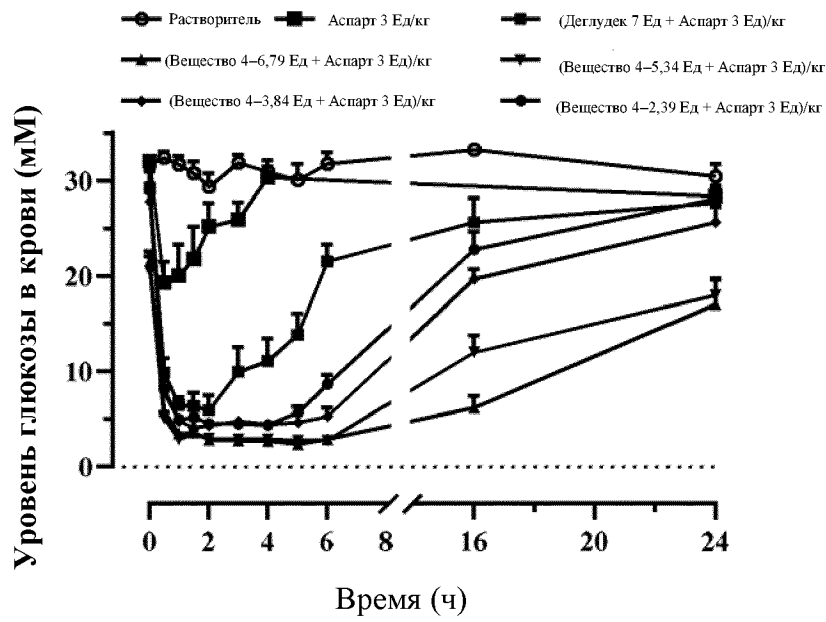
ФИГ. 11b



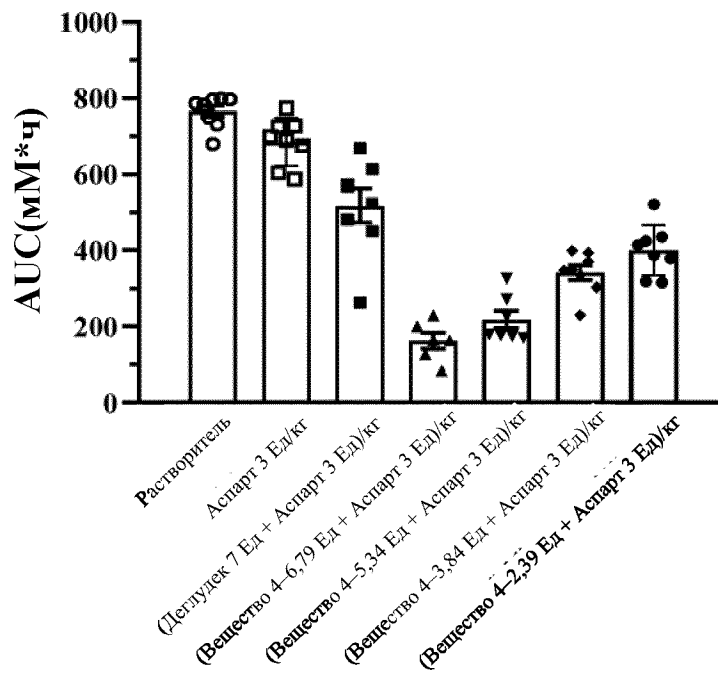
ФИГ. 12а



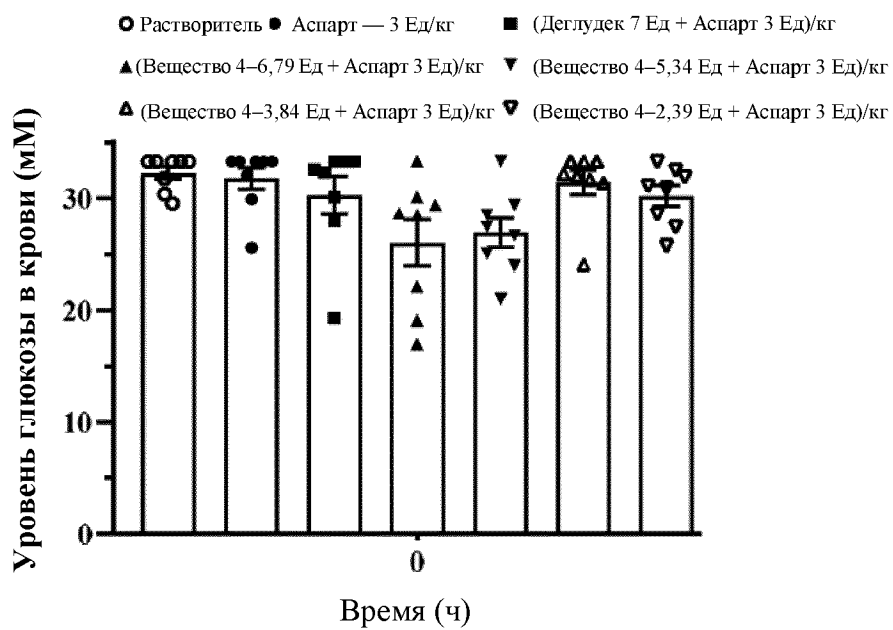
ФИГ. 12b



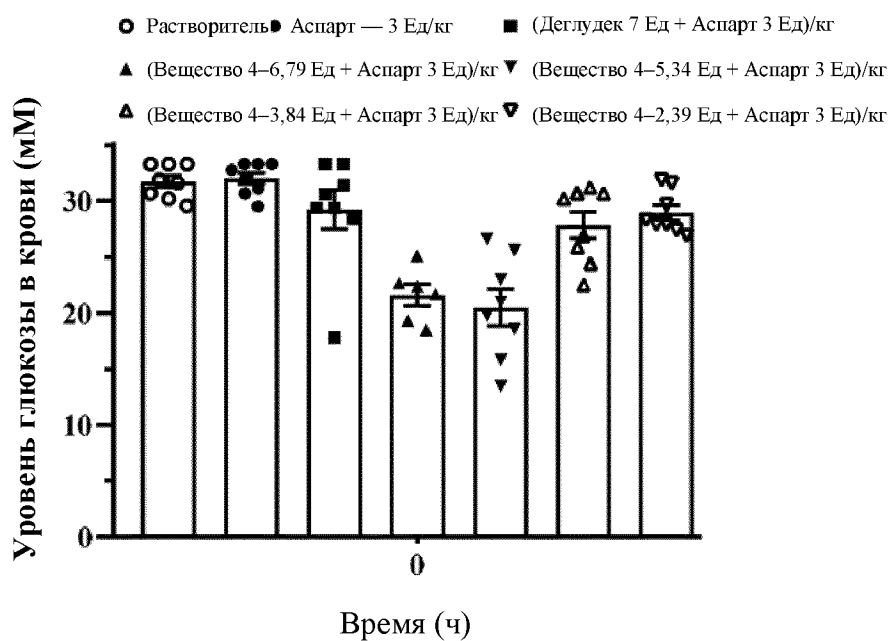
ФИГ. 13а



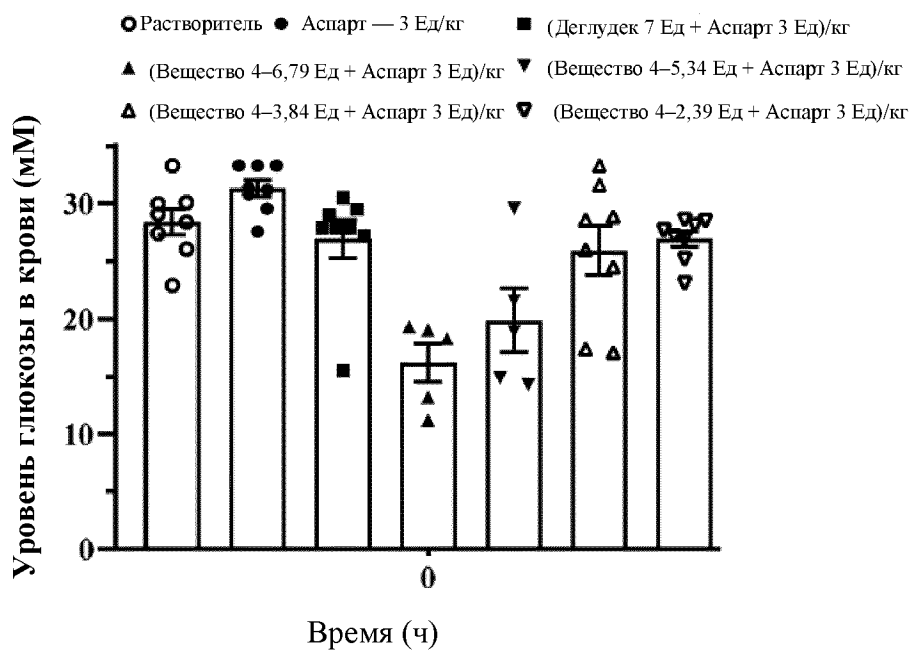
ФИГ. 13b



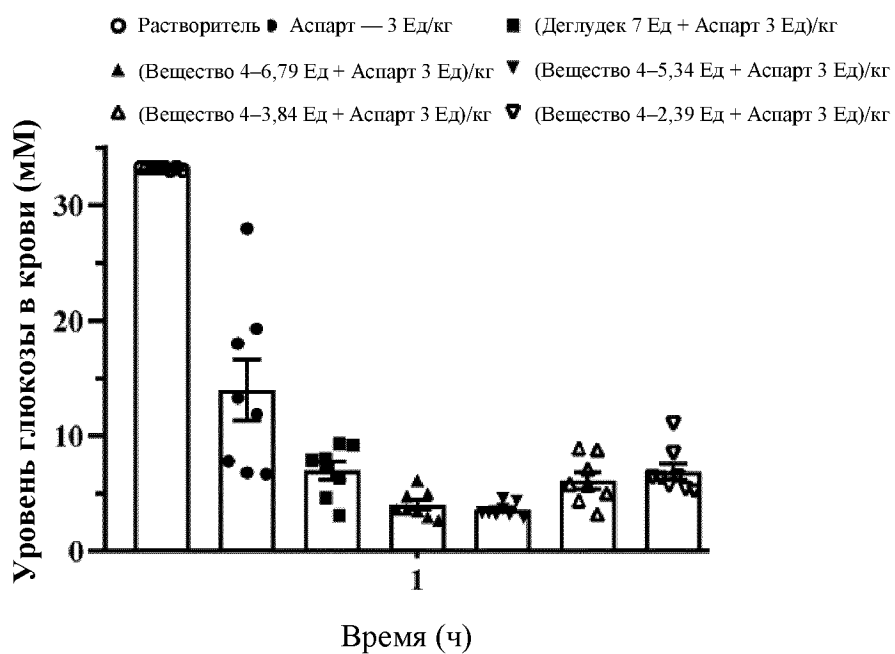
ФИГ. 14а



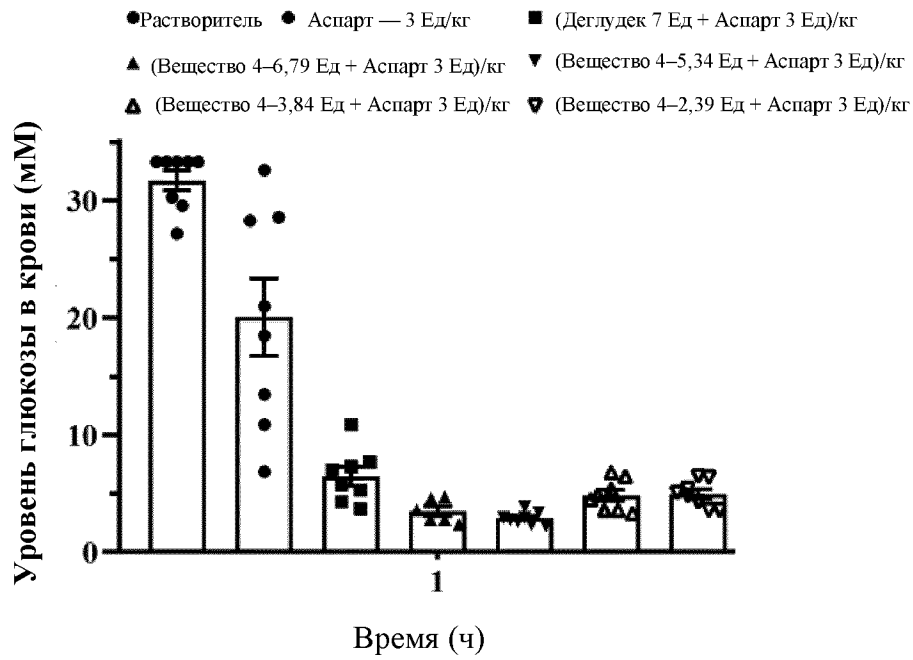
ФИГ. 14b



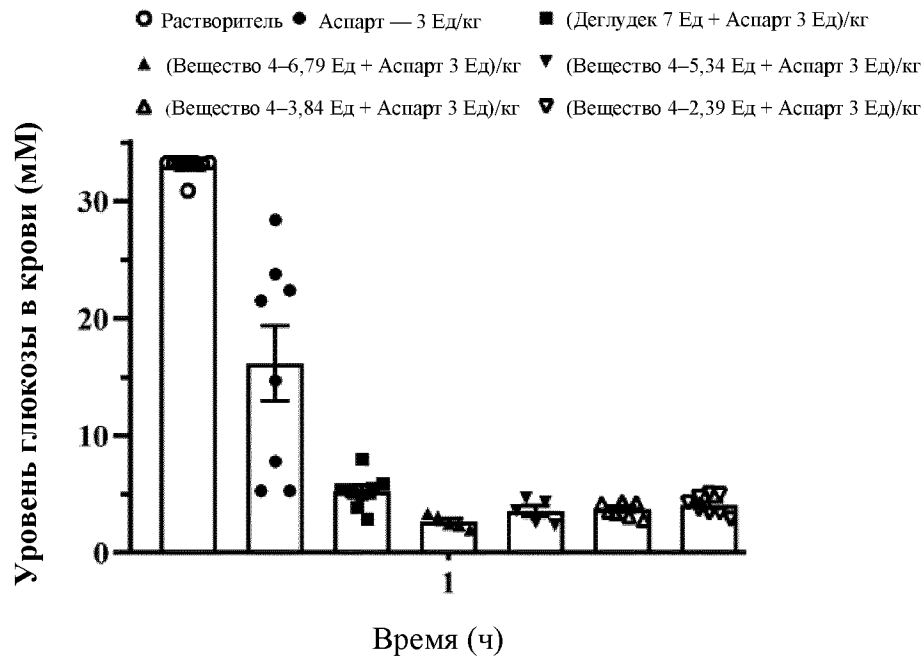
ФИГ. 14с



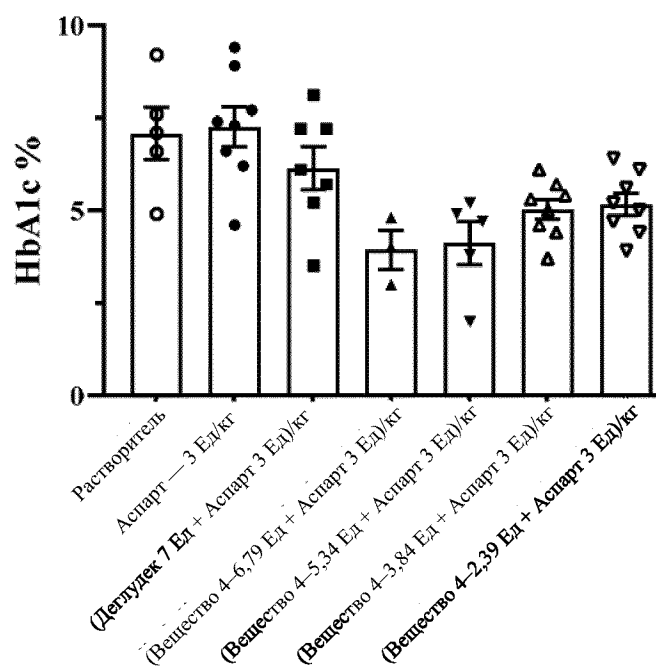
ФИГ. 15а



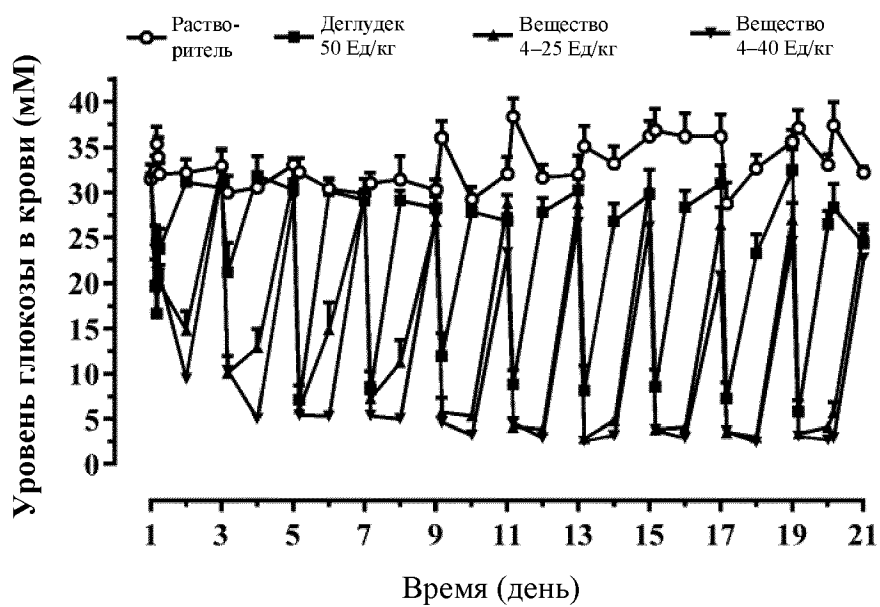
ФИГ. 15b



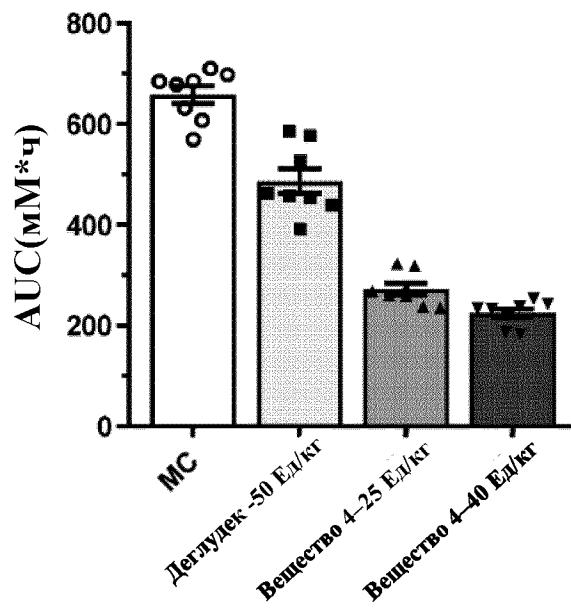
ФИГ. 15с



ФИГ. 16

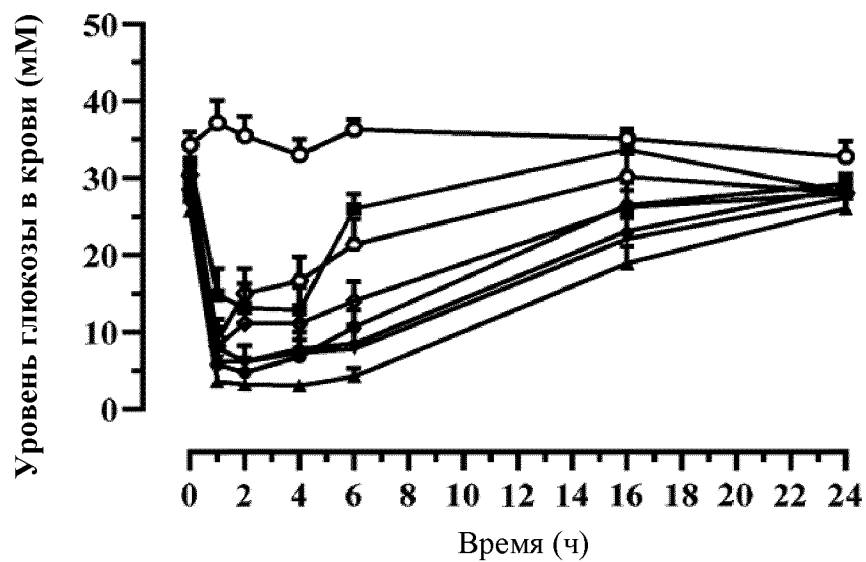


ФИГ. 17а



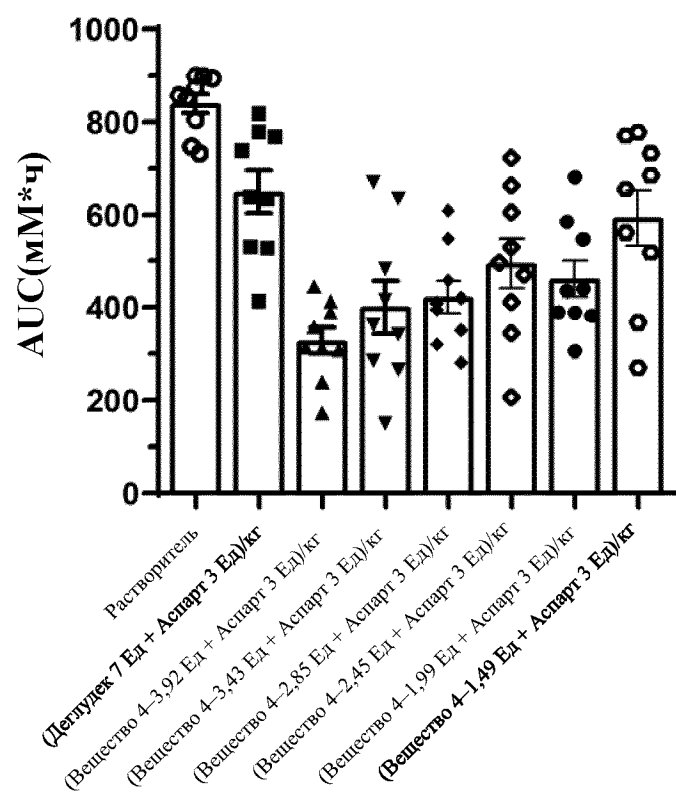
ФИГ. 17b

- Растворитель ■ (Деглудек 7 Ед + Аспарт 3 Ед)/кг
 ▲ (Вещество 4-3,92 Ед + Аспарт 3 Ед)/кг ▼ (Вещество 4-3,43 Ед + Аспарт 3 Ед)/кг
 ◆ (Вещество 4-2,85 Ед + Аспарт 3 Ед)/кг ◆ (Вещество 4-2,45 Ед + Аспарт 3 Ед)/кг
 ● (Вещество 4-1,99 Ед + Аспарт 3 Ед)/кг ○ (Вещество 4-1,49 Ед + Аспарт 3 Ед)/кг

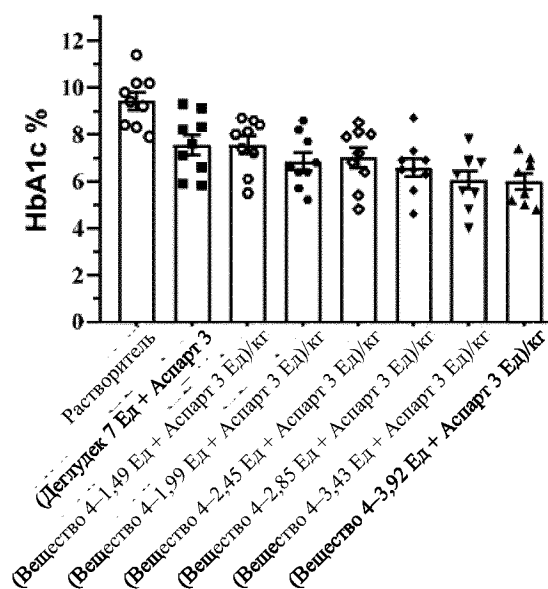


Общее кол-во самцов и самок мышей n = 9

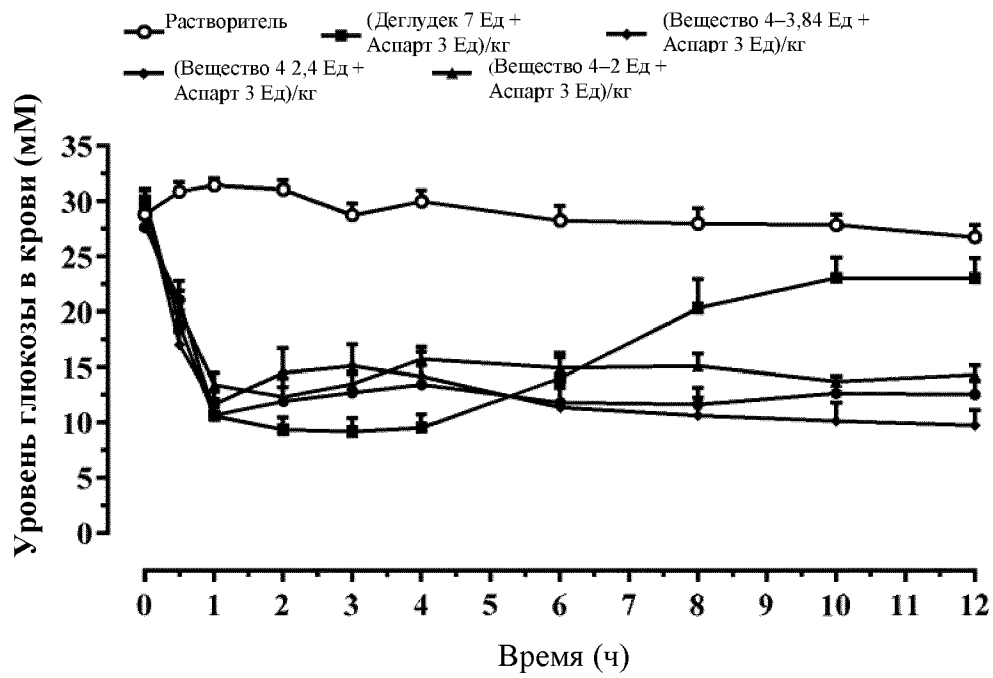
ФИГ. 18a



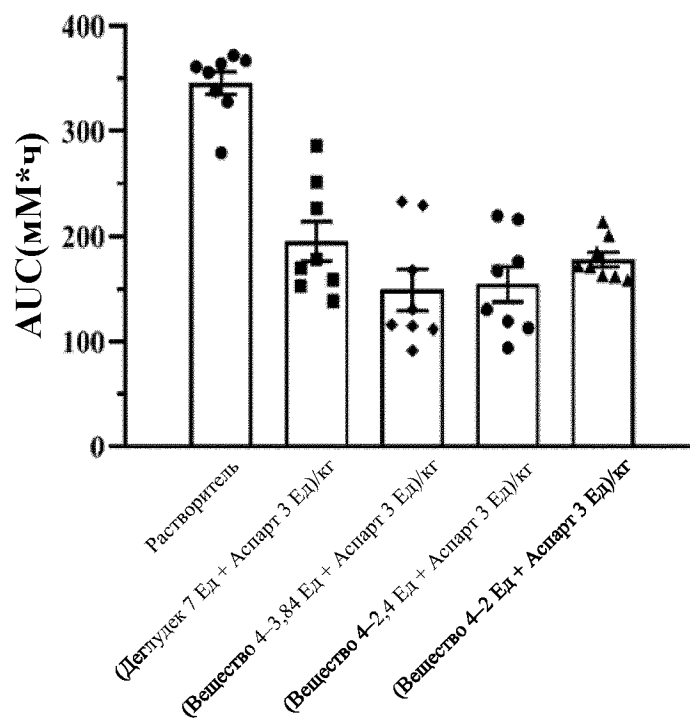
ФИГ. 18b



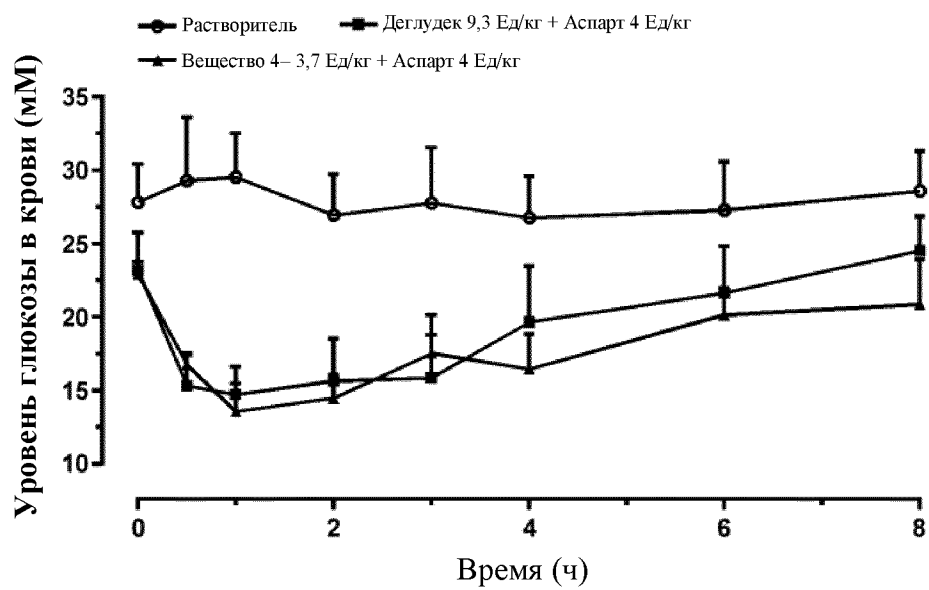
ФИГ. 19



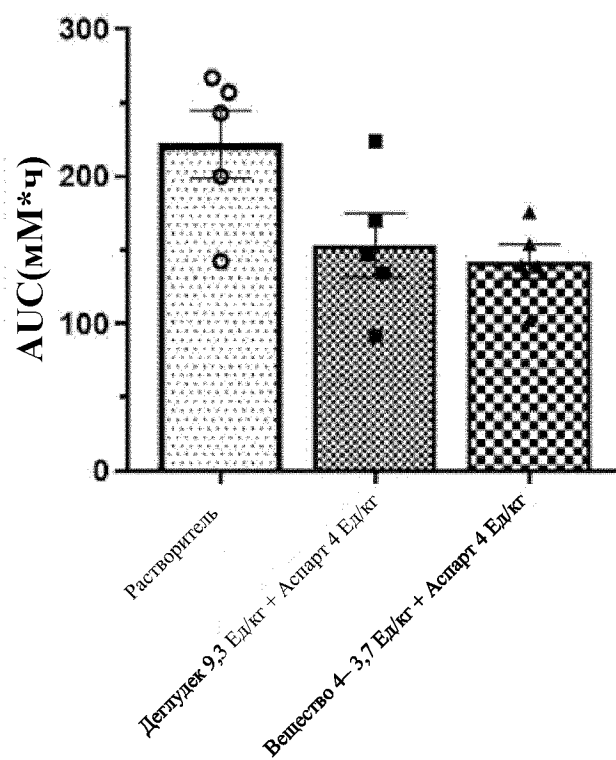
ФИГ. 20а



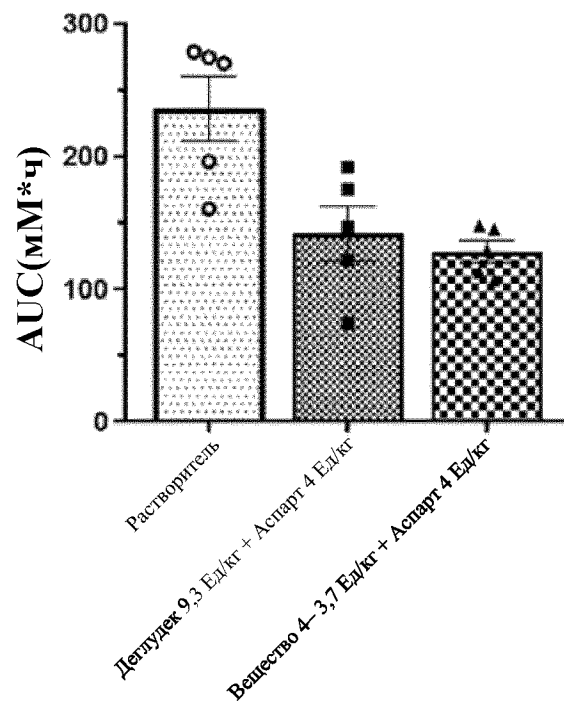
ФИГ. 20б



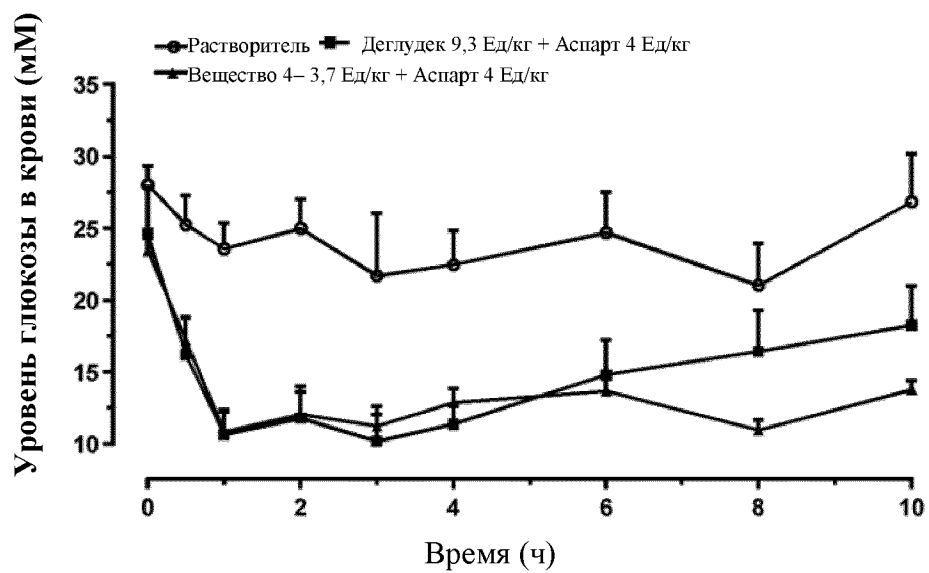
ФИГ. 21(а)



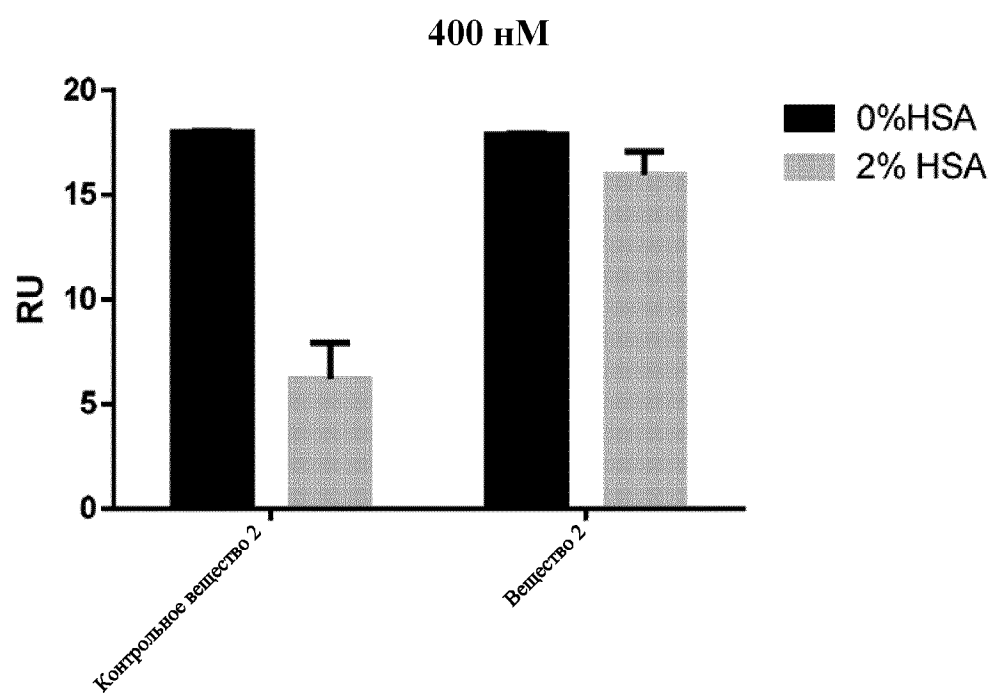
Фиг. 21(б)



Фиг. 21(с)



ФИГ. 21(d)



ФИГ. 22