

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292493** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.20

(22) Дата подачи заявки
2021.03.31

(51) Int. Cl. *A61K 47/54* (2017.01)
C07F 5/02 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТЫ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ВИЦИНАЛЬНЫМ ДИОЛАМ

(31) 63/002,662

(32) 2020.03.31

(33) US

(86) PCT/US2021/025261

(87) WO 2021/202802 2021.10.07

(71) Заявитель:
ПРОТОМЕР ТЕКНОЛОДЖИЗ ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:

Махдави Алборз, Спенсер Райан
Келли, Стил Джек Джозеф, Лян
Цзинсинь, Шейкер Мирна Екрам
Анвар, Чэнь Дяо, Мали Считананд
(US)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Гизатуллин
Ш.Ф., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В., Христофоров А.А.
(RU)

(57) Варианты реализации настоящего изобретения относятся к сенсорам, которые могут селективно связываться с конкретными вицинальными диолами в присутствии других диолов. С помощью этих боронированных сенсорных соединений, чувствительных к вицинальным диолам, можно определять уровни конкретных вицинальных диолов и отвечать на эти молекулы в организме. Согласно определенным вариантам реализации вицинальный диол представляет собой цис-диол, например, гексозу, такую как глюкоза. Согласно определенным вариантам реализации сенсоры конъюгированы с лекарственным веществом, и указанные сенсоры могут изменять биофизические характеристики, фармакокинетику и/или активность указанного лекарственного вещества в ответ на вицинальный диол. Лекарственное вещество может представлять собой или может включать полипептид, такой как инсулин, человеческий эндокринный или инкретиновый пептид, или их аналог, и может содержать одну или более модифицированных аминокислот, содержащих сенсор, чувствительный к вицинальному диолу.

A1

202292493

202292493

A1

КОНЬЮГАТЫ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ВИЦИНАЛЬНЫМ ДИОЛАМ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 63/002662, поданной 31 марта 2020 г. и озаглавленной «ИНСУЛИНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ», полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка подается вместе с Перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла, озаглавленного «203819_ST25.txt», созданного 31 марта 2021 г. и имеющего размер 8851 байтов. Информация в Перечне последовательностей в электронном формате полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Бороновые кислоты обычно считаются кислотами Льюиса, имеющими склонность связываться с гидроксилами, поскольку как кислоты Льюиса бороновые кислоты могут образовывать комплексы с основаниями Льюиса, такими как, например, гидроксид-анионы. Таким образом, молекулы, содержащие боронаты, включая бороновые кислоты, имеют общую склонность связывать гидроксильные группы. Эту склонность к связыванию можно применять для детектирования гидроксилсодержащих групп с помощью боронированных реагентов для мечения, в которых боронатные группы связываются с гидроксилами, и, в зависимости от условий растворителя и буфера, боронаты могут образовывать гидролизуемые боронатно-сложноэфирные связи с гидроксильными группами гидроксилсодержащих молекул. На прочность боронатной сложноэфирной связи и ее обратимость обычно влияет множество факторов, включая тип боронатов, буферные условия и состав молекул, содержащих гидроксильные группы, с которыми они связываются.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Один или более аспектов вариантов реализации настоящего изобретения относятся к боронированным сенсорам (чувствительным агентам), которые могут одновременно обладать целевой селективностью или подходящей аффинностью в отношении конкретного вицинального диола, обладая при этом пониженной аффинностью в отношении других диолов. Согласно определенным вариантам реализации

боронированные сенсоры можно применять для модуляции фармакокинетики и фармакодинамики лекарственного вещества в организме и в ответ на определенные уровни конкретных вицинальных диолов.

Один или более вариантов реализации настоящего изобретения включают следующие варианты реализации 1-15:

1. Соединение, представленное Формулой I:

Z-R

(Формула I),

причем в Формуле I

R выбран из Формул FF1-FF24; и

Z выбран из одного из:

a) NH_2 или OH ,

b) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с лекарственным веществом,

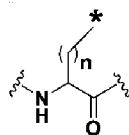
c) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с N-концевым амином или epsilon-аминогруппой одной или более аминокислот в полипептидном лекарственном веществе, и

d) группы, представленной $\text{J-SCH}_2-\emptyset$, $\text{J-S(CH}_2)_2-\emptyset$, $\text{J-NH}-\emptyset$, $\text{J-NH}-$ (необязательный линкер) $-\emptyset$, $\text{J-S(CH}_2)_k\text{NH}-\emptyset$ или $\text{J-триазол(CH}_2)_k\text{NH}-\emptyset$;

где $-\emptyset$ представляет собой ковалентную связь с R;

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14; и

J представляет собой аминокислоту или одну или более аминокислот в полипептидном лекарственном веществе, причем каждая из указанной одной или более аминокислот в указанном полипептидном лекарственном веществе представлена Формулой I':



(Формула I'),

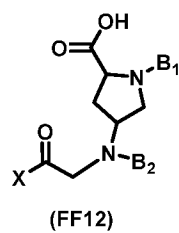
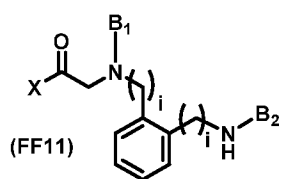
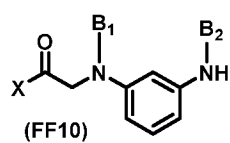
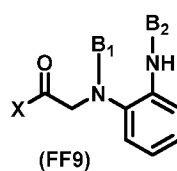
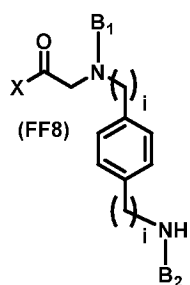
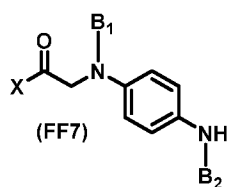
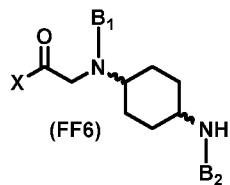
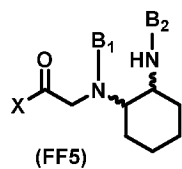
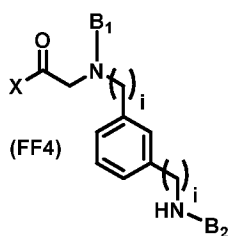
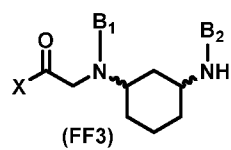
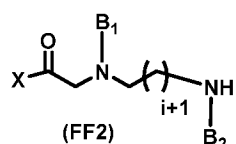
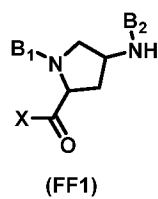
причем в Формуле I'

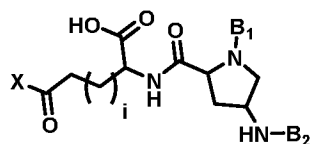
 и  обозначают положения присоединения к остальным частям указанного полипептидного лекарственного вещества;

* обозначает положение присоединения к остальной части Z; и

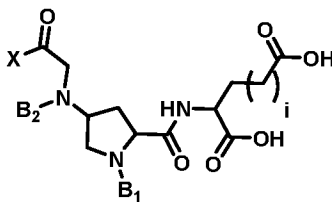
индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8,

причем для Формул FF1-FF24:

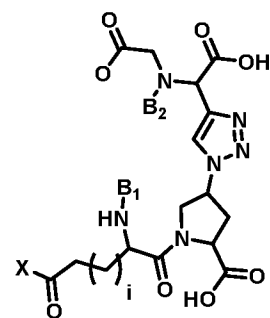




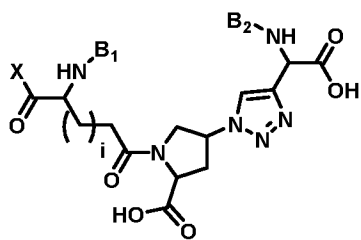
(FF13)



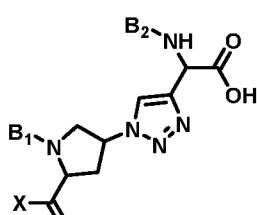
(FF14)



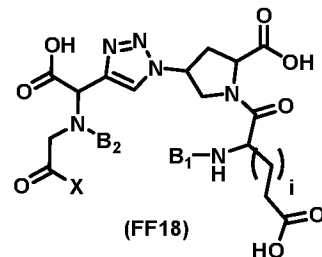
(FF15)



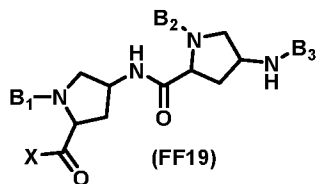
(FF16)



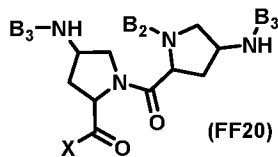
(FF17)



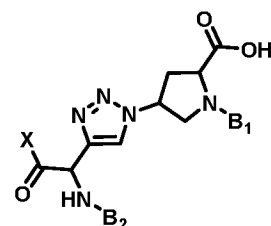
(FF18)



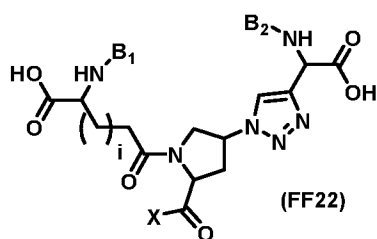
(FF19)



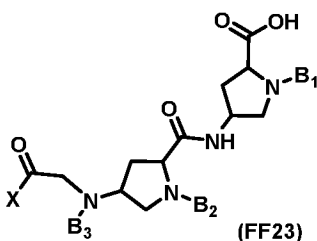
(FF20)



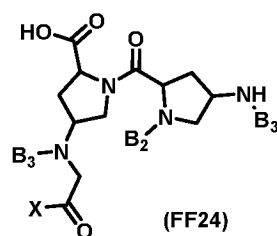
(FF21)



(FF22)



(FF23)



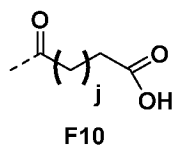
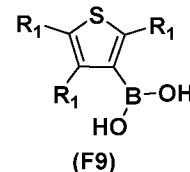
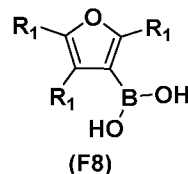
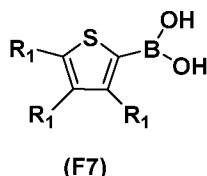
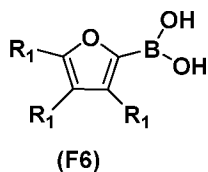
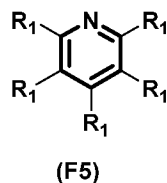
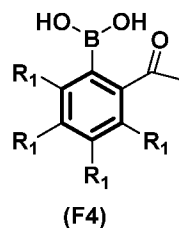
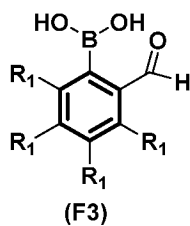
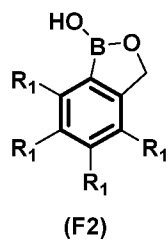
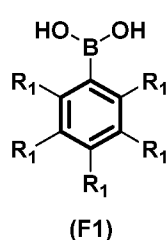
(FF24)

X представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле I;

индекс i представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20;

В₁ и В₂ являются одинаковыми или различными и каждый независимо представляет собой группу, выбранную из Формул F1-F9; и

В₃ представляет собой группу, представленную группой, выбранной из Формул F1-F11,



причем для каждой из Формул F1-F9:

один R₁ представляет собой (C=O)---, S(=O)(=O)---, (CH₂)_m(C=O)--- или (CH₂)_m---, где --- представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле I;

ни один, один или два R₁ каждый независимо представляет собой F, Cl, Br, OH, CH₂-NH₂, NH₂, (C=O)-NH₂, SO₂CH₃, CF₃, NO₂, CH₃, OCH₃, O(CH₂)_mCH₃, —(SO₂)NH CH₃, —(SO₂)NH(CH₂)_mCH₃ или OCF₃,

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14;

один R₁ в F5 представляет собой B(OH)₂, и

все остальные R₁ представляют собой H, и

в Формуле F10 индекс j представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 13.

2. Соединение, представленное Формулой II:

Z-R

(Формула II),

причем в Формуле II либо:

(i) R выбран из Формул FF25-FF31;

B₁ и B₂ в FF25-FF31 являются одинаковыми или различными и каждый независимо выбран из Формул F12-F19; и

Z представляет собой NH₂ и не конъюгирован с каким-либо лекарственным веществом;

либо

(ii) R выбран из Формул FF25-FF31;

B₁ и B₂ каждый независимо выбран из Формул F20-F27; и

Z выбран из одного из:

- a) ОН,
- b) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с лекарственным веществом,
- c) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с N-концевым амином или эpsilon-аминогруппой одной или более аминокислот в полипептидном лекарственном веществе, и
- d) группы, представленной $J-SCH_2-\emptyset$, $J-S(CH_2)_2-\emptyset$, $J-NH-\emptyset$, $J-NH-(\text{необязательный линкер})-\emptyset$, $J-S(CH_2)_kNH-\emptyset$ или $J-\text{триазол}(CH_2)_kNH-\emptyset$,
 где $-\emptyset$ представляет собой ковалентную связь с R,
 индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14; и
 J представляет собой аминокислоту или одну или более аминокислот в полипептидном лекарственном веществе, причем каждая из указанной одной или более аминокислот в указанном полипептидном лекарственном веществе представлена Формулой II';

либо

(iii) R выбран из Формул FF32-FF33,

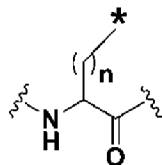
B_1 и B_2 в FF32 каждый независимо выбран из Формул F28-F35;

B_1 и B_2 в FF33 каждый независимо выбран из Формул F36-F43; и

Z выбран из одного из:

- a) лекарственного вещества,
- b) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с N-концевым амином или эpsilon-аминогруппой аминокислоты в полипептидном лекарственном веществе, и
- c) группы, представленной $J-SCH_2-\emptyset$, $J-S(CH_2)_2-\emptyset$, $J-NH-\emptyset$, $J-NH-(\text{необязательный линкер})-\emptyset$, $J-S(CH_2)_kNH-\emptyset$ или $J-\text{триазол}(CH_2)_kNH-\emptyset$,
 где $-\emptyset$ представляет собой ковалентную связь с R,
 индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14; и
 J представляет собой аминокислоту или одну или более аминокислот в полипептидном лекарственном веществе, причем каждая из указанной одной или более аминокислот в указанном полипептидном лекарственном веществе представлена Формулой II';

причем для Формулы II':



(Формула II'),

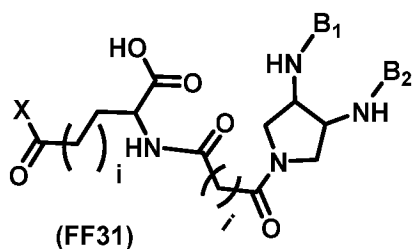
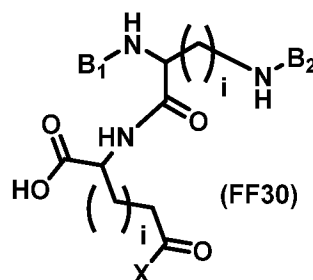
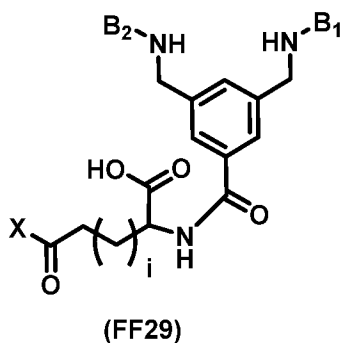
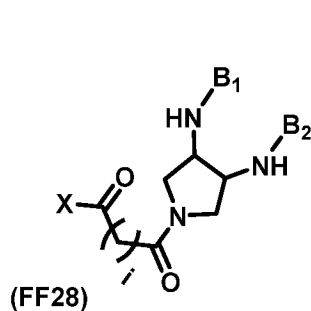
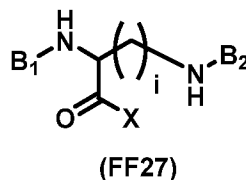
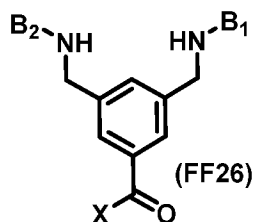
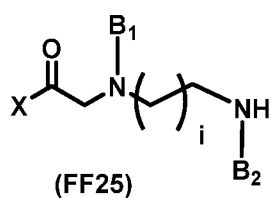
и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного

5 полипептидного лекарственного вещества;

* обозначает положение присоединения к остальной части Z; и

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

причем для Формул FF25-FF33:



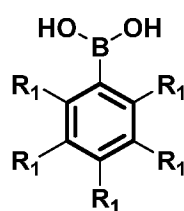
X-B₁B₂
(FF32)

B₁-B₂
(FF33)

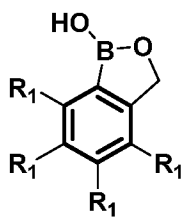
10 X представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле II; и

индекс i представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20;

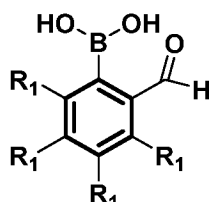
причем для каждой из Формул F12-F19:



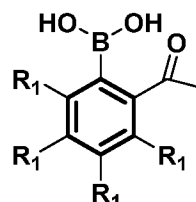
(F12)



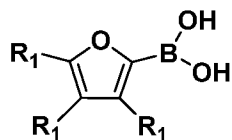
(F13)



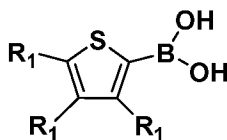
(F14)



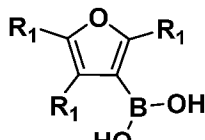
(F15)



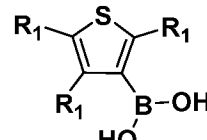
(F16)



(F17)



(F18)



(F19)

один R_1 из любого B_1 или B_2 представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с лекарственным веществом;

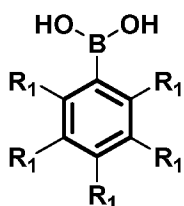
5 один R_1 в каждом из B_1 и B_2 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где $---$ представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле II;

ни один, один или два R_1 в каждом из B_1 и B_2 независимо представляют собой $COOH$, F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CF_3 , NO_2 , CH_3 , OCH_3 ,
10 $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$, $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$ или OCF_3 ;

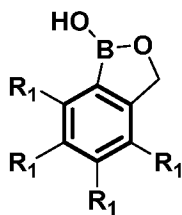
индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14; и

все остальные R_1 представляют собой H ;

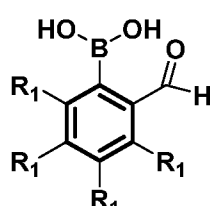
причем для каждой из Формул F20-F25:



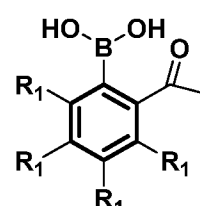
(F20)



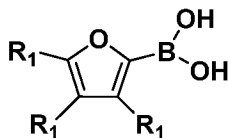
(F21)



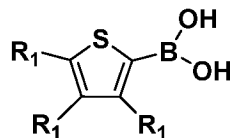
(F22)



(F23)



(F24)



(F25)

15 один R_1 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где $---$ представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле II;
либо:

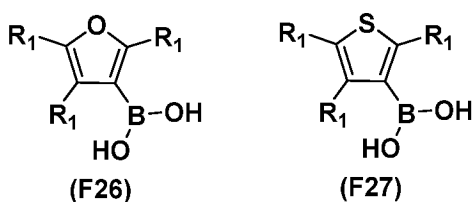
(a) один или два R_1 на одном и том же B_1 и/или B_2 представляют собой $COOH$, причем по меньшей мере один $COOH$ не конъюгирован с лекарственным веществом, и/или

(b) один или два R_1 каждый независимо представляет собой NO_2 , CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$, $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$, где индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14, и

ни один, один или два R_1 каждый независимо представляет собой NO_2 , F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CH_3 , CF_3 или OCF_3 , и

все остальные R_1 представляют собой H ;

10 причем для каждой из Формул F26-F27:



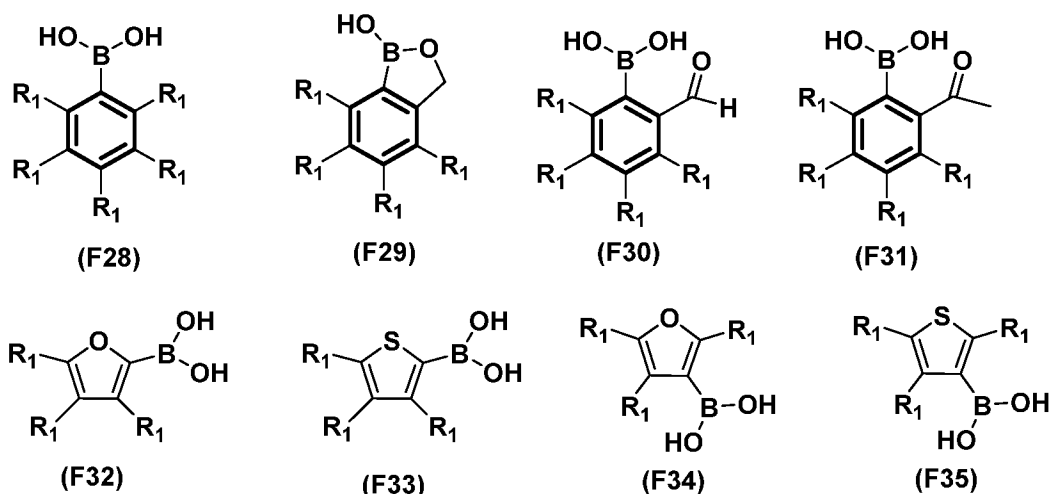
один R_1 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где $---$ представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле II;

ни один, один или два R_1 каждый независимо представляет собой $COOH$, F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CF_3 , NO_2 , CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$, $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$ или OCF_3 ;

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14; и

все остальные R_1 представляют собой H ;

причем для каждой из Формул F28-F35:



один R_1 в B_1 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где $---$ представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле II;

один R_1 для каждого из B_1 и B_2 представляет собой ковалентную связь между B_1 и B_2 , причем указанная ковалентная связь выбрана из $-(S=O)-$, $-(S(=O)(=O))-$, $-(CF_2)-$, $-(C=O)-$, $-(CH_2)_mSCH_2CO(CH_2)_k-$, $-(CH_2)_mS(CH_2)_2CO(CH_2)_k-$ и $-(CH_2)_m(CO)NH(CH_2)_k-$;

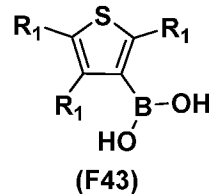
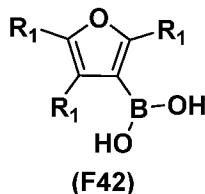
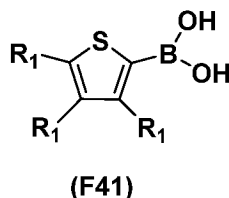
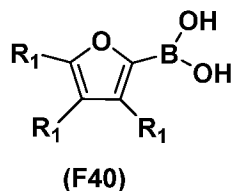
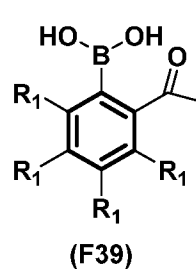
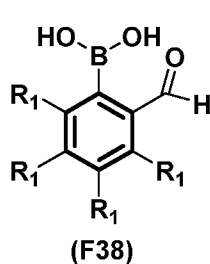
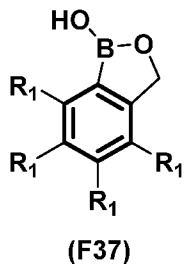
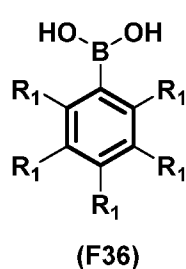
5 либо (i) две группы R_1 в B_2 представляют собой $COOH$, и эти две группы R_1 не конъюгированы с лекарственным веществом, либо (ii) один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой NO_2 , $CH=O$, CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$ или $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$;

ни один, один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой $CH=O$, F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CH_3 , CF_3 , CHF_2 или OCF_3 ;
10 остальные R_1 представляют собой H ;

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7; и

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7;

причем для каждой из Формул F36-F43:



15 один R_1 для каждого из B_1 и B_2 представляет собой ковалентную связь с сульфоксиминной группой так, что B_1 и B_2 соединены друг с другом сульфоксиминной группой, и при этом аминогруппа указанного сульфоксимины ковалентно связана, либо непосредственно посредством линкера, содержащего кислоту, либо посредством
20 необязательного линкера, с Z в Формуле II;

либо (i) две группы R_1 в B_1 и/или B_2 представляют собой $COOH$, и эти две группы R_1 не конъюгированы с лекарственным веществом, либо (ii) один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой NO_2 , $CH=O$, CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$ или $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$;

25 ни один, один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой $CH=O$, F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CH_3 , CF_3 , CHF_2 или OCF_3 ;
остальные R_1 представляют собой H ;

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7; и

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7.

3. Соединение, включающее лекарственное вещество, характеризующееся тем, что указанное лекарственное вещество включает инсулин, и указанный инсулин содержит

5 одну или более модифицированных аминокислот, представленных Формулой III:

Z-R

(Формула III),

причем в Формуле III

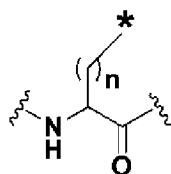
R выбран из Формул FF1-FF24; и

10 Z выбран из необязательного линкера, J-SCH₂—ø, J-S(CH₂)₂—ø, J—NH—ø, J—NH(CO) линкер—ø, J—S(CH₂)_kNH—ø и J—триазол(CH₂)_kNH—ø,

где —ø представляет собой ковалентную связь с R,

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14; и

J описан Формулой III':



15

(Формула III'),

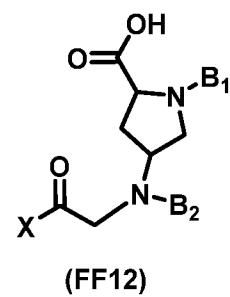
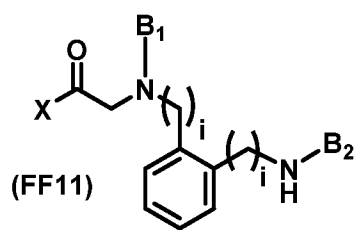
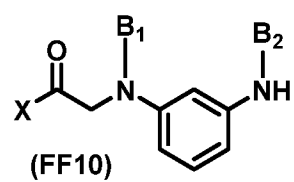
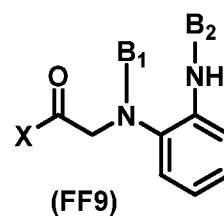
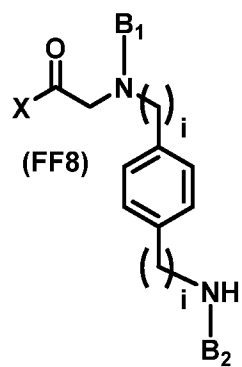
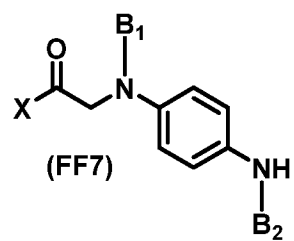
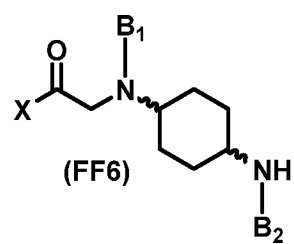
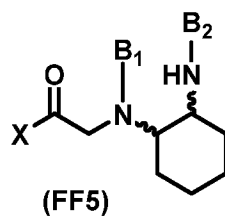
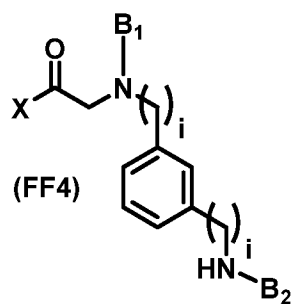
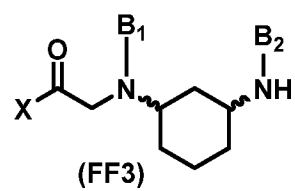
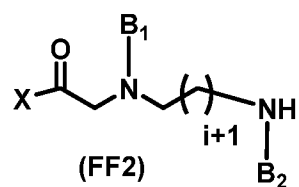
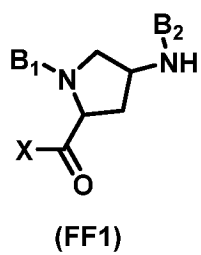
причем в Формуле III':

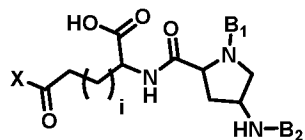
и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного инсулина;

20 * обозначает положение присоединения к остальной части Z; и

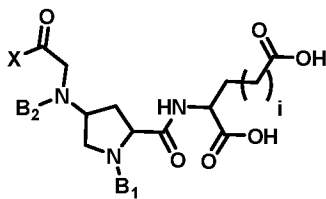
индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

причем для Формул FF1-FF24:

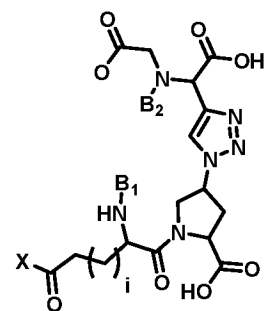




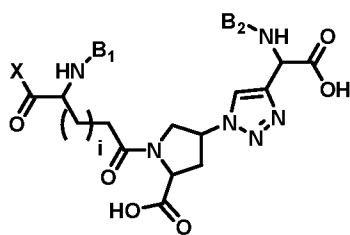
(FF13)



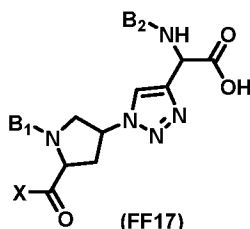
(FF14)



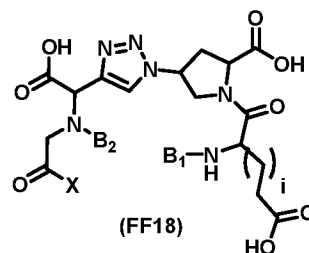
(FF15)



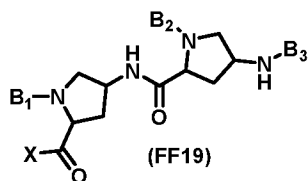
(FF16)



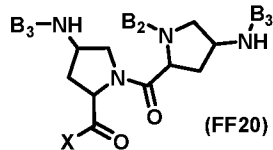
(FF17)



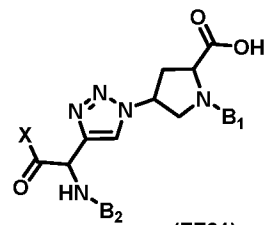
(FF18)



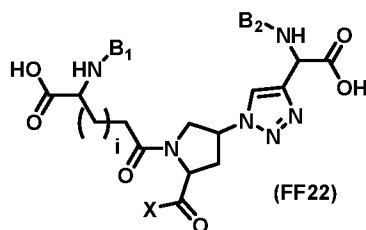
(FF19)



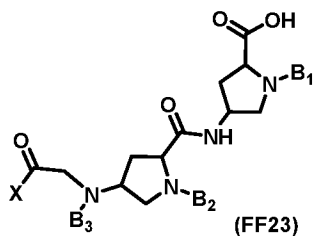
(FF20)



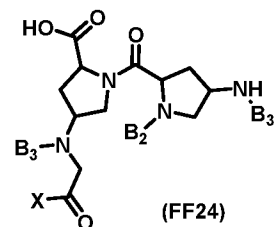
(FF21)



(FF22)



(FF23)



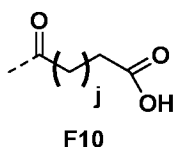
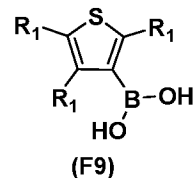
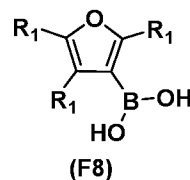
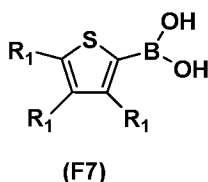
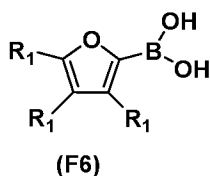
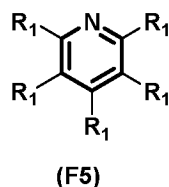
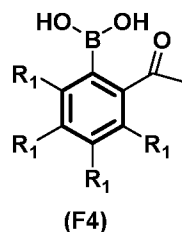
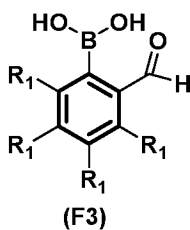
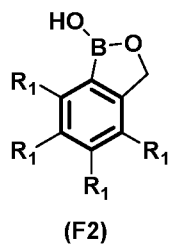
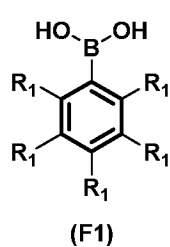
(FF24)

X представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле III;

индекс i представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20;

В₁ и В₂ являются одинаковыми или различными и каждый независимо представляет собой группу, выбранную из Формул F1-F9; и

В₃ представляет собой группу, выбранную из Формул F1-F11;



причем для каждой из Формул F1-F9:

один R₁ представляет собой (C=O)---, S(=O)(=O)---, (CH₂)_m(C=O)--- или (CH₂)_m---, где --- представляет собой ковалентную связь с остальной частью R;

ни один, один или два R₁ каждый независимо представляет собой F, Cl, Br, OH, CH₂-NH₂, NH₂, (C=O)-NH₂, SO₂CH₃, CF₃, NO₂, CH₃, OCH₃, O(CH₂)_mCH₃, —(SO₂)NH CH₃, —(SO₂)NH(CH₂)_mCH₃ или OCF₃;

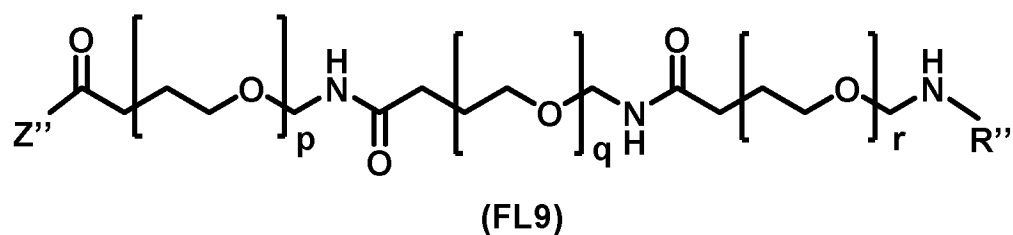
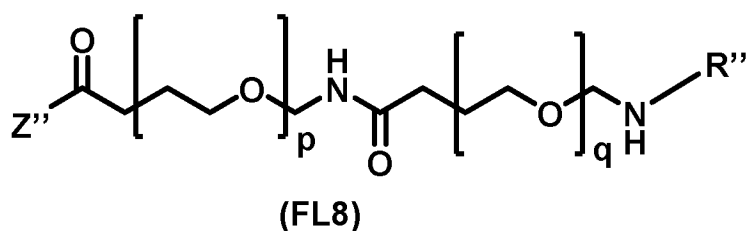
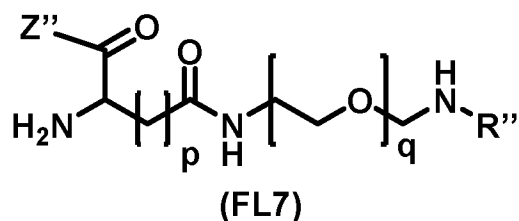
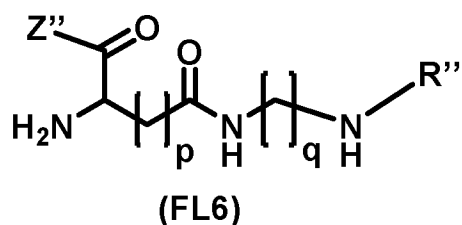
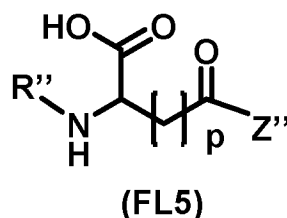
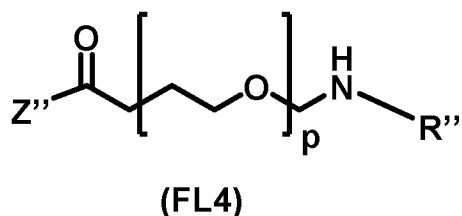
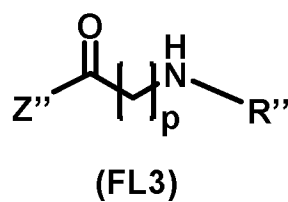
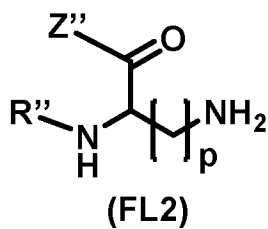
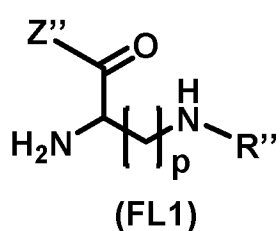
индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14;

один R₁ в F5 представляет собой B(OH)₂; и

все остальные R₁ представляют собой H, и

в Формуле F10 индекс j представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 13.

4. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3, характеризующееся тем, что указанный необязательный линкер представляет собой L- или D-аминокислоту, имеющую по меньшей мере одну функциональную группу, непосредственно конъюгированную с R, или указанный необязательный линкер выбран из Формул FL1-FL9:



причем в Формулах FL1-FL9:

Z'' представляет собой ковалентную связь с Z;

R'' представляет собой ковалентную связь с R;

5 р представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 5;

q представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 5; и

г представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 5.

5. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3, характеризующееся тем, что указанное соединение представляет собой лекарственное вещество, которое
10 дополнительно модифицировано как описано в вариантах реализации 1-3, и/или тем, что

каждый из указанного одного или более аминов независимо ацетилирован или алкилирован.

6. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3, характеризующееся тем, что указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, включая
5 человеческий инсулин или его аналог, и указанный инсулин включает А-цепь и В-цепь.

7. Соединение по любому из вариантов реализации 1-2, характеризующееся тем, что указанное лекарственное вещество включает полипептидное лекарственное вещество или человеческий пептидный гормон.

8. Соединение по варианту реализации 6, характеризующееся тем, что указанный
10 инсулин включает одну или две пептидные последовательности, каждая из которых независимо добавлена к указанной А-цепи и/или В-цепи инсулина, и каждая пептидная последовательность независимо включает от 1 до 20 смежных остатков.

9. Соединение по варианту реализации 6, характеризующееся тем, что указанный
15 инсулин включает от 2 до 10 аминокислот, каждая из которых независимо модифицирована, как описано Формулами I, II или III.

10. Соединение по варианту реализации 6, характеризующееся тем, что указанный
инсулин включает одну или более модификаций, каждая из которых независимо описана Формулами I, II или III, причем каждая из указанной одной или более модификаций расположена:

20 (i) на боковой цепи аминокислоты и/или на N-конце полипептида, включающего до 20 остатков, присоединенного к N- и/или C-концу указанной А-цепи и/или В-цепи инсулина; и/или

(ii) в пределах 4 остатков от остатков B1, B21, B22, B29, A1, A22 или A3 в
указанной А- или В-цепи инсулина; и/или

25 (iii) на боковой цепи аминокислоты и/или на N-конце полипептида, присоединенного или встроенного в указанную А-цепь и/или В-цепь инсулина, причем указанный полипептид включает последовательность $(X_2)_nX_1(X_2)_m$, где: X_1 представляет собой остаток лизина, в котором боковая цепь указанного остатка лизина модифицирована, как описано Формулами I, II или III; каждый X_2
30 независимо выбран из группы аминокислот K, P, E, G, N, M, A, R, L, W, S, F, V, C, H, D, I, Y, Q, T или X_1 ; индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 20; и индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 18.

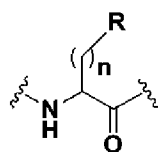
11. Конъюгат, включающий соединение по любому из вариантов реализации 1-2, характеризующийся тем, что указанное соединение по любому из вариантов реализации 1-
35 2 конъюгировано, либо непосредственно, либо посредством ковалентного линкера, с

лекарственным веществом, при условии, что указанная конъюгация осуществляется не через Z, если Z представляет собой NH₂ в Формуле II.

12. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3, характеризующееся тем, что указанное соединение по любому из вариантов реализации 1-3 применяют в качестве промежуточного соединения для изготовления любых соединений по вариантам реализации 1-11.

13. Соединение по любому из вариантов реализации 5-6, характеризующееся тем, что указанное соединение содержит одну или более модификаций, описанных Формулами IV, V или VI,

10 причем для Формулы IV:

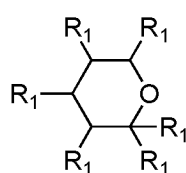


(Формула IV),

и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного лекарственного вещества;

15 индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8; и

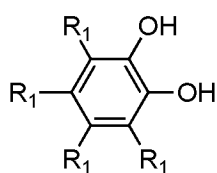
R выбран из группы, состоящей из формул F111, F222, F333, F444 и F555:



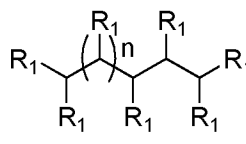
(F111)



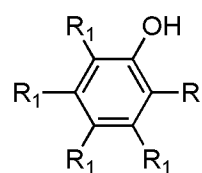
(F222)



(F333)



(F444)



(F555)

причем в Формулах F111, F222, F333, F444 и F555:

20 индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

каждый атом углерода, присоединенный к R¹, независимо имеет (R) или (S) стереохимию;

каждый R₁ независимо выбран из —H, —OR³, —N(R³)₂, —SR³, —OH, —OCH₃, —OR⁵, NHC(O)CH₃, —CH₂R³, —C(O)NHOH, —NHC(O)CH₃, —CH₂OH, —CH₂OR⁵, —NH₂, —CH₂R⁴, —OR⁸, —R⁶, —R⁸ и —R⁷,

25 каждый R³ независимо выбран из —H, ацетила, фосфата, —R², —SO₂R², —S(O)R², —P(O)(OR²)₂, —C(O)R², —CO₂R² и —C(O)N(R²)₂,

каждый R² независимо выбран из —H, необязательно замещенного C₁₋₆ алифатического кольца, необязательно замещенного фенильного кольца,

необязательно замещенного 5-6-членного моноциклического гетероарильного кольца, имеющего 1-4 гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы, 4-7-членного гетероциклического кольца, имеющего 1-2 гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы, и алкильной или амидной ковалентной связи с R в

каждый R^4 независимо выбран из $-\text{H}$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^3$, $-\text{N}(\text{R}^3)_2$, $-\text{OR}^5$ и $-\text{SR}^3$;

каждый R^5 независимо выбран из моносахарида, дисахарида, трисахарида, пентозы и гексозы,

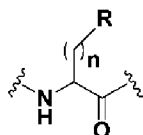
каждый R^6 независимо выбран из $-\text{NCOCH}_2-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$, $-\text{O}-\text{C}_{1-9}$ алкиленовой группы и замещенной C_{1-9} алкиленовой группы, в которой одна или более метиленовых групп необязательно замещены $-\text{O}-$, $-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{OCH}_2-$, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})-$, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^2)-$, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{SO}_2-$, $-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}^2)-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)-$ или $-\text{N}(\text{R}^2)\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^2)-$, где индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8,

каждый R^7 независимо выбран из $-\text{N}(\text{R}^2)_2$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{SH}$, $-\text{OR}^2$, $-\text{SR}^2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{C}\equiv\text{CR}^2$, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CO}_2\text{R}^2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{OSO}_2\text{R}^2$, $-\text{N}(\text{R}^2)_2$, $-\text{OR}^2$, $-\text{SR}^2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, и непосредственной связи с R в

R^8 представляет собой (i) боковую цепь одного из L-серина, D-серина, L-треонина, D-треонина, L-аллотреонина или D-аллотреонина и соответствует R в Формуле IV, где индекс n=1 в Формуле IV, (ii) амидную связь с C-концом лизина, цистеина, 2,3-диаминопропионовой кислоты или (iii) $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, и

структуры F111, F222, F333, F444 и/или F555 необязательно включают одну или более ацетильных, ацетиленовых, ацетонидных и/или пинаколовых защитных групп;

причем для Формулы V:



(Формула V),

и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного лекарственного вещества;

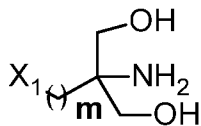
индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

R представляет собой X-Y,

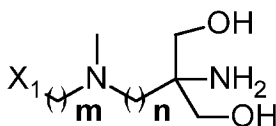
где X представляет собой ковалентную связь, выбранную из группы, состоящей из триазола, амидной связи, иминной связи или тиоэфирной связи;

Y выбран из группы, состоящей из структур, представленных Формулами F200-

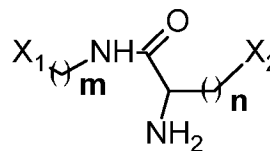
5 F203:



(F₂₀₀)



(F₂₀₁)



(F₂₀₂)

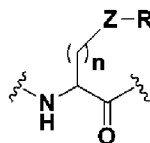
X₁ представляет собой ковалентную связь с X;

X₂ представляет собой SH, OH или NH₂;

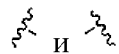
индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8; и

10 индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

причем для Формулы VI:



(Формула VI),



и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного лекарственного вещества;

15

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

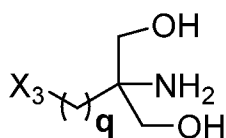
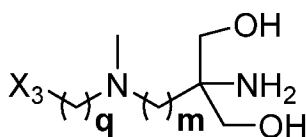
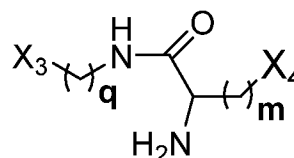
Z выбран из группы, состоящей из: аминокислоты, $-(CH_2)_p-$, $-CH_2(OCH_2CH_2)_p-$, $-SCH_2-$, $-S(CH_2)_2-$, $-NH-$, $-NH(CO)-$, $-(CO)NH-$, $-S(CH_2)_kNH-$, $-$ триазол $-(CH_2)_k-NH-$, триазола, амидной связи, иминной связи и

20 тиоэфирной связи;

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 5;

индекс p представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8; и

R выбран из группы, состоящей из структур, представленных Формулами F203-F205:

**(F203)****(F204)****(F205)**

где X_3 представляет собой ковалентную связь с Z ;

X_4 представляет собой SH, OH или NH_2

индекс q представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8; и

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8.

14. Способ изготовления соединения по любому из вариантов реализации 1-13, характеризующийся тем, что необязательно B_1 и B_2 сначала конъюгируют с одной из структур, представленных FF1-FF33, а затем полученный конъюгат ковалентно связывают с лекарственным веществом, или необязательно структуры, представленные FF1-FF33, сначала конъюгируют с лекарственным веществом, а затем B_1 и B_2 ковалентно связывают с соответствующими структурами в FF1-FF33.

15. Способ введения соединения по любому из вариантов реализации 1-13 субъекту-человеку в качестве терапевтического или профилактического агента.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Признаки и преимущества вариантов реализации настоящего изобретения будут более понятны со ссылкой на следующее подробное описание при рассмотрении в сочетании с прилагаемыми чертежами.

ФИГ. 1-24 представляют собой масс-спектрометрические графики, подтверждающие синтез Примеров 1-24, соответственно.

ФИГ. 25 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез модифицированного инсулина 1.

ФИГ. 26А представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез модифицирующего агента, конъюгированного с модифицированным инсулином 2.

ФИГ. 26В представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез модифицированного инсулина 2.

ФИГ. 27-28 представляют собой масс-спектрометрические графики, подтверждающие синтез модифицированных инсулинов 3 и 4, соответственно.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способность сенсоров (например, молекулярных сенсоров) селективно связываться и отвечать на конкретный вицинальный диол в организме облегчается за счет связывания с вицинальным диолом, представляющим интерес, при сниженном связывании с другими

диолами или другими вицинальными диолами. Несмотря на то, что большинство боронатов связываются с молекулами, содержащими диол, достижение селективности с использованием боронатов (например, сенсоров на основе боронатов) не всегда легко осуществить; это обусловлено их общей склонностью связывать большинство диолов, включая цис-диола, в различной степени. Улучшенная аффинность связывания таких сенсоров с конкретным вицинальным диолом, представляющим интерес, часто достигается за счет селективности или аффинности; разработка селективности в отношении конкретного вицинального диола в диапазоне физиологических уровней облегчается идентификацией специфичных молекулярных каркасов, которые могут различать ориентации гидроксильных групп различных вицинальных диолов. Разработка каркасов, которые размещают боронаты в конкретной или определенной геометрической конфигурации, чтобы повысить селективность в отношении конкретного вицинального диола, при одновременном сохранении аффинности в отношении диола, представляющего интерес, облегчается пониманием или идентификацией того, какие из различных боковых групп на боронатах наряду с какими конкретными геометрическими конфигурациями каркаса влияют на связывание с гидроксильными группами.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения идентифицированы специфичные каркасные молекулы для ориентации боронатов (например, в трехмерном пространстве) так, чтобы гидроксильные группы боронатов были пространственно ориентированы для взаимодействия с гексозами, содержащими вицинальные диолы, и при этом соответствие ориентации гидроксильной группы на боронате и гидроксильных групп в молекуле вицинального диола обеспечивает повышение селективности. Чтобы дополнительно обеспечить селективность, боронаты модифицируют специфичными функциональными группами на бензольном кольце фенилборонатов, которые, вместе с соответствующим или подходящим каркасом, могут обеспечить более высокую селективность связывания с вицинальным диолом, представляющим интерес, и в отличие от других диолов в организме. Согласно определенным вариантам реализации сенсоры вицинального диола конъюгированы с лекарственным веществом, причем указанные сенсоры вицинального диола обеспечивают внутримолекулярные и межмолекулярные взаимодействия с лекарственным веществом и/или с белками в организме, такими как циркулирующие белки в крови и/или плазме, включая альбумин и/или глобулины. Согласно определенным вариантам реализации селективное связывание сенсоров с конкретными вицинальными диолами изменяет степень этих внутримолекулярных и межмолекулярных связей и тем самым модулирует фармакокинетику и общую активность лекарственного вещества в организме; этот эффект

может контролироваться уровнем присутствующих вицинальных диолов. Согласно определенным вариантам реализации лекарственное вещество представляет собой пептидный гормон, и согласно определенным вариантам реализации пептидный гормон представляет собой человеческий пептидный гормон, такой как инсулин, глюкагон или другой инкретиновый гормон. Согласно определенным вариантам реализации сенсоры являются селективными в отношении вицинальных диолов в глюкозе, и эта селективность повышается при сохранении аффинности в отношении глюкозы и одновременном снижении аффинности в отношении других сахаров в крови. Согласно определенным вариантам реализации каркасы, а также (например, в комбинации с ними) боковые группы на боронатах позволяют контролировать общую активность и/или фармакокинетику конъюгированных лекарственных веществ на основе уровней глюкозы и/или других вицинальных диолов в крови.

Согласно одному или более вариантам реализации настоящего изобретения предложены сенсоры, содержащие специфичные каркасные молекулы с конъюгированными боронатами, причем указанные каркасы применяются для ориентации боронатов в трехмерных геометрических конфигурациях, чтобы гидроксильные группы боронатов были ориентированы рядом друг с другом и на расстоянии, которое способствует взаимодействию с конкретными ориентациями гидроксильных групп некоторых гексоз, таких как глюкоза. Сенсорные молекулы согласно настоящему изобретению повышают селективность посредством трех механизмов: (1) каркас облегчает совпадение ориентации гидроксила на боронных группах в фенилборонатах и гидроксильных групп в молекуле вицинального диола, что повышает селективность; (2) дальнейшее повышение селективности достигается путем идентификации специфичных функциональных групп, присоединенных к бензольному кольцу фенилбороновой кислоты или рядом с ним, которые влияют на электронную структуру фенилбороната и тем самым способствуют обратимому связыванию с вицинальными диолами при физиологических значениях pH; и (3) функциональные группы, присоединенные к фенилборонатам или сенсорному каркасу, помогают обеспечить стерическое препятствие для снижения связывания с нежелательными гексозами при одновременном сохранении связывания с сахаром, представляющим интерес, таким как глюкоза. Эти эффекты, объединенные вместе в настоящем изобретении, обеспечивают целевую или подходящую селективность связывания с представляющей интерес молекулой, содержащей вицинальный диол, и в отличие от других диолов в организме. Согласно определенным вариантам реализации сенсоры вицинального диола конъюгированы с лекарственным веществом, причем указанные сенсоры вицинального диола обеспечивают внутримолекулярные и/или

межмолекулярные взаимодействия с белками в организме. Такие белки могут включать циркулирующие белки в крови и/или плазме человека, такие как альбумин, гликозилированные белки и/или иммуноглобулины. Согласно определенным вариантам реализации селективное связывание сенсоров с конкретными вицинальными диолами в молекуле, представляющей интерес, изменяет степень внутримолекулярного и межмолекулярного связывания и тем самым модулирует фармакокинетику и общую активность лекарственного вещества в организме. Согласно определенным вариантам реализации лекарственное вещество представляет собой пептидный гормон, и согласно определенным вариантам реализации пептидный гормон представляет собой инкретиновый гормон, такой как инсулин, и молекула, содержащая вицинальный диол, представляет собой глюкозу, однако настоящее изобретение не ограничивается этим.

Определения

В следующем описании представлены и описаны выбранные примерные варианты реализации объекта настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники поймут, что объект настоящего изобретения может быть реализован во многих различных формах, и его не следует толковать как ограниченный вариантами реализации, изложенными в настоящем документе.

В следующем подробном описании изложены многочисленные конкретные детали, чтобы обеспечить более полное понимание некоторых вариантов реализации настоящего изобретения. Однако специалисты в данной области техники поймут, что варианты реализации настоящего изобретения можно осуществлять в различных подходящих формах, и оно необязательно ограничивается этими конкретными деталями. Все раскрытые признаки могут быть заменены сопоставимыми признаками, которые имеют аналогичную, эквивалентную или подобную цель, если иное не указано явным образом. Таким образом, если иное не указано явным образом, каждый раскрытый признак представляет собой только один пример из ряда эквивалентных или подобных признаков. Аналогичным образом, если не указано иное, признаки одного варианта реализации могут быть включены в другие варианты реализации без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения.

Если не указано иное, все термины (включая технические и научные термины), используемые в настоящем документе, имеют значение, соответствующее обычному пониманию специалиста в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Также будет понятно, что термины, такие как те, которые определены в обычно используемых словарях, должны интерпретироваться как имеющие значение, которое согласуется с их значением в контексте соответствующей области техники и/или

настоящего описания, и не должны интерпретироваться в идеализированном или чрезмерно формальном смысле, если иное явным образом не определено в настоящем документе.

Например, если не указано иное, все химические термины и названия функциональных групп, используемые по всему описанию, идентифицируются в соответствии с Periodic Table of the Elements, CAS version, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed., inside cover. Специфичным функциональным группам дается их значение, как описано в общих принципах органической химии, и специфичные функциональные фрагменты и реакционная способность также определены, как описано в Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., New York, 1989; Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987; и Smith and March, March's Advanced Organic Chemistry, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001.

Терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения настоящего изобретения. В настоящем документе формы единственного числа (соотв. «а», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке) также предназначены для включения форм множественного числа, и наоборот, если контекст явно не указывает иное. Кроме того, следует понимать, что термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий» и их варианты при использовании в настоящем описании определяют наличие заявленных добавок, ингредиентов, признаков, целых чисел, действий, операций, элементов, групп, компонентов и/или фрагментов, но не исключают наличие или добавление одной или более других добавок, ингредиентов, признаков, целых чисел, действий, операций, элементов, групп, компонентов или фрагментов. В настоящем документе термин «и/или» включает любые и все комбинации одного или более связанных перечисленных элементов. Выражения, такие как «по меньшей мере один из», когда они предшествуют перечню элементов, модифицируют весь перечень элементов и не модифицируют отдельные элементы перечня.

Следует понимать, что, хотя термины «первый», «второй», «третий» и т. д. могут использоваться в настоящем документе для описания различных элементов, компонентов, областей, слоев и/или частей, эти элементы, компоненты, области, слои и/или части не должны ограничиваться этими терминами. Эти порядковые термины используются, чтобы отличить один элемент, компонент, область, слой или часть от другого элемента, компонента, области, слоя или части. Таким образом, первый элемент, компонент,

область, слой или часть, описанные ниже, могут быть названы вторым элементом, компонентом, областью, слоем или частью без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения.

В настоящем документе термины «по существу», «примерно» и подобные термины используются как термины приближения, а не как термины степени, и предназначены для учета свойственных отклонений измеренных или рассчитанных значений, которые будут понятны обычным специалистам в данной области техники. Кроме того, использование «может» при описании вариантов реализации настоящего изобретения относится к «одному или более вариантам реализации настоящего изобретения». В настоящем документе термины «использовать», «используя» и «использованный» можно считать синонимами терминов «применять», «применяя» и «примененный», соответственно. Кроме того, термин «примерный» предназначен для обозначения примера или иллюстрации.

Любой числовой диапазон, указанный в настоящем документе, предназначен для включения всех поддиапазонов с одинаковой числовой точностью, включенных в указанный диапазон. Например, диапазон от «1,0 до 10,0» предназначен для включения всех поддиапазонов между (и включая их) указанным минимальным значением 1,0 и указанным максимальным значением 10,0, то есть имеющим минимальное значение, которое равно или превышает 1,0, и максимальное значение, которое равно или меньше 10,0, такое как, например, от 2,4 до 7,6. Любое максимальное числовое ограничение, указанное в настоящем документе, предназначено для включения всех более низких числовых ограничений, включенных в него, и любое минимальное числовое ограничение, указанное в настоящем описании, предназначено для включения всех более высоких числовых ограничений, включенных в него. Соответственно, заявитель оставляет за собой право вносить поправки в настоящее описание, включая формулу изобретения, для явного указания любого поддиапазона, включенного в диапазоны, явным образом указанные в настоящем документе.

Термин «CAS №», используемый в настоящем документе и взаимозаменяемо используемый с терминами «CASRN» или «CAS Номер», относится к уникальному числовому идентификатору, присвоенному Реестром химических соединений (Chemical Abstracts Service (CAS)) каждому химическому веществу, описанному в открытой научной литературе.

Согласно определенным вариантам реализации термины «ковалентно связанный», «ковалентно конъюгированный» или «посредством ковалентной конъюгации» могут использоваться взаимозаменяемо для обозначения того, что два или более атомов, групп

или химических фрагментов связаны или соединены химической связью. Согласно определенным вариантам реализации химическая связь (которая в определенных вариантах реализации может называться ковалентной связью) может представлять собой (например, состоять из) одной или более общих электронных пар (например, в одинарной связи, двойной связи или тройной связи), которая(ые) находится (находятся) непосредственно между двумя атомами, группами или химическими фрагментами, на что указывает термин «непосредственно связанные». Согласно определенным вариантам реализации химическая (ковалентная) связь может дополнительно включать один или более атомов или функциональных групп и может упоминаться с использованием соответствующего названия этой функциональной группы в данной области техники. Например, ковалентная связь, включающая группу $-S-S-$, может называться дисульфидной связью; ковалентная связь, включающая группу $-(C=O)-$, может называться карбонильной связью; ковалентная связь, включающая группу $-(CF_2)-$, может называться дифторметиловой связью и т. д. Тип связи или функциональной группы в ковалентной связи не ограничен, если явным образом не указано иное, например, если она описана, как включающая определенные группы или выбранная из них. Типы или виды подходящих ковалентных связей будут понятны из описания и/или контекста.

Согласно определенным вариантам реализации боковые цепи аминокислот могут быть ковалентно соединены (например, связаны или перекрестно связаны) посредством любого числа химических связей (например, связывающих фрагментов), как в целом описано в *Bioconjugate Techniques* (Third edition), ред. Greg T. Hermanson, Academic Press, Boston, 2013. Например, боковые цепи могут быть ковалентно соединены посредством амида, сложного эфира, простого эфира, тиоэфира, изомочевины, имида, триазола или любой подходящей для ковалентной конъюгации химии, доступной в данной области техники для ковалентного соединения одного пептида, белка или синтетического полимера со вторым пептидом, белком или синтетическим полимером. Термин полимер включает полипептид. Термин «химия для ковалентной конъюгации» может относиться к одной или более функциональным группам, включенным в связывающий фрагмент, и/или к химическим реакциям, используемым для образования связывающего фрагмента.

Термин «вицинальный диол» относится к группе молекул, в которых две гидроксильные группы занимают вицинальные положения, то есть они присоединены к соседним атомам. Такие молекулы могут включать, но не ограничиваются ими, сахара, такие как гексозы, глюкоза, манноза и фруктоза.

Согласно определенным вариантам реализации пептид, белок или синтетический полимер может быть связан с модифицированным инсулином с использованием реакций

клик-химии, как это понимается и определено в данной области техники. Неограничивающие примеры подходящих реакций клик-химии могут включать реакции циклоприсоединения, такие как 3+2 циклоприсоединения, стимулированное напряжением алкин-нитроновое циклоприсоединение, реакции напряженных алкенов, реакции Дильса-Альдера с обратными требованиями с участием алкена и тетразина, катализируемое медью (I) азид-алкиновое циклоприсоединение (CuAAC), стимулированное напряжением азид-алкиновое циклоприсоединение, лигирование по Штаудингеру, реакция нуклеофильного раскрытия кольца и присоединения к кратным связям углерод-углерод. Некоторые из этих реакций описаны, например, в H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless (2001); Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angewandte Chemie International Edition* 40 (11): 2004–2021; Kolb and Sharpless, *Drug Discovery Today* 8:1128-1137, 2003; Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1963, 2, 565; и Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. *ACS Chem. Biol.* 2006, 1, 644. Обычные специалисты в данной области техники способны выбрать подходящие буферы, pH и условия реакции для таких клик-реакций. Например, для реакции CuAAC следует избегать использования хелаторов, таких как ЭДТА. Согласно определенным вариантам реализации ковалентная конъюгация может быть результатом «биоортогональной реакции», известной в данной области техники. Такие реакции, например, описаны Sletten, Ellen M.; Bertozzi, Carolyn R. (2009). Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality, *Angewandte Chemie International Edition* 48 (38): 6974–98.; и Prescher, Jennifer A; Bertozzi, Carolyn R (2005). Chemistry in living systems, *Nature Chemical Biology* 1 (1): 13–21. Согласно определенным вариантам реализации звенья могут быть связаны с использованием нативного химического лигирования, например, как описано Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science* 266 (5186): 776–778.

Термин «замещенный» означает, что по меньшей мере один атом водорода названной группы замещен атомом, не являющимся водородом, функциональной группой, пептидом, линкером и т. д. Замещающие структуры (которые могут упоминаться в настоящем документе как «заместители») конкретно не ограничены, если явным образом не указано иное, и могут включать любую подходящую функциональную группу, аминокислоту, полипептид и т.д., доступные в данной области техники. Согласно определенным вариантам реализации заместитель сам по себе может быть дополнительно замещен.

Термин «инсулин» охватывает как формы дикого типа, так и измененные формы инсулина, которые способны связываться с рецептором инсулина и активировать его или

способны вызывать измеримое снижение уровня глюкозы в крови при введении *in vivo*. Согласно определенным вариантам реализации инсулин включает инсулин из любого вида, будь то в очищенной, синтетической или рекомбинантной форме, и, например, может включать человеческий инсулин, свиной инсулин, бычий инсулин, овечий инсулин и кроличий инсулин.

Согласно определенным вариантам реализации инсулин может представлять собой известный в данной области техники проинсулин или может включать его (например, предшественник инсулина), который может быть дополнительно процессирован в зрелый инсулин.

Когда инсулин представляет собой измененную форму инсулина, инсулин может быть изменен с использованием любой подходящей методики в данной области техники. Например, инсулин может быть химически изменен (например, путем добавления химического фрагмента, такого как группа ПЭГ или жирная ацильная цепь) и/или может быть мутирован (например, может включать добавления, делеции или замены аминокислот). Если инсулин включает одну или более мутаций, мутации могут быть указаны с использованием стандартной терминологии в данной области техники, но следует понимать, что аналог инсулина может содержать одну или более мутаций, известных в данной области техники, некоторые из этих мутаций могут изменять (усиливать) различные аспекты молекулы, включая биофизические характеристики или стабильность и устойчивость к разрушению. Согласно определенным вариантам реализации, например, термин «desB30» относится к инсулину, в котором отсутствует аминокислотный остаток B30.

Согласно определенным вариантам реализации термин «процент гомологии» относится к проценту идентичности последовательностей между двумя последовательностями после оптимального выравнивания; идентичные последовательности имеют процент гомологии 100%. Оптимальное выравнивание может быть выполнено с использованием любого подходящего алгоритма выравнивания для оценки гомологии, описанного методом поиска сходства Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), или с помощью общих методов, описанных для поиска сходства Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), включая реализацию этих алгоритмов или визуальное сравнение. «А-цепь инсулина» представляет собой цепь инсулина, которая имеет самый высокий процент гомологии с А-цепью человеческого инсулина дикого типа. «В-цепь инсулина» представляет собой цепь инсулина, которая имеет самый высокий процент гомологии с В-цепью человеческого инсулина дикого типа. Согласно определенным вариантам реализации А-цепь и В-цепь инсулина могут быть

соединены друг с другом посредством одного или более пептидов, например, с-пептида, известного в данной области техники, или его укороченного варианта.

Согласно определенным вариантам реализации термин «альбумин» относится к человеческому сывороточному альбумину или белку, имеющему по меньшей мере 60% гомологии с человеческим сывороточным альбумином. Следует понимать, что в определенных вариантах реализации альбумин может быть дополнительно химически модифицирован для целей конъюгации. Такие модификации могут включать один или более ковалентно соединенных линкеров.

Согласно определенным вариантам реализации «терапевтическая композиция» в контексте настоящего документа относится к веществу или смеси веществ, которые предназначены для оказания терапевтического действия, таким как фармацевтические композиции, генетические материалы, биологические препараты и другие вещества. Фармацевтические композиции могут быть сконфигурированы для функционирования внутри организма с терапевтическими свойствами, концентрацией для снижения частоты восполнения и т.п. Согласно определенным вариантам реализации «терапевтически эффективное количество» и «профилактически эффективное количество» относятся к количеству, которое обеспечивает терапевтическую пользу при лечении, предотвращении или контроле заболевания или явного симптома заболевания. С помощью терапевтически эффективного количества можно лечить заболевание или состояние, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию с целью излечения, заживления, смягчения, облегчения, изменения, исправления, уменьшения, улучшения или воздействия на заболевание, симптомы заболевания или предрасположенность к заболеванию. Заданное или конкретное количество, которое является терапевтически эффективным, может быть легко определено обычным практикующим врачом и может варьироваться в зависимости от факторов, известных в данной области техники, таких как, например, тип заболевания, анамнез и возраст пациента, стадия заболевания и введение других терапевтических агентов.

Сенсоры вицинального диола

Сенсорные каркасы и специфичные боронатные функциональные группы согласно настоящему изобретению обеспечивают основу для молекул (сенсоров), которые могут различать молекулу, содержащую вицинальный диол, и другие молекулы, содержащие диол, например, путем преимущественного связывания с одной молекулой, содержащей вицинальный диол, в сравнении с другими молекулами, содержащими диол. Например, сенсорные каркасы с соответствующими или подходящими боронатами могут быть синтезированы с использованием способов, представленных в настоящем документе, для

обеспечения сенсорных молекул, которые могут связываться с конкретной гексозой и при этом также отклонять или игнорировать другие сахара, имеющие сходные структуры, в которых отсутствует вицинальный диол. Например, могут быть разработаны сенсоры, которые связываются с глюкозой, но активно отклоняют или игнорируют (например, не связываются) лактат и/или фруктозу. Не ограничиваясь правильностью какой-либо теории объяснения, полагают, что сенсорные молекулы согласно настоящему изобретению могут иметь повышенную селективность за счет любой комбинации трех механизмов: (1) каркас может располагать бороновые гидроксильные группы в фенилборонатах и гидроксилы в молекуле вицинального диола в комплементарные ориентации; (2) специфичные функциональные группы, присоединенные к бензольному кольцу фенилбороновой кислоты или рядом с ним, могут изменять электронную структуру фенилбороната, чтобы способствовать обратимому связыванию с вицинальными диолами при физиологических значениях pH; и (3) функциональные группы, присоединенные к фенилборонатам и/или сенсорному каркасу, могут увеличивать стерическое затруднение и снижать связывание с нежелательными (например, нецелевыми) гексозами (диолами), сохраняя при этом связывание с представляющей интерес молекулой (которая также может называться представляющим интерес сахаром), такой как глюкоза. Эти эффекты, по отдельности или в комбинации друг с другом, в вариантах реализации настоящего изобретения обеспечивают селективное связывание с вицинальным диолом, представляющим интерес, и в отличие от других диолов в организме. Согласно определенным вариантам реализации сенсоры вицинального диола конъюгированы с лекарственным веществом, и сенсоры вицинального диола могут обеспечивать и/или усиливать внутримолекулярные и/или межмолекулярные взаимодействия между лекарственным веществом и одним или более белками в организме.

Влияние указанных выше механизмов на селективность сенсора можно частично проиллюстрировать на основании данных, представленных в Таблице 1. Селективность может быть достигнута или повышена, во-первых, за счет применения соответствующих или подходящих каркасных молекул (например, фрагментов). Например, во всех соединениях Примеров 9, 10, 11, 12 и 13 применяются сходные фенилборонаты, но они проявляют совершенно разную аффинность в отношении глюкозы. Как показано в Таблице 1, Пример 9 обеспечивает самое низкое значение K_d в отношении глюкозы (например, самую высокую аффинность) в группе, в то время как Пример 11 обеспечивает самое высокое значение K_d (например, самую низкую аффинность) в отношении фруктозы. Этот неинтуитивный селективный ответ в основном обусловлен каркасной молекулой, поскольку во всех этих примерах используются сходные нитрозамещенные

фенилборонаты. Сравнение Примеров 9 и 10 показывает, что дополнительная группа $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ в каркасе (например, как в Примере 10) может существенно нарушать связывание глюкозы, оказывая при этом незначительное влияние на связывание фруктозы. Наоборот, добавление группы $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ в каркасе увеличивает аффинность в отношении лактата (например, снижает значение K_d в отношении лактата). Следовательно, в то время как аффинность в отношении глюкозы снижается из-за дополнительного расстояния между боронатами, аффинность в отношении лактата увеличивается. Этот пример иллюстрирует, что каркасы согласно настоящему изобретению могут оказывать большое влияние на способность сенсоров вицинального диола селективно связывать конкретную гексозу (например, с более высокой аффинностью в отношении ряда конкурирующих гексоз).

В качестве примера может быть сделано еще одно сравнение двух сенсоров, в которых применяются одни и те же боронаты, но разные каркасные молекулы (например, фрагменты). Сравнение аффинности в отношении диола Примера 2 и Примера 14 из Таблицы 1 показывает, что каркас Примера 14 обеспечивает более высокое значение селективности в отношении глюкозы по сравнению с лактатом, в то время как каркас Примера 2 обеспечивает более высокое значение селективности в отношении фруктозы по сравнению с лактатом. Этот неожиданный результат был обнаружен с помощью экспериментальной идентификации каркаса Примеров 2 и 14 и последующего анализа их специфичности связывания.

Второй фактор, влияющий на селективность связывания, представляет собой положение и природу (например, состав) функциональных групп на бензольном кольце фенилборонатов. На селективность влияет как положение конъюгации фенилбороната на сенсоре вицинального диола (например, положение конъюгации на бензольном кольце по отношению к присоединению бора (заместителя) на бензольном кольце), так и положения и идентичности (например, составы) других функциональных групп на бензольном кольце (например, *орто*-, *мета*- или *пара*- по отношению к группе бора на фенилборонатном кольце). Электроноакцепторные группы на фенилборонатах обычно обеспечивают более низкие значения pK_a (например, поскольку они помогают при ионизации), и в целом напряжение кольца в боронатах с 5-членным оксабороловым кольцом (например, Формулы F2, F13 или F29) искажает геометрию и также приводит к более низким значениям pK_a . В то время как группы фтора и/или CF_3 могут быть использованы в качестве электроноакцепторных групп, введение нитрогрупп в бензольное кольцо может оказать значительное влияние на снижение pK_a . Эти эффекты легче всего наблюдать, когда каркасная молекула сохраняется неизменной при изменении боронатов. Например, в соединениях Примеров 4-8 применяется одна и та же каркасная молекула, но содержатся

фенилборонаты, содержащие разные функциональные группы, и они проявляют различную селективность связывания в отношении глюкозы, фруктозы и лактата. Этот пример иллюстрирует, например, что присутствие групп NO_2 на фенилборонатном кольце может повышать аффинность в отношении глюкозы и что гетеробифункциональные сенсоры, содержащие два разных бороната или фенилбороната, проявляют другую селективность в отношении сахара, чем сенсоры вицинального диола, содержащие два подобных (или идентичных) бороната. Более того, аспекты настоящего изобретения включают нитрозамещенные боронаты, комбинированные с бороксолборонатами на одном и том же каркасе, как показано, например, путем сравнения аффинности Примеров 5 и 7 в Таблице 1. Гомобифункциональные боронатные группы Примера 5 обеспечивают худшую аффинность в отношении глюкозы по сравнению с гетеробифункциональными боронатами Примера 7. Применение бороксола с напряженным кольцом обеспечивает приблизительно 7-кратное увеличение аффинности в отношении глюкозы, фруктозы и лактата, даже несмотря на то, что остальная структура соединения подобна в Примерах 5 и 7.

Сходным образом, например, сравнение соединений Примеров 9 и 15 показывает, что введение нитрогрупп в боронаты увеличивает аффинность в отношении глюкозы в специфичных каркасах и что это увеличение аффинности происходит не только из-за электроноакцепторной природы функциональных групп боронатов (поскольку фтор также является электроноакцепторным). Следовательно, в отличие от давнего предположения о том, что более сильные электроноакцепторные группы на фенилборонатном кольце всегда усиливают связывание сахара при физиологических значениях pH, модулируя pKa бороната, это не всегда так (например, другие аспекты функциональной группы могут играть некоторую роль). Примеры 9 и 15 показывают, что для некоторых каркасов согласно настоящему изобретению нитрогруппа лучше увеличивает аффинность, чем эквивалентная фторгруппа на фенилборонатном кольце. Важность функциональных групп на фенилборонатах дополнительно подчеркивается сравнением примерных соединений, имеющих сходные каркасные структуры. Например, важность функциональных групп для селективности сенсора можно наблюдать при сравнении Примера 14 с Примером 18, Примера 11 с Примером 20, Примера 12 с Примерами 21 и 23, а также сравнений в Примерах 1-3 или в Примерах 4-8, и соответствующие значения аффинности этих молекул перечислены в Таблице 1. Эти примеры иллюстрируют влияние размещения функциональной группы на фенилборонатном кольце для определенной каркасной молекулы, которое может усиливать связывание и селективность сенсора в отношении представляющего интерес сахара, например, в отношении глюкозы и в отличие от других

молекул, содержащих гидроксил, включая фруктозу или лактат. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации идентифицированные каркасные молекулы и конкретные боронаты, конъюгированные с этими каркасами, описанные в настоящем раскрытии, включают сенсоры вицинального диола, обладающие преимущественной селективностью связывания с вицинальным диолом, представляющим интерес (например, глюкозой), и в отличие от других вицинальных диолов (например, фруктозы) или молекул, содержащих гидроксил (например, лактата).

Третьим структурным фактором, влияющим на селективность, является стерическое затруднение или эффекты заряда, которые благоприятствуют связыванию с одной молекулой сахара по сравнению с другой. Например, влияние аминных (амидных) групп по сравнению с кислотными группами на каркасы можно наблюдать, сравнивая Примеры 1-3 в Таблице 1. Кислотная или амидная группа заместителя на каркасе может вносить вклад в различия в аффинности связывания этих сенсоров в отношении глюкозы по сравнению с лактатом или фруктозой. Сравнение Примеров с каркасами, включающими кислотную группу или амидную группу, с Примерами 1-3 и 4-8 в Таблице 1 показывает общее влияние кислотной группы по сравнению с амидной группой на каркас, причем такое влияние дополнительно распространяется на заместители на боронатах, которые не влияют непосредственно на электронную структуру бороната, но могут стерически препятствовать взаимодействию сенсора с одной парой вицинальных диолов по сравнению с другой и тем самым влиять на селективность. В совокупности, комбинированные эффекты каркасной молекулы, функциональных групп на фенилборонатном кольце и функциональных групп либо непосредственно рядом с фенилборонатным кольцом, либо на каркасе, включенные в определенный вариант реализации настоящего изобретения, показывают некоторые из подходов, с помощью которых раскрытые сенсоры обеспечивают связывание конкретных вицинальных диолов. Эти Примеры и связанные с ними значения аффинности связывания в Таблице 1 демонстрируют по меньшей мере некоторые из эффектов, которые идентифицированы при повышении селективности.

Согласно определенным вариантам реализации сенсоры вицинального диола конъюгированы с инкретиновым пептидом для контроля фармакокинетики в организме в ответ на конкретный вицинальный диол, такой как глюкоза. Согласно определенным вариантам реализации инкретиновый пептид представляет собой полипептид и может представлять собой, например, инсулин. Инсулин является важным регулятором уровня глюкозы в крови. У здорового индивидуума присутствует инсулин и при высвобождении поджелудочной железой он снижает уровень сахара в крови. Сахарный диабет (СД),

обычно называемый диабетом, представляет собой группу метаболических заболеваний, при которых в течение длительного периода времени наблюдается высокий уровень сахара в крови.

Согласно определенным вариантам реализации сенсор вицинального диола может
5 содержать одну молекулу бороновой кислоты (или групп) или несколько молекул бороновой кислоты (или групп), и сенсорный каркас и/или боронаты присоединены непосредственно к нафталиновому, антраценовому, бифенильному, антрахиноновому, фенантроновому, хризеновому, пиреновому, короненовому, кораннуленовому, тетраценовому, пентаценовому или трифениленовому каркасу или включают его. Эти
10 каркасы могут включать, но не ограничиваются перечисленными, дополнительные заместители, такие как нитро-, фтор-, спиртовые, тиольные, трифторметильные и/или метокси функциональные группы. Два или более каркасов могут быть конъюгированы вместе либо непосредственно, либо посредством одной или более аминокислот. Каркасы могут быть дополнительно конъюгированы с лекарственным средством или
15 лекарственным веществом и придают способность различать целевые молекулы или белки, содержащие диол. Определенные варианты реализации могут включать несколько копий этих каркасов, которые могут обеспечивать дополнительную селективность и функциональность.

В некоторых вариантах применения модифицированные инсулины, описанные в
20 настоящем документе, могут быть доставлены в организм путем инъекции или другими путями и могут обратимо связываться с растворимой глюкозой в форме, отличной от депо-формы. В некоторых вариантах применения модифицированные инсулины, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены в организм путем инъекции или другими путями и могут обратимо связываться с растворимой глюкозой в депо-форме
25 и/или растворимой форме. Согласно определенным вариантам реализации модифицированные инсулины, описанные в настоящем документе, могут дополнительно высвободиться в течение длительного периода времени из локального депо в организме. Согласно определенным вариантам реализации модифицированные инсулины связываются с белками в крови и/или в плазме, такими как сывороточный альбумин, и
30 высвобождение модифицированных инсулинов зависит от уровней глюкозы в крови так, что при повышенных уровнях глюкозы в крови большее количество модифицированных инсулинов высвобождается из сывороточного альбумина. Такая скорость высвобождения может зависеть от уровня сахара в крови или уровня других малых молекул в крови, включая молекулы, содержащие диол. Согласно определенным вариантам реализации
35 высвобождение, биодоступность и/или растворимость модифицированных инсулинов,

описанных в настоящем документе, можно контролировать в зависимости от концентраций глюкозы в крови и/или сыворотке и/или концентраций других малых молекул в организме. Определенные варианты реализации включают промежуточные соединения любого из соединений, описанных в настоящем документе; причем указанные промежуточные соединения могут необязательно содержать одну или более защитных групп (пример: Вос, Fmoc и т. д.), и согласно определенным вариантам реализации одна или более защитных групп независимо находятся на любом из подмножеств соединений или промежуточных соединений в настоящем изобретении.

Модифицированный инсулин описывает инсулин, который химически изменен по сравнению с инсулином дикого типа, например, но не ограничиваясь этим, путем добавления химического фрагмента, такого как группа ПЭГ или жирная ацильная цепь. Измененные инсулины могут быть мутированы, включая добавления, делеции или замены аминокислот. В результате этих изменений могут возникать различные протомеры инсулина, которые могут быть включены в определенные варианты реализации. Обычно активные формы инсулинов имеют менее 11 таких модификаций (например, 1-4, 1-3, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 2-6, 2-5, 2-4, 1-5, 1-2, 2-9, 2-8, 2-7, 2-3, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-9, 6-8, 6-7, 7-9, 7-8, 8-9, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1). Последовательность человеческого инсулина дикого типа (А-цепь и В-цепь) имеет А-цепь с аминокислотной последовательностью GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO:2) и В-цепь с аминокислотной последовательностью FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO:3).

Человеческий инсулин отличается от кроличьего, свиного, бычьего и овечьего инсулина аминокислотами A8, A9, A10 и B30, которые расположены в следующем порядке: Thr, Ser, Ile, Thr для человека; Thr, Ser, Ile, Ser для кролика; Thr, Ser, Ile, Ala для свиньи; Ala, Gly, Val, Ala для овцы; и Ala, Ser, Val, Ala для бычьего инсулина. Согласно определенным вариантам реализации модификация инсулина может включать инсулин, который мутирован в положениях B1, B2, B28 или B29, или B28 и B29 В-цепи. Согласно определенным вариантам реализации модификация инсулина может включать инсулин, который мутирован в положениях A1, A2, A21 или других положениях А-цепи. Например, инсулин лизпро представляет собой быстродействующий модифицированный инсулин, в котором остатки лизина и пролина на С-конце В-цепи поменяли местами. Инсулин аспарт представляет собой быстродействующий модифицированный инсулин, в котором пролин заменен аспарагиновой кислотой в положении B28. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предусмотрено, что мутации в B28 и B29 могут сопровождаться дополнительными мутациями. Инсулин глулизин представляет собой

быстродействующий модифицированный инсулин, в котором аспарагиновая кислота заменена остатком лизина в положении В3, а также лизин заменен остатком глутаминовой кислоты в положении В29.

Согласно определенным вариантам реализации изоэлектрическая точка инсулинов в настоящем документе может быть смещена относительно человеческого инсулина дикого типа путем добавления или замены аминокислот или достигнута иным образом, и согласно определенным вариантам реализации изоэлектрическая точка модифицированных инсулинов может модулироваться глюкозой. Например, инсулин гларгин представляет собой базальный инсулин, в котором к С-концу В-пептида добавлены два остатка аргинина, и А21 заменен глицином. Инсулин может не иметь одного или более остатков В1, В2, В3, В26, В27, В28, В29, В30. Согласно определенным вариантам реализации молекула инсулина содержит дополнительные аминокислотные остатки на N- или С-конце А-цепи или В-цепи. Согласно определенным вариантам реализации один или более аминокислотных остатков расположены в положениях А0, А21, В0 и/или В31 или отсутствуют. Согласно определенным вариантам реализации молекула инсулина согласно настоящему изобретению мутирована так, что одна или более аминокислот заменены кислыми формами. В качестве примера, аспарагин может быть заменен аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой, сходным образом глутамин может быть заменен аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой. Согласно определенным вариантам реализации А21 может представлять собой аспарагиновую кислоту, В3 может представлять собой аспарагиновую кислоту или оба положения могут содержать аспарагиновую кислоту (например, одновременно). Специалист в данной области техники поймет, что можно внести любые ранее описанные или широко признанные мутации или модификации инсулина, которые сохраняют биологическую активность, и что модифицированный инсулин можно применять в вариантах реализации настоящего изобретения. Согласно определенным вариантам реализации инсулин может быть связан в любом положении с жирной кислотой или ацилирован жирной кислотой в любой аминокгруппе, включая аминокгруппы на боковой цепи лизинов или альфа-аминокгруппу на N-конце инсулина, и жирная кислота может включать С8, С9, С10, С11, С12, С14, С15, С16, С17, С18. Согласно определенным вариантам реализации комбинацию жирных кислот или жирных двухосновных кислот и конъюгатов ПЭГ-линкера с модифицированными инсулинами применяют для увеличения периода полужизни модифицированных инсулинов в сыворотке или для придания модифицированным инсулинам характеристик пролонгированного высвобождения, такое пролонгированное высвобождение может составлять от 12 часов до 7 дней. Согласно

определенным вариантам реализации цепь жирной кислоты представляет собой 8-20 атомов углерода в длину. В качестве примера, такие модификации могут напоминать модификации в инсулине детемир, в котором миристиновая кислота ковалентно конъюгирована с лизином в положении B29 и B30 удален или отсутствует. Согласно определенным вариантам реализации положение B28 молекулы инсулина представляет собой лизин, и эписилон(ε)-аминогруппа этого лизина конъюгирована с жирной кислотой или модифицированной жирной кислотой или двухосновной кислотой. Согласно определенным вариантам реализации лизин на С-конце В-цепи инсулина или рядом с ним заменен аминокислотой, описанной Формулами I-III. Согласно определенным вариантам реализации активность, биодоступность, растворимость, изоэлектрическая точка, заряд и/или гидрофобность модифицированных инсулинов можно контролировать посредством химических модификаций или в результате взаимодействия малой молекулы, такой как сахар, с модифицированными инсулинами, описанными в настоящем документе, которая ковалентно связана или смешана с инсулином.

Согласно определенным вариантам реализации модифицированная молекула инсулина согласно настоящему изобретению включает мутации и/или химические модификации, включая, но не ограничиваясь перечисленными, одну из следующих молекул инсулина: N^{εB29}-октаноил-Arg^{B0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-октаноил-Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-октаноил-Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-миристоил-Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-миристоил-Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B30}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-миристоил-Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-миристоил-Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-миристоил-Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-миристоил-Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-миристоил-Arg^{A0}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-октаноил-Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-октаноил-Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-пальмитоил-HI, N^{εB29}-миристоил-HI, N^{εB28}-пальмитоил-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{εB28}-миристоил-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{εB29}-пальмитоил-дес(B30)-HI, N^{εB30}-миристоил-Thr^{B29}Lys^{B30}-HI, N^{εB30}-пальмитоил-Thr^{B29}Lys^{B30}-HI, N^{εB29}-(N-пальмитоил-γ-глутамил)-дес(B30)-HI, N^{εB29}-(N-липтохолл-γ-глутамил)-дес(B30)-HI, N^{εB29}-(ω-карбоксигептадеканоил)-дес(B30)-HI, N^{εB29}-(ω-карбоксигептадеканоил)-HI, N^{εB29}-октаноил-HI, N^{εB29}-миристоил-Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-миристоил-Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-миристоил-Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-миристоил-Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-миристоил-Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-миристоил-Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-октаноил-Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-октаноил-Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-октаноил-

- Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-октаноил-Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-
октаноил-Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-октаноил-
Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB28}-октаноил-Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI,
N^{εB28}-октаноил-Arg^{A0}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI. N^{εB29}-пентаноил-Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI,
5 N^{αB1}-гексаноил-Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{αA1}-гептаноил-Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-
октаноил-N^{αB1}-октаноил-Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-пропионил-N^{αA1}-пропионил-
Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{αA1}-ацетил-N^{αB1}-ацетил-Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-формил-N^{αA1}-
формил-N^{αB1}-формил-Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, N^{εB29}-формил-дес(B26)-HI, N^{αB1}-ацетил-
Asp^{B28}-HI, N^{εB29}-пропионил-N^{αA1}-пропионил-N^{αB1}-пропионил-Asp^{B1}Asp^{B3}Asp^{B21}-HI, N^{εB29}-
10 пентаноил-Gly^{A21}-HI, N^{αB1}-гексаноил-Gly^{A21}-HI, N^{αA1}-гептаноил-Gly^{A21}-HI, N^{εB29}-октаноил-
N^{αB1}-октаноил-Gly^{A21}-HI, N^{εB29}-пропионил-N^{αA1}-пропионил-Gly^{A21}-HI, N^{αA1}-ацетил-N^{αB1}-
ацетил-Gly^{A21}-HI, N^{εB29}-формил-N^{αA1}-формил-N^{αB1}-формил-Gly^{A21}-HI, N^{εB29}-бутирил-
дес(B30)-HI, N^{αB31}-бутирил-дес(B30)-HI, N^{αA1}-бутирил-дес(B30)-HI, N^{εB29}-бутирил-N^{αB31}-
бутирил-дес(B30)-HI, N^{εB29}-бутирил-N^{αA1}-бутирил-дес(B30)-HI, N^{αA1}-бутирил-N^{αB31}-
15 бутирил-дес(B30)-HI, N^{εB29}-бутирил-N^{αA1}-бутирил-N^{αB31}-бутирил-дес(B30)-HI,
Lys^{B28}Pro^{B29}-HI (инсулин лизпро), Asp^{B28}-HI (инсулин аспарт), Lys^{B3}Glu^{B29}-HI (инсулин
глулизин), Arg^{B31}Arg^{B32}-HI (инсулин гларгин), N^{εB29}-миристоил-дес(B30)-HI (инсулин
детемир), Ala^{B26}-HI, Asp^{B1}-HI, Arg^{A0}-HI, Asp^{B1}Glu^{B13}-HI, Gly^{A21}-HI, Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI,
Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-HI, дес(B30)-HI, дес(B27)-HI, дес(B28-
20 B30)-HI, дес(B1)-HI, дес(B1-B3)-HIN^{εB29}-тридеcanoил-дес(B30)-HI, N^{εB29}-тетрадеcanoил-
дес(B30)-HI, N^{εB29}-деcanoил-дес(B30)-HI, N^{εB29}-додеcanoил-дес(B30)-HI, N^{εB29}-
тридеcanoил-Gly^{A21}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-тетрадеcanoил-Gly^{A21}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-деcanoил-
Gly^{A21}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-додеcanoил-Gly^{A21}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-тридеcanoил-Gly^{A21}Gln^{B3}-
дес(B30)-HI, N^{εB29}-тетрадеcanoил-Gly^{A21}Gln^{B3}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-деcanoил-Gly^{A21}-Gln^{B3}-
25 дес(B30)-HI, N^{εB29}-додеcanoил-Gly^{A21}-Gln^{B3}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-тридеcanoил-Ala^{A21}-
дес(B30)-HI, N^{εB29}-тетрадеcanoил-Ala^{A21}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-деcanoил-Ala^{A21}-дес(B30)-HI,
N^{εB29}-додеcanoил-Ala^{A21}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-тридеcanoил-Ala^{A21}-Gln^{B3}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-
тетрадеcanoил-Ala^{A21}Gln^{B3}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-деcanoил-Ala^{A21}Gln^{B3}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-
додеcanoил-Ala^{A21}Gln^{B3}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-тридеcanoил-Gln^{B3}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-
30 тетрадеcanoил-Gln^{B3}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-деcanoил-Gln^{B3}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-додеcanoил-
Gln^{B3}-дес(B30)-HI, N^{εB29}-Z1-Gly^{A21}-HI, N^{εB29}-Z2-Gly^{A21}-HI, N^{εB29}-Z4-Gly^{A21}-HI, N^{εB29}-Z3-
Gly^{A21}-HI, N^{εB29}-Z1-Ala^{A21}-HI, N^{εB29}-Z2-Ala^{A21}-HI, N^{εB29}-Z4-Ala^{A21}-HI, N^{εB29}-Z3-Ala^{A21}-
HI, N^{εB29}-Z1-Gly^{A21}Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z2-Gly^{A21}Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z4-Gly^{A21}Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z3-
Gly^{A21}Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z1-Ala^{A21}Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z2-Ala^{A21}Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z4-Ala^{A21}Gln^{B3}-HI,
35 N^{εB29}-Z3-Ala^{A21}Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z1-Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z2-Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z4-Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z3-

Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z1-Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z2-Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z4-Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z3-Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z1-Gly^{A21}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z2-Gly^{A21}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z4-Gly^{A21}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z3-Gly^{A21}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z1-Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z2-Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z4-Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z3-Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z1-Ala^{A21}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z2-Ala^{A21}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z4-Ala^{A21}Gln^{B3}-HI, N^{εB29}-Z3-Ala^{A21}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z1-Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z2-Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z4-Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z3-Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z1-Gln^{B3}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z2-Gln^{B3}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z4-Gln^{B3}Glu^{B30}-HI, N^{εB29}-Z3-Gln^{B3}Glu^{B30}-HI и где Z1 представляет собой тридеканойл, Z2 представляет собой тетрадеканойл, Z3 представляет собой додеканойл, Z4 представляет собой деканойл и HI представляет собой человеческий инсулин.

Согласно определенным вариантам реализации молекула инсулина имеет следующие мутации и/или химические модификации: N^{εB28}-XXXXXX-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{αB1}-XXXXXX-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{αA1}-XXXXXX-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{εB28}-XXXXXX-N^{αB1}-XXXXXX-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{εB28}-XXXXXX-N^{αA1}-XXXXXX-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{αA1}-XXXXXX-N^{αB1}-XXXXXX-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{εB28}-XXXXXX-N^{αA1}-XXXXXX-N^{αB1}-XXXXXX-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{εB29}-XXXXXX-HI, N^{αB1}-XXXXXX-HI, N^{αA1}-XXXXXX-HI, N^{εB29}-XXXXXX-N^{αB1}-XXXXXX-HI, N^{εB29}-XXXXXX-N^{αA1}-XXXXXX-HI, N^{αA1}-XXXXXX-N^{αB1}-XXXXXX-HI, N^{εB29}-XXXXXX-N^{αA1}-XXXXXX-N^{αB1}-XXXXXX-HI, N^{εB29}-YYYYYY-HI, N^{αB1}-YYYYYY-HI, N^{αA1}-YYYYYY-HI, N^{εB29}-YYYYYY-N^{αB1}-YYYYYY-HI, N^{εB29}-YYYYYY-N^{αA1}-YYYYYY-HI, N^{αA1}-YYYYYY-N^{αB1}-YYYYYY-HI, N^{εB29}-YYYYYY-N^{αA1}-YYYYYY-N^{αB1}-YYYYYY-HI, N^{εB28}-YYYYYY-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{εB21}-YYYYYY-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{αA1}-YYYYYY-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{εB28}-YYYYYY-N^{αB1}-YYYYYY-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{εB28}-YYYYYY-N^{αA1}-YYYYYY-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{αA1}-YYYYYY-N^{αB1}-YYYYYY-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, N^{εB28}-YYYYYY-N^{αA1}-YYYYYY-N^{αB1}-YYYYYY-Lys^{B28}Pro^{B29}-HI, и где YYYYYY представляет собой один из ацетила или формила, и где XXXXXX представляет собой один из: пропионила, бутирила, пентаноила, гексаноила, гептаноила, октаноила, нонаноила или деканоила, и HI представляет собой человеческий инсулин.

Как обсуждается в настоящем документе, молекула инсулина может быть конъюгирована посредством реакционноспособного фрагмента, который естественным образом присутствует в структуре инсулина и/или добавлен до конъюгации, включая, например, фрагменты карбоксила или реакционноспособного сложного эфира, амина, гидроксила, альдегида, сульфгидрила, малеимидила, алкинила, азидо и т.д. Инсулин естественным образом включает реакционноспособные альфа-концевые аминные и эпсилон-аминные группы лизина, с которыми может быть ковалентно конъюгирован сложный эфир NHS, изоцианаты и/или изотиоцианаты. Согласно определенным вариантам реализации может применяться модифицированный инсулин, в котором

подходящая аминокислота (например, лизин и/или неприродная аминокислота) была добавлена в аминокислотную последовательность или заменена в ней, чтобы обеспечить альтернативное (например, дополнительное) положение конъюгации в дополнение к модифицированным аминокислотам вариантов реализации, описанных в настоящем документе. Кроме того, следует понимать, что процесс конъюгации можно контролировать путем селективного блокирования или защиты определенных реакционноспособных фрагментов перед конъюгацией. Следует понимать, что инсулин в определенных вариантах реализации может включать любую комбинацию этих модификаций, и настоящее изобретение также охватывает модифицированные формы нечеловеческих инсулинов (например, свиного инсулина, бычьего инсулина, кроличьего инсулина, овечьего инсулина и т. д.), которые включают любую из вышеперечисленных модификаций. Следует понимать, что определенные варианты реализации могут включать эти и некоторые другие описанные ранее модифицированные инсулины, такие как инсулины, описанные в патентах США №№ 5474978; 5461031; 4421685; 7387996; 6869930; 6174856; 6011007; 5866538; 57504976; 906028; 6551992; 6465426; 6444641; 6335316; 6268335; 6051551; 6034054; 5952297; 5922675; 5747642; 5693609; 5650486; 5547929; и 5504188; и заявке на патент США № 2015/0353619, включая неприродные аминокислоты, описанные или упомянутые в настоящем документе, и включая такие модификации нечеловеческих инсулинов, которые описаны в настоящем документе. Также следует понимать, что в определенных вариантах реализации инсулин может быть ковалентно конъюгирован с полимерами полиэтиленгликоля с M_n не более 218000 или ковалентно конъюгирован с альбумином.

Согласно определенным вариантам реализации модифицированный инсулин дополнительно конъюгируют с неборонованным полипептидом с использованием фермента. Согласно определенным вариантам реализации N- или C-концевые остатки пептидного фрагмента могут служить последовательностями распознавания для пептидлигазы, чтобы обеспечить конъюгацию пептида с инсулином, а в некоторых других вариантах реализации инсулин может быть экспрессирован с использованием одной или более дополнительных аминокислот так, что один из концов А- или В-цепи инсулина распознается ферментом, который затем присоединяет представляющий интерес неборонованный полипептид к инсулину. Согласно определенным вариантам реализации полипептид добавляют к С-концу А- и/или В-цепи инсулина с использованием протеинлигазы. Согласно определенным вариантам реализации полипептид добавляют к N-концу А- и/или В-цепи инсулина с использованием протеинлигазы. Согласно определенным вариантам реализации полипептид конъюгируют с модифицированным

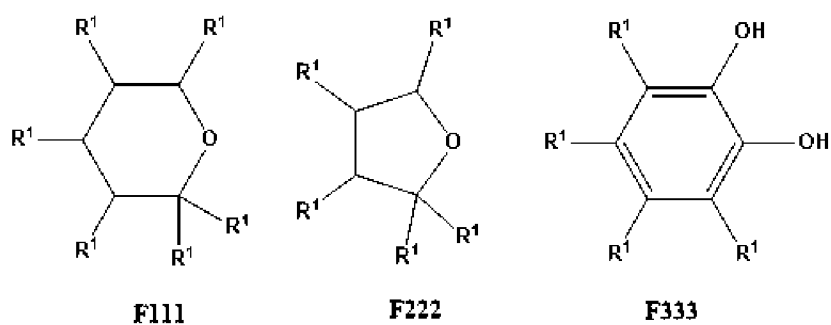
инсулином с использованием протеинлигазы, выбранной из группы, состоящей из сортаз, бутелаз, трипсилигаз, субтилизинов, пептилигаз или ферментов, имеющих по меньшей мере 75% гомологии с этими лигазами. Согласно определенным вариантам реализации это достигается лигированием экспрессированного белка, как описано в: Muir TW, Sondhi D, Cole PA. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(12):6705–6710. Согласно определенным другим вариантам реализации полипептид связывают с модифицированным инсулином с использованием лигирования по Штаудингеру с использованием реакции Штаудингера и как описано, например, в Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. (2000). «Staudinger ligation: A peptide from a thioester and azide». *Org. Lett.* **2** (13): 1939–1941. Согласно определенным другим вариантам реализации полипептид конъюгируют с модифицированным инсулином с использованием лигирования Ser/Thr, например, как описано в: Zhang Y, Xu C, Kam HY, Lee CL, Li X. **2013**, «Protein chemical synthesis by serine/threonine ligation.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 17:6657-6662. Согласно определенным вариантам реализации сама В-цепь имеет менее 32 аминокислот или 34 аминокислот, и согласно определенным вариантам реализации инсулин имеет 4 дисульфидные связи вместо 3.

Ковалентная конъюгация модифицированных инсулинов с пептидом или белком, или синтетическим полимером или самих модифицированных инсулинов, а также молекулярные характеристики могут быть протестированы с помощью ЖХ-МС или анализов сдвига в ДСН-полиакриламидном геле для проверки конъюгации и правильной стехиометрии. Могут быть протестированы различные линкерные химические структуры и функционализация концов. Некоторые из этих линкеров могут содержать ортогональные химические структуры относительно белков, и согласно определенным вариантам реализации линкеры ковалентно соединяют сенсоры вицинального диола с лекарственным веществом, и любые необязательные молекулы, которые дополнительно взаимодействуют с сенсорами вицинального диола, могут быть обеспечены с помощью так называемой клик-химии или ряда подобных биоортогональных химических реакций, например, путем катализируемой медью реакции 3+2 циклоприсоединения (клик-реакции) с использованием соответствующих или подходящих медь-координирующих лигандов, например, как описано: Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V. & Sharpless, K.B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective «ligation» of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2596-2599 (2002). Кроме того, можно использовать конъюгацию концевых азидов с алкиновыми или алкинильными зондами без использования меди, как описано: Liang, Y., Mackey, J.L., Lopez, S.A., Liu, F. & Houk, K.N. Control and design of mutual orthogonality in bioorthogonal cycloadditions. *J. Am. Chem. Soc.*

134, 17904-17907 (2012) и Beatty, K.E. et al. Live-cell imaging of cellular proteins by a strain-promoted azide-alkyne cycloaddition. *Chembiochem* 11, 2092-2095 (2010).

Согласно определенным вариантам реализации дальнейшая модификация соединений согласно настоящему изобретению может включать присоединение химического соединения, содержащего один или более гидроксильных, которые взаимодействуют с сенсорами вицинального диола. Согласно определенным вариантам реализации группы, которые взаимодействуют с сенсорами вицинального диола, включают группы, такие как углеводов, одну или более молекул, содержащих цис-диол, одну или более фосфатных групп, одну или более катехиновых групп, одну или более фарнезильных групп, изофарнезильных групп, группу жирной кислоты или двухосновной кислоты и/или другие диол-содержащие молекулы.

Согласно определенным вариантам реализации лекарственное вещество представляет собой инсулин, и для модуляции профиля ответа сенсоров на уровни глюкозы в организме добавляют дополнительные группы, которые взаимодействуют с сенсорами вицинального диола. Согласно определенным вариантам реализации боковые цепи аминокислот в модифицированных инсулинах содержат одну или более химических структур или белок и/или полипептиды, с которыми конъюгирован модифицированный инсулин, и согласно определенным вариантам реализации одна или более химических структур описаны Формулами F111, F222, F333:



где:

- каждый R^1 может независимо иметь (R) или (S) стереохимию и может быть независимо выбран из H, OR^3 , $N(R^3)_2$, SR^3 , OH, OCH_3 , OR^5 , R^6-R^7 , $NHC(O)CH_3$, CH_2R^3 , $NHC(O)CH_3$, CH_2OH , CH_2OR^5 , NH_2 , R^2 или CH_2R^4 ;
- каждый R^2 независимо выбран из H или необязательно замещенной группы, выбранной из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 5-6-членного моноциклического гетероарильного кольца, имеющего 1-4 гетероатома, выбранных из азота, кислорода или серы, или 4-7 членного гетероциклического кольца, имеющего 1-2 гетероатома, выбранных из азота, кислорода или серы;

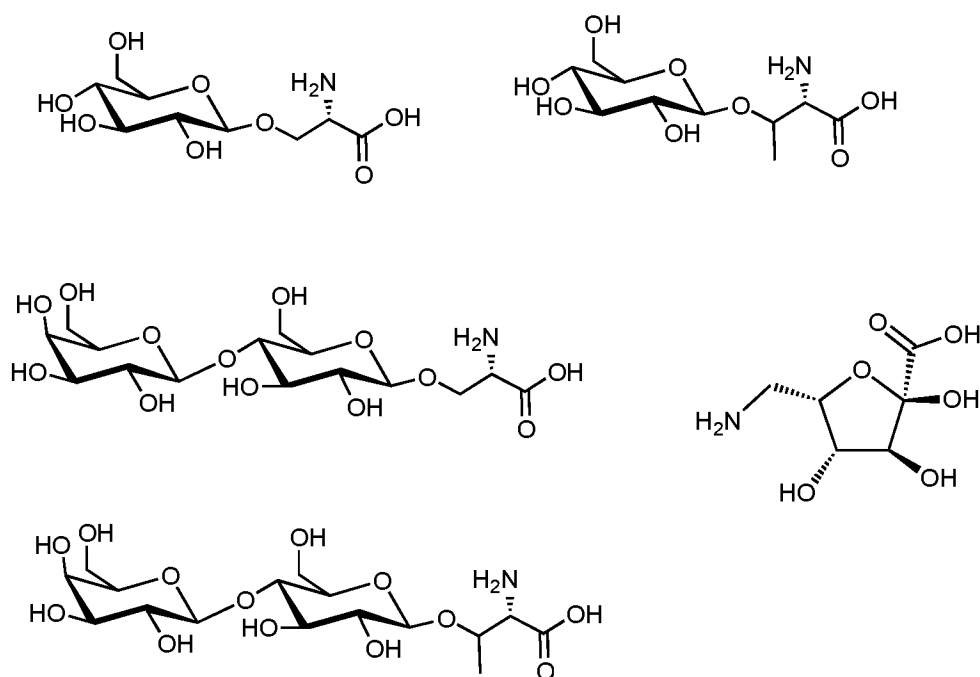
- каждый R^3 независимо выбран из H, ацетила, фосфата, R^2 , SO_2R^2 , $S(O)R^2$, $P(O)(OR^2)_2$, $C(O)R^2$, CO_2R^2 или $C(O)N(R^2)_2$;
- каждый R^4 независимо выбран из H, OH, OR^3 , $N(R^3)_2$, OR^5 или SR^3 ;
- каждый R^5 независимо выбран из моно-, ди- или трисахарида, пентозы или
5 гексозы;
- каждый R^6 независимо выбран из линкера, $NCOCH_2$, OCH_2CH_2 , OC_{1-9} алкилена, замещенного C_{1-9} алкилена, в котором один или более метиленов необязательно замещены $—O—$, $—CH_2—$, $—OCH_2—$, $—N(R^2)C(O)—$, $—N(R^2)C(O)N(R^2)—$, $—SO_2—$, $—SO_2N(R^2)—$, $—N(R^2)SO_2—$, $—S—$, $—N(R^2)—$, $—C(O)—$, $—OC(O)—$, $—C(O)O—$, $—C(O)N(R^2)—$ или $—N(R^2)SO_2N(R^2)—$;
10
- каждый R^7 независимо выбран из $N(R^2)_2$, F, Cl, Br, I, SH, OR^2 , SR^2 , NH_2 , N_3 , $C\equiv CR^2$, $CH_2C\equiv CH$, $C\equiv CH$, CO_2R^2 , $C(O)R^2$ или OSO_2R^2 , $N(R^2)_2$, OR^2 , SR^2 или CH_2NH_2 ; и
- согласно определенным вариантам реализации структуры F111, F222 и F333 могут быть ковалентно конъюгированы посредством различных линкеров с
15 модифицированным инсулином или с лекарственным средством или белком, с которым ковалентно конъюгирован модифицированный инсулин.

Согласно определенным вариантам реализации гликозидная связь, образующаяся в результате соединения $—OR^5$ с аномерным углеродом, может иметь конфигурацию α : «ВНИЗ» или β : «ВВЕРХ». Согласно определенным вариантам реализации
20 модифицированный инсулин смешивают или ковалентно конъюгируют с лекарственным веществом, которое модифицировано в сравнении с его исходной формой, чтобы содержать один или более ковалентных конъюгатов, содержащих, частично или выбранных из нее, группу, состоящую из: аминоэтилглюкозы, аминоэтилбиманнозы, аминоэтилтриманнозы, D-глюкозы, D-галактозы, D-аллозы, D-маннозы, D-гулозы, D-идозы, D-галактозы, N-азиDOMаннозамина (ManNAz) или N-азиДОгалактозамина (GalNAz) или N-азиДОглюкозамина (GlcNAz), 2'-фторрибозы, 2'-дезоксиррибозы, глюкозы, сахарозы, мальтозы, маннозы, их производных (например, глюкозамина, маннозамина, метилглюкозы, метилманнозы, этилглюкозы, этилманнозы и т. д.), сорбита, инозита, галактита, дульцита, ксилита, арабита и/или их комбинаций более высокого порядка
25 (таких как линейная и/или разветвленная биманноза, линейная и/или разветвленная триманноза), молекул, содержащих цис-дио́лы, катехолов, триса, молекул ДОФА, таких как L-ДОФА или L-3,4-дигидроксифенилаланин. Согласно определенным вариантам реализации модифицированный инсулин конъюгирован с катехолом.

Согласно определенным вариантам реализации структуры, представленные F111,
35 F222 и F333, могут быть ковалентно конъюгированы посредством различных линкеров с

модифицированным инсулином или лекарственным веществом, например, посредством амидной связи, одной или более алкильных групп, триазольной связи, необязательного ковалентного линкера или их комбинации.

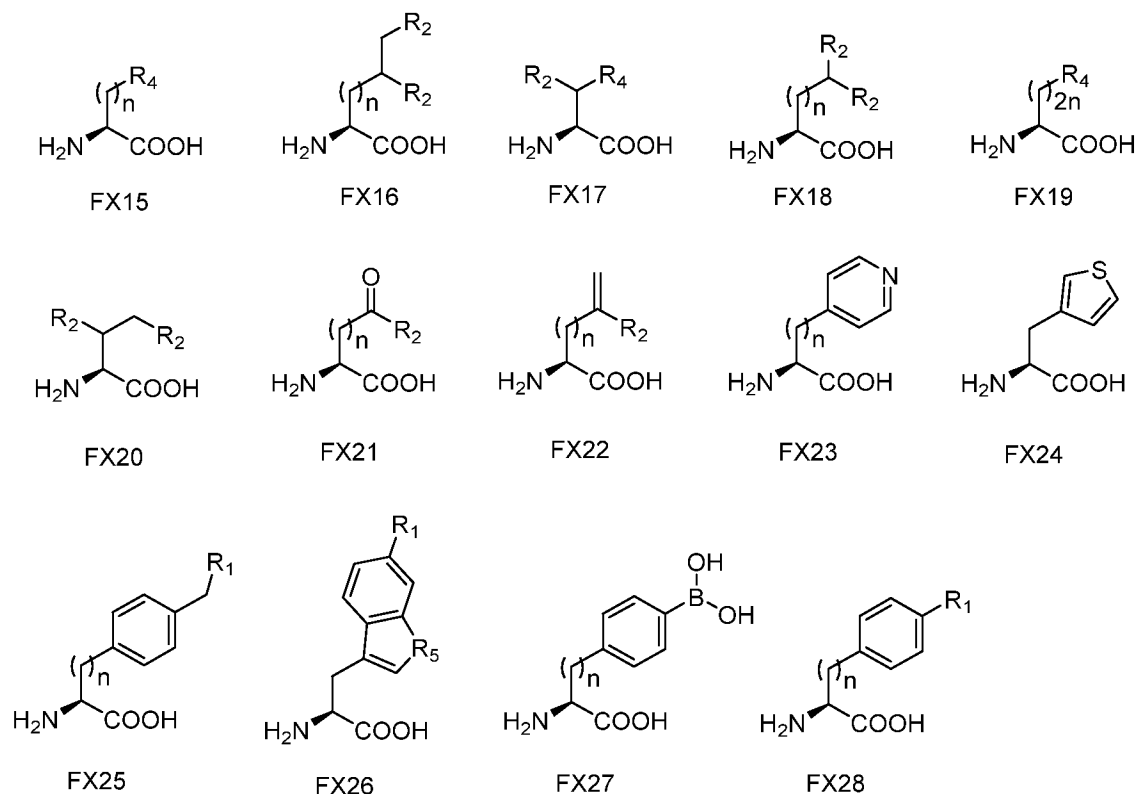
Согласно определенным вариантам реализации модифицированные инсулины, содержащие один или более сенсоров вицинального диола, смешивают или ковалентно конъюгируют с веществом, которое содержит один или более ковалентных конъюгатов, содержащих, частично или выбранных из нее, группу, состоящую из: аминоэтилглюкозы, аминоэтилбиманнозы, аминоэтилтриманнозы, D-глюкозы, D-галактозы, D-аллозы, D-маннозы, D-гулозы, D-идозы, D-талозы, N-азидоманнаномина (ManNAz) или N-азидогалактомина (GalNAz) или N-азидоглюкомина (GlcNAz), 2'-фторрибозы, 2'-дезоксиррибозы, глюкозы, сахарозы, мальтозы, маннозы, их производных (например, глюкозамина, маннозамина, метилглюкозы, метилманнозы, этилглюкозы, этилманнозы и т. д.), сорбита, инозита, галактита, дульцита, ксилита, арабита и/или их комбинаций более высокого порядка (таких как линейная и/или разветвленная биманноза, линейная и/или разветвленная триманноза), молекул, содержащих цис-диола, катехолов, триса, молекул ДОФА, таких как L-ДОФА или L-3,4-дигидроксифенилаланин. Согласно определенным вариантам реализации модифицированный инсулин содержит аминокислоты, включая:



Согласно определенным вариантам реализации модифицированный инсулин, содержащий один или более сенсоров вицинального диола, конъюгирован с модифицированной глюкозой, такой как азидоглюкоза. Например, М-азидо-М-дезоксид-глюкоза, где М представляет собой одно из 1, 2, 3, 4, 5, 6. Согласно определенным вариантам реализации азидосодержащий сахар можно связать, например, посредством

клик-химии, с концевым алкином (такой концевой алкин может присутствовать, например, в виде боковой цепи аминокислоты, такой как L-гомопропаргилглицин, или другой аминокислоты, описанной в настоящем документе, с алкиновыми боковыми цепями). Азидная группа на сахаре может быть связана с алкиновой группой, например, посредством катализируемой медью клик-реакции, с образованием триазольной связи, или может быть связана с циклооктином, который согласно определенным вариантам реализации сам по себе связан с боковой цепью аминокислоты. Согласно определенным вариантам реализации модифицированный инсулин может взаимодействовать сам по себе или посредством ковалентной модификации, такой как ковалентная конъюгация с жирным ацилом или жирной двухосновной кислотой, с альбумином в крови, и согласно определенным вариантам реализации аффинность этого взаимодействия можно модулировать на основе глюкозы. Согласно определенным вариантам реализации инсулин смешивают как часть фармацевтически приемлемого носителя, включающего полимер сахаров, полимер, содержащий диолы, и/или полисахарид.

Согласно определенным вариантам реализации одна или более искусственных аминокислот могут быть включены в модифицированный инсулин или линкеры, соединенные со структурой сенсоров вицинального диола. Существует 20 различных природных (канонических) аминокислот, которые являются строительными блоками всех природных белков. Неканонические аминокислоты или искусственные аминокислоты имеют боковые цепи, которые отличаются от канонических аминокислот и обычно не присутствуют в белках. Встраивание искусственных аминокислот в рекомбинантные белки и/или синтезированные пептиды позволяет вводить химические группы, которые можно селективно функционализировать и модифицировать. Это особенно полезно для разработки модифицированных инсулинов, поскольку позволяет осуществлять селективные химические модификации инсулина в установленных положениях в белковой последовательности. Согласно определенным вариантам реализации искусственные аминокислоты могут быть использованы в модифицированном инсулине для модуляции рКа, локальной гидрофобности белковых доменов, а также свойств агрегации и укладки или для введения новых химических структур и/или химических и/или физических свойств, включая термостабильность, агрегационное поведение, стабильность в растворе, снижение агрегации, изменения конформации и/или перемещения А- и В-цепей инсулина относительно друг друга. Согласно определенным вариантам реализации в модифицированном инсулине можно использовать одну или более из следующих искусственных аминокислот, описанных Формулами FX15-28:



где

каждый R_1 независимо выбран из H, NH_2 , NO_2 , Cl, CF_3 , I, $COCH_3$, CN, $C\equiv CH$, N_3 или Br;

- 5 каждый R_2 независимо выбран из NH_2 , CF_3 , H или CH_3 ;
- a. каждый R_3 независимо выбран из $C\equiv CH$, H, N_3 или винильной группы
 - b. каждый R_4 независимо выбран из NH_2 , R_2 или R_3
 - c. каждый R_5 независимо выбран из S или NH
 - d. индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4,
- 10 причем индекс j представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14, и
- к представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14.

Кроме того, согласно определенным вариантам реализации одну или более из ранее опубликованных протеогенных или непротеогенных искусственных аминокислот можно применять как часть структуры, соединяющей сенсор вицинального диола с

15 лекарственным веществом, и/или как часть лекарственного вещества, причем если лекарственное вещество представляет собой инсулин или другие пептиды, искусственная аминокислота может присутствовать в инсулине или пептидах. Например, согласно определенным вариантам реализации можно использовать одну или более из следующих искусственных аминокислот на основании способов, описанных и упомянутых в тексте, а

20 также перечня аминокислот, приведенного в: Liu, C. C.; Schultz, P. G. (2010). «Adding new chemistries to the genetic code». Annual Review of Biochemistry 79: 413–44. Согласно

определенным вариантам реализации искусственные аминокислоты могут быть включены путем пептидного синтеза, и они включают аминокислоты, упомянутые в настоящем документе, а также описанные ранее непротеиногенные аминокислоты. Например, но не ограничиваясь этим, набор таких непротеиногенных аминокислот, включая β -аминокислоты, коммерчески доступен от Sigma Aldrich и включает такие аминокислоты как 2,3-диаминопропиновая кислота, 2,4-диаминопропиновая кислота, орнитин, любая бета- или альфа-аминокислота. Например, протеиногенные искусственные аминокислоты, описанные в F26-F41, могут быть включены посредством экспрессии рекомбинантного белка с использованием способов и подходов, описанных в патентах США и заявках на патент №№, включая: US2008/0044854, US8518666, US8980581, US2008/0044854, US2014/0045261, US2004/0053390, US7229634, US8236344, US2005/0196427, US2010/0247433, US7198915, US7723070, US2002/0042097, US2004/0058415, US2008/0026422, US2008/0160609, US2010/0184193, US2012/0077228, US2014/025599, US7198915, US7632492 и US7723070, а также другие протеиногенные искусственные аминокислоты могут быть введены рекомбинантно с использованием способов и подходов, описанных в: US7736872, US7816320, US7829310, US7829659, US7883866, US8097702 и US8946148.

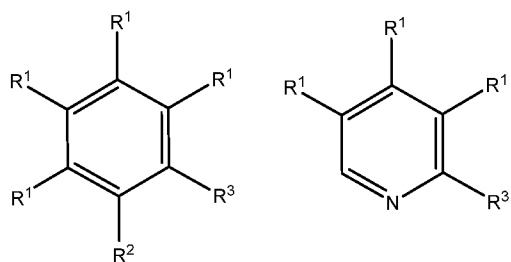
Согласно определенным вариантам реализации циклическая аминокислота, такая как 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин, азиридин-2-карбоновая кислота, азетидин-2-карбоновая кислота, пиперидин-2-карбоновая кислота, 3-карбоксиморфолин, 3-карбокситиаморфолин, 4-оксапролин, пироглутаминовая кислота, 1,3-оксазолидин-4-карбоновая кислота, 1,3-тиазолидин-4-карбоновая кислота, 3-тиапролин, 4-тиапролин, 3-селенопролин, 4-селенопролин, 4-кетопролин, 3,4-дегидропролин, 4-аминопролин, 4-фторпролин, 4,4-дифторпролин, 4-хлорпролин, 4,4-дихлорпролин, 4-бромпролин, 4,4-дибромпролин, 4-метилпролин, 4-этилпролин, 4-циклогексилпролин, 3-фенилпролин, 4-фенилпролин, 3,4-фенилпролин, 4-азидопролин, 4-карбоксипролин, а-метилпролин, а-этилпролин, а-пропилпролин, а-аллилпролин, а-бензилпролин, а-(4-фторбензил)пролин, а-(2-хлорбензил)пролин, а-(3-хлорбензил)пролин, а-(2-бромбензил)пролин, а-(4-бромбензил)пролин, а-(4-метилбензил)пролин, а-(дифенилметил)пролин, а-(нафтилметил)-пролин, D-пролин или L-гомопролин, (2S,4S)-4-фтор-L-пролин, (2S,4R)-4-фтор-L-пролин, (2S)-3,4-дегидро-L-пролин, (2S,4S)-4-гидрокси-L-пролин, (2S,4R)-4-гидрокси-L-пролин, (2S,4S)-4-азидо-L-пролин, (2S)-4,4-дифтор-L-пролин, (2S)-азетидин-2-карбоновая кислота, (2S)-пиперидин-2-карбоновая кислота или (4R)-1,3-тиазолидин-4-карбоновая кислота могут быть использованы в модифицированном инсулине.

Следует понимать, что согласно определенным вариантам реализации заданная или конкретная ориентация аминокислот достигается путем синтеза модифицированного инсулина с использованием, например, методов Albericio, F. (2000). Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide (1 ed.). Boca Raton: CRC Press. P. 848.

Согласно определенным вариантам реализации модифицированный инсулин может связываться с диолом, катехолом, гексозным сахаром, глюкозой, ксилозой, фукозой, галактозамином, глюкозамином, маннозамином, галактозой, маннозой, фруктозой, галактуроновой кислотой, глюкуроновой кислотой, идуроновой кислотой, маннуровой кислотой, ацетилгалактозамином, ацетилглюкозамином, ацетилманнозамином, ацетилмуравовой кислотой, 2-кето-3-дезоксиглицерогалактононовой кислотой, ацетилнейраминовой кислотой, гликолилнейраминовой кислотой, нейротрансмиттером, дофамином и/или дисахаридом, и/или полимером сахаридов и/или диолов.

Согласно определенным вариантам реализации заданные или конкретные модифицированные инсулины, которые связываются с белками, представляющими интерес (или молекулами, представляющими интерес), или обладают представляющими интерес биофизическими характеристиками, включая связывание и чувствительность к малым молекулам, представляющим интерес, могут быть получены путем скрининга библиотек модифицированных инсулинов, которые экспрессируются рекомбинантно и химически модифицированы и/или химически синтезированы с использованием стандартного синтеза аминокислот с защитой FMOC или Boc на твердой подложке.

Согласно определенным вариантам реализации модифицированный инсулин дополнительно конъюгирован с химической структурой, описанной следующими структурами:

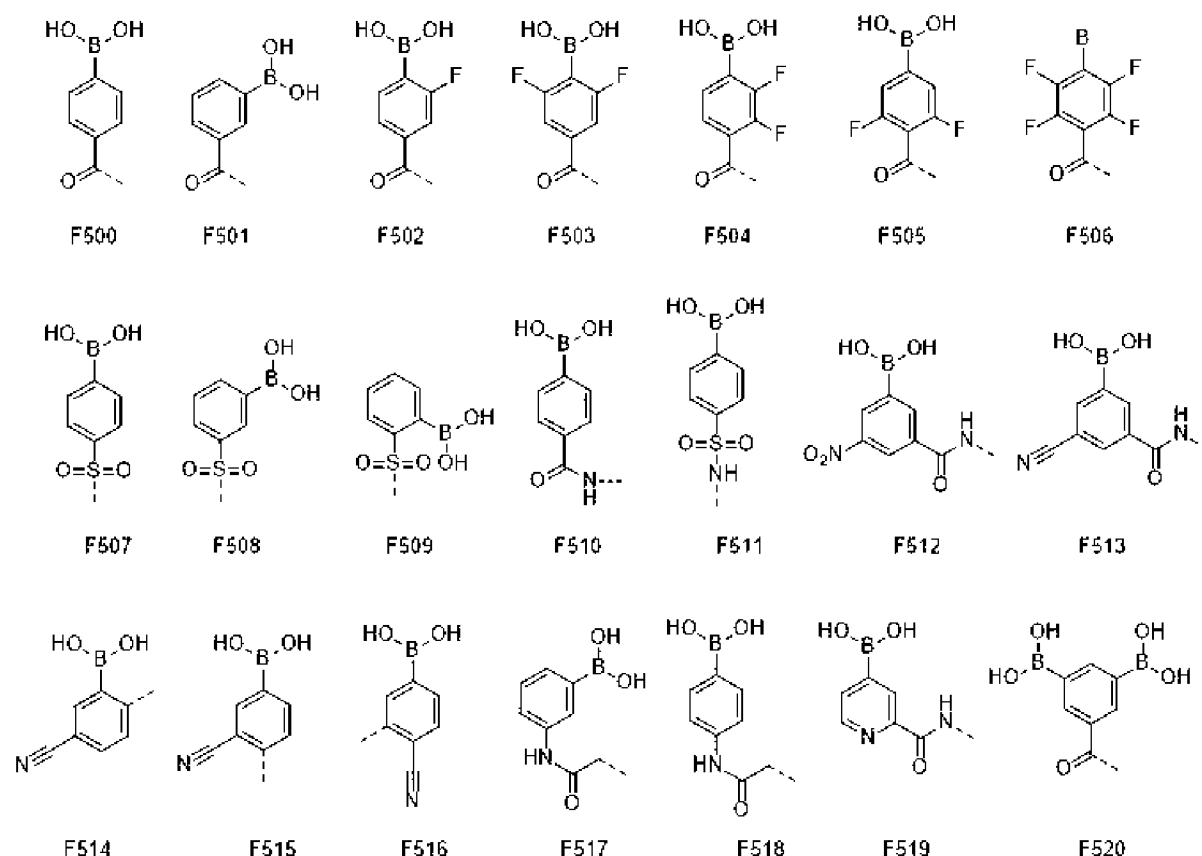


где:

- каждый R^1 независимо выбран из H, F, Cl, CH_3 , $B(OH)_2$, $C\equiv N$, NO_2 , R^4 или две соседние группы R^1 представляют собой CH_2-O--- и $B(OH)---$, где --- представляет собой связь между двумя соседними группами R^1 ;
- каждый R^2 независимо выбран из H, $C\equiv N$, $(SO_2)NH(R^4)$ или R^4 ;
- каждый R^3 независимо выбран из $C\equiv N$, $CONH(R^4)$, $NH(R^4)$, $(SO_2)NH(R^4)$ или R^4 ;
- каждый R^4 независимо выбран из H, N_3 , $C\equiv CH$, $-CH_2N(R^5)$ или линкера; и

- каждый R⁵ независимо выбран из H или линкера, который ковалентно соединяет структуру с боковой цепью аминокислоты, такой как боковая цепь лизина, например, посредством амидной связи с эpsilon-амином лизина.

Согласно определенным вариантам реализации модифицированный инсулин или лекарственное вещество, с которым конъюгирован сенсор вицинального диола, могут быть дополнительно ковалентно конъюгированы с использованием амидных связей со структурами, описанными Формулами F500-F520 ниже:



Согласно определенным вариантам реализации такие модификации могут включать использование группы N-метилиминодиуксусной кислоты (MIDA) для получения бороната, конъюгированного с MIDA, или бороната MIDA, и такие модификации могут быть использованы во время приготовления боронатов для получения готовых структур для применения. Согласно определенным вариантам реализации сложные эфиры бороновой кислоты и пинакола используют для получения готовых структур, причем указанная пинаколовая группа может быть легко удалена специалистом в данной области техники. MIDA-защищенные боронатные сложные эфиры просты в обращении, стабильны на воздухе, совместимы с хроматографией и нереакционноспособны в стандартных безводных условиях кросс-сочетания, и защита может быть легко снята при комнатной температуре в мягких водно-щелочных условиях,

таких как 1 M NaOH или даже NaHCO₃, или как описано Lee, S. J. et al. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 466.

Биологический механизм, с помощью которого инсулин дикого типа связывается с рецептором инсулина, описан ранее в Nature 493, 241-245 (2013); Menting, J.G. et al. Protective hinge in insulin opens to enable its receptor engagement. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, E3395-3404 (2014). Согласно определенным вариантам реализации связывание глюкозы с вицинальными диолами на модифицированном инсулине можно использовать для модуляции биодоступности инсулина, его растворимости и/или его способности взаимодействовать с рецептором инсулина. Активность такого инсулина можно измерить, например, но не ограничиваясь этим, используя *in vitro* связывание рецептора инсулина с человеческим TyrA14-¹²⁵I инсулином в качестве индикатора и используя гранулы для связывания антител вместе с моноклональным антителом к рецептору инсулина. Согласно одному или более вариантам реализации модели на животных могут быть использованы для оценки активности инсулина *in vivo*, в том числе во время провокации глюкозой, с использованием способов, которые легко понятны для специалиста в данной области техники. Согласно определенным вариантам реализации модифицированные инсулины дополнительно модифицируют или конструируют для связывания с транспортером глюкозы так, что изменения концентраций растворимой глюкозы могут модулировать аффинность, с которой модифицированные инсулины связываются с транспортером глюкозы. Согласно определенным вариантам реализации модифицированные инсулины могут связываться в организме с малыми молекулами, вводимыми перорально, и согласно определенным вариантам реализации такое связывание можно применять для модуляции активности модифицированных инсулинов. Согласно определенным вариантам реализации модифицированный инсулин может быть присоединен к другому белку и/или лекарственному средству, которое прямо или опосредовано влияет на уровень глюкозы в крови и/или метаболизм в организме. Помимо инсулина, согласно определенным вариантам реализации сенсоры вицинального диола конъюгированы с пептидным и/или инкретиновым гормоном, выбранным из группы, состоящей из глюкагона, ГПП-1, аналога ГПП-1, агониста рецептора ГПП-1, ИФР-1, амилина и релаксина. Согласно определенным вариантам реализации инсулин и/или упомянутые инкретины содержат по меньшей мере одну структуру, описанную Формулами I, II или III. Согласно определенным вариантам реализации инсулин содержит по меньшей мере две структуры, каждая из которых независимо описана Формулами I, II или III. Согласно определенным вариантам реализации по меньшей мере одна пептидная последовательность, включающая от 2 до 20

аминокислот, может быть независимо добавлена или устранена (удалена) из А-цепи и/или В-цепи инсулина.

Согласно определенным вариантам реализации модифицированный инсулин частично или полностью экспрессируется в виде рекомбинантного белка, и боковые цепи, соответствующие Формулам I-VI, вводятся в боковые цепи существующих аминокислот, таких как лизин, посредством химической модификации. Способы экспрессии инсулина в *E. coli* известны и могут быть легко выполнены специалистом в данной области техники с использованием процедур, описанных в Jonasson, Eur. J. Biochem. 236:656-661 (1996); Cowley, FEBS Lett. 402:124- 130 (1997); Cho, Biotechnol. Bioprocess Eng. 6: 144- 149 (2001); Tikhonov, Protein Exp. Pur. 21: 176-182 (2001); Malik, Protein Exp. Pur 55: 100-111 (2007); Min, J. Biotech. 151:350-356 (2011)). В наиболее распространенном способе белок экспрессируется в виде одноцепочечной конструкции проинсулина с белком разделения или аффинной меткой. Модифицированный инсулин может быть экспрессирован как часть проинсулина, затем химически модифицирован для конъюгации посредством амидных связей с боронатами, представляющими интерес. Этот подход обеспечивает хороший выход и снижает экспериментальную сложность за счет уменьшения числа этапов процессинга и позволяет выполнять повторную укладку, подобную нативной; см., например, Jonasson, Eur. J. Biochem. 236:656-661 (1996); Cho, Biotechnol. Bioprocess Eng. 6: 144- 149 (2001); Tikhonov, Protein Exp. Pur. 21 : 176-182 (2001); Min, J. Biotech. 151 :350-356 (2011)). При экспрессии в *E. coli* проинсулин обычно обнаруживается в тельцах включения и может быть легко очищен специалистом в данной области техники.

Согласно определенным вариантам реализации модифицированный инсулин, содержащий один или более сенсоров вицинального диола, может быть изготовлен для инъекций. Например, он может быть изготовлен для инъекции субъекту, такому как человек, композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, такую как стерильная фармацевтическая композиция для инъекций. Композиция может быть изготовлена для подкожной инъекции. Согласно определенным вариантам реализации композиция изготовлена для чрескожного, внутрикожного, чресслизистого, назального, ингаляционного или внутримышечного введения. Композиция может быть изготовлена в виде пероральной лекарственной формы или легочной лекарственной формы. Фармацевтические композиции, пригодные для инъекции, могут включать стерильные водные растворы, содержащие, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит и сорбит, фенол, метакрезол, хлорид натрия, и дисперсии могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах, и носитель может представлять собой, например, растворитель или дисперсионную среду,

содержащую, например, воду, сахараиды, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и/или их подходящие смеси. Специалисту в данной области техники известно, что заданные или конкретные составы могут быть разработаны для наилучшего соответствия применению и способу применения

5 модифицированных инсулинов согласно настоящему изобретению. Общие соображения по составлению и изготовлению фармацевтических композиций, путям введения и включению подходящих фармацевтически приемлемых носителей можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1995. Согласно определенным вариантам реализации фармацевтическая композиция

10 может включать цинк, т.е. Zn^{2+} и/или полисахариды. Некоторые составы цинка, например, описаны в патенте США № 9034818. Например, фармацевтическая композиция может включать цинк в молярном отношении к модифицированному инсулину примерно M:N, где M равно 1-11, и N равно 6-1. Согласно определенным вариантам реализации такие модифицированные инсулины могут храниться в насосе, и этот насос, будь то внешний

15 или внутренний по отношению к телу, высвобождает модифицированные инсулины. В некоторых случаях насос можно применять для высвобождения постоянного количества модифицированных инсулинов, причем указанный инсулин чувствителен к глюкозе на основе сенсора вицинального диола на указанном инсулине и может автоматически корректировать активность в зависимости от уровня глюкозы в крови или скорости

20 высвобождения из места инъекции. В некоторых случаях композиции могут быть изготовлены в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и единообразия дозировки. В некоторых случаях фармацевтическая композиция может дополнительно включать второй тип инсулина, который обеспечивает быстросействующий или базальный инсулин в дополнение к эффекту, обеспечиваемому

25 модифицированным инсулином.

В другом аспекте настоящее изобретение включает наборы, причем указанный набор включает модифицированные инсулины, которые содержат сенсоры вицинального диола, а также фармацевтически приемлемый носитель, и для инъекций может включать шприц или шприц-ручку. Согласно различным вариантам реализации набор может

30 включать шприц или шприц-ручку, предварительно заполненный фармацевтической композицией, которая включает модифицированный инсулин вместе с жидким носителем. Согласно определенным вариантам реализации набор может включать отдельный контейнер, такой как флакон, содержащий фармацевтическую композицию, которая включает модифицированный инсулин вместе с сухим носителем, и пустой шприц или

35 шприц-ручку. Согласно определенным вариантам реализации такой набор может

включать отдельный контейнер с жидким носителем, который можно использовать для восстановления данной композиции, которую затем можно набрать в шприц или шприц-ручку. Согласно определенным вариантам реализации набор может включать инструкции. Согласно определенным вариантам реализации набор может включать устройства для измерения уровня глюкозы в крови, которые либо локально, либо дистанционно рассчитывают соответствующую или подходящую дозу модифицированного инсулина, которая должна быть введена путем инъекции в определенный момент времени или через равные промежутки времени. Такой режим дозирования уникален для пациента и может быть обеспечен, например, как инструкция по программированию насоса человеком или компьютером. Набор может включать электронное устройство, которое передает измерения уровня глюкозы в крови на второй компьютер, локально или в другом месте (например, в облаке), который затем рассчитывает правильное количество модифицированного инсулина, которое должно быть использовано пациентом в определенное время.

Согласно некоторым аспектам варианты реализации настоящего изобретения относятся к способу лечения заболевания или состояния у субъекта, включающему введение указанному субъекту композиции, включающей модифицированный инсулин, описанный в настоящем документе, причем указанный инсулин содержит сенсоры вицинального диола, чувствительные к глюкозе. В некоторых случаях заболевание или состояние может представлять собой гипергликемию, диабет 2 типа, нарушение толерантности к глюкозе, диабет 1 типа, ожирение, метаболический синдром X или дислипидемию, диабет во время беременности, предиабет, болезнь Альцгеймера, диабет MODY 1, MODY 2 или MODY 3, расстройства настроения и/или психические расстройства. Следует понимать, что этот комбинированный подход также можно применять у пациентов с резистентностью к инсулину, которые получают сенситизатор инсулина или вторичное лекарственное средство для лечения диабета (такое как, например, бигуанид, такой как метформин, глитазон) или/и стимулятор секреции инсулина (такой как, например, сульфонилмочевина, ГПП-1, эксендин-4 и т.д.) и/или амилин.

Модифицированный инсулин согласно настоящему изобретению может быть введен пациенту, который получает по меньшей мере одну дополнительную терапию или принимает по меньшей мере одно дополнительное лекарственное средство или терапевтический белок. По меньшей мере одна дополнительная терапия предназначена для лечения того же заболевания или расстройства, для лечения которого вводят модифицированный инсулин. Согласно определенным вариантам реализации по меньшей

мере одна дополнительная терапия предназначена для лечения побочного эффекта модифицированного инсулина. Временные рамки двух видов терапии могут различаться или могут быть одинаковыми, их можно вводить по одному и тому же или по разным графикам до тех пор, пока существует период, когда пациент получает пользу от обоих видов терапии. Два или более видов терапии могут быть введены в одном и том же или разных составах до тех пор, пока существует период, когда пациент получает пользу от обоих видов терапии. Любой из этих подходов можно применять для введения субъекту более чем одного противодиабетического лекарственного средства.

Согласно одному или более вариантам реализации будет применяться терапевтически эффективное количество модифицированного инсулина, которое представляет собой подходящее или достаточное количество для лечения (имеется в виду, например, для облегчения симптомов, отсрочки прогрессирования, предотвращения или отсрочки рецидива, отсрочки начала) заболевания или состояния при разумном соотношении пользы и риска. Это может включать поиск баланса между эффективностью и дополнительной безопасностью и токсичностью. Под дополнительной безопасностью, например, подразумевается, что модифицированный инсулин может быть чувствительным к изменениям уровня глюкозы в крови или уровня других молекул, к которым чувствителен пептид, даже если пациент активно не отслеживает уровни этой молекулы, например, уровень глюкозы в крови в определенный период времени, например, во время сна. В целом, терапевтическую эффективность и токсичность можно определить с помощью стандартных фармакологических процедур в клеточных культурах или *in vivo* на экспериментальных животных и, например, путем измерения ED₅₀ и LD₅₀ для терапевтического индекса лекарственного средства. Согласно различным вариантам реализации средняя суточная доза инсулина с модифицированным инсулином находится в диапазоне от 5 до 400 Ед. (например, 30-150 Ед., где 1 Ед. инсулина составляет примерно 0,04 мг). Согласно определенным вариантам реализации некоторое количество модифицированного инсулина вводят ежедневно или каждые два дня, или каждые три дня, или каждые 4 дня. Согласно определенным вариантам реализации основа определяется алгоритмом, который может быть рассчитан компьютером. Согласно определенным вариантам реализации количество модифицированного инсулина, превышающее эти дозы в 5-10 раз, вводят еженедельно или через равные промежутки времени. Согласно определенным вариантам реализации количество модифицированного инсулина, превышающее эти дозы в 10-20 раз, вводят раз в две недели или через равные промежутки времени. Согласно определенным вариантам реализации количество модифицированного инсулина, превышающее эти дозы в 20-40 раз, вводят ежемесячно.

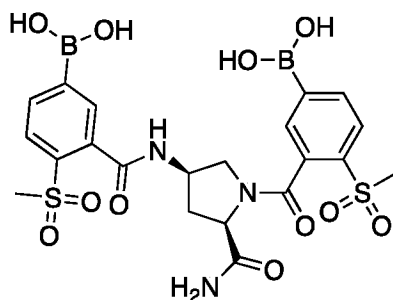
Следующие примеры и экспериментальные данные представлены только в иллюстративных целях и не ограничивают объем вариантов реализации настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

5 Получение низкомолекулярных сенсоров диола и модифицированных инсулинов.

Пример 1

(3-((2R,4R)-4-(5-бороно-2-(метилсульфонил)бензамидо)-2-карбамоилпирролидин-1-карбонил)-4-(метилсульфонил)фенил)бороновая кислота



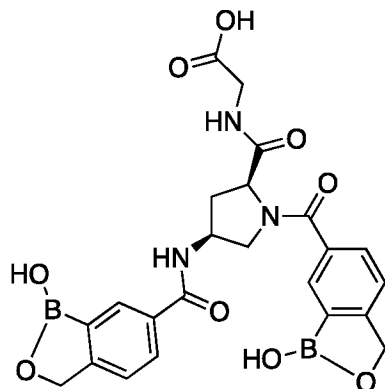
10 Синтез Примера 1:

Амидную смолу Ринка (1,2 ммоль/экв., 150 мг) подвергали набуханию в ДМФА (5 мл) в течение 20 минут. Раствор удаляли в потоке азота, и к смоле добавляли раствор 20% пиперидина в ДМФА (5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл). Раствор (2R,4R)-1-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-4-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)пирролидин-2-карбоновой кислоты (280 мг, 0,5 ммоль) с гексафторфосфатом 1-[бис(диметиламино)метиле]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния 3-оксида (НАТУ, 190 мг, 0,5 ммоль) и DIPEA (200 мкл) в ДМФА (5 мл) добавляли к смоле и перемешивали при 50°C в течение 20 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), и к смоле добавляли раствор 20% пиперидина в ДМФА (5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), и к смоле добавляли раствор 5-бороно-2-(метилсульфонил)бензойной кислоты (244 мг, 1 ммоль) с НАТУ (380 мг, 1 ммоль) и DIPEA (200 мкл) в ДМФА (5 мл) и перемешивали при 50°C в течение 30 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), а затем ДХМ (2×5 мл). К смоле добавляли раствор трифторуксусной кислоты с триизопропилсиланом и водой (95:2,5:2,5, 5 мл) и перемешивали в течение 90 минут. Раствор собирали и высушивали в вакууме, растворяли в ДМСО (100 мкл) и фракционировали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (ОФ) на колонке C18 с градиентом от 20% АСН в воде с 0,1% ТФУ до 60% АСН в воде с 0,1% ТФУ в течение 10 минут. Чистые фракции выделяли, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением Примера 1 в виде белого порошка (20 мг). Ожидаемая масса [M+H]: 582,11; Наблюдаемая [M+H]: 582,07

ФИГ. 1 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 1.

Пример 2

((2S,4S)-1-(1-гидрокси-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбонил)-4-(1-гидрокси-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоксамидо)пирролидин-2-карбонил)глицин



Синтез Примера 2:

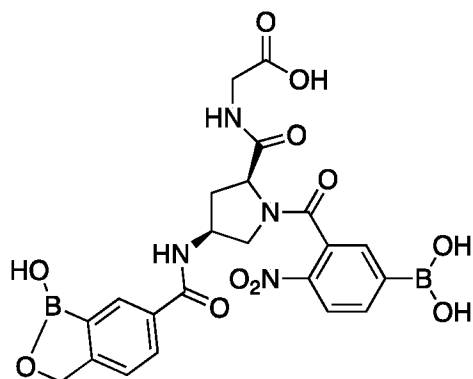
Хлортритиловую смолу (1,5 ммоль/экв., 300 мг) подвергали набуханию в сухом ДХМ (5 мл) в течение 30 минут. Растворитель удаляли в потоке азота и немедленно добавляли раствор Fmoc-глицина (0,5 М) в ДХМ с DIPEA (1 М) и осторожно перемешивали в течение 1 часа. Смесь промывали ДХМ и непрореагировавшие сайты кэпировали раствором 20% MeOH в растворе ДХМ и DIEA (1 М) и перемешивали в течение 1 часа. Смолу промывали ДХМ (2×5 мл), а затем ДМФА (2×5 мл). Раствор удаляли в потоке азота, и к смоле добавляли раствор 20% пиперидина в ДМФА (5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл). Раствор (2*R*,4*R*)-1-(((9*H*-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-4-(((9*H*-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)аминопирролидин-2-карбоновой кислоты (280 мг, 0,5 ммоль) с гексафторфосфатом 1-[бис(диметиламино)метиле]-1*H*-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиния 3-оксида (HATU, 190 мг, 0,5 ммоль) и DIPEA (200 мкл) в ДМФА (5 мл) добавляли к смоле и перемешивали при 50°C в течение 20 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), к смоле добавляли раствор 20% пиперидина в ДМФА (5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), и к смоле добавляли раствор 1-гидрокси-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоновой кислоты (177 мг, 1 ммоль) с HATU (380 мг, 1 ммоль) и DIPEA (200 мкл) в ДМФА (5 мл) и перемешивали при 50°C в течение 30 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), а затем ДХМ (3×5 мл). К смоле добавляли раствор трифторуксусной кислоты с триизопропилсилианом и водой (95:2,5:2,5, 5 мл) и перемешивали в течение 90 минут. Раствор собирали и высушивали в вакууме, растворяли в ДМСО (100 мкл) и фракционировали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (ОФ) на колонке C18 с градиентом от 20% ACN в воде с 0,1% ТФУ до 60% ACN в

воде с 0,1% ТФУ в течение 10 минут. Чистые фракции выделяли, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением Примера 2 в виде белого порошка (27 мг). Ожидаемая масса [M+H]: 508,16; Наблюдаемая [M+H]: 508,13

ФИГ. 2 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 2.

Пример 3

((2S,4S)-1-(5-бороно-2-нитробензоил)-4-(1-гидрокси-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоксамидо)пирролидин-2-карбонил)глицин



Синтез Примера 3.

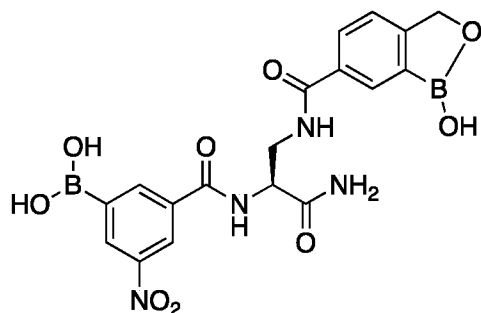
Хлортритиловую смолу (1,5 ммоль/экв., 300 мг) подвергали набуханию в сухом ДХМ (5 мл) в течение 30 минут. Растворитель удаляли в потоке азота и немедленно добавляли раствор Fmoc-глицина (0,5 М) в ДХМ с DIPEA (1 М) и осторожно перемешивали в течение 1 часа. Смесь промывали ДХМ и непрореагировавшие сайты кэпировали раствором 20% MeOH в растворе ДХМ и DIEA (1 М) и перемешивали в течение 1 часа. Смолу промывали ДХМ (2×5 мл), а затем ДМФА (2×5 мл). Раствор удаляли в потоке азота, и к смоле добавляли раствор 20% пиперидина в ДМФА (5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл). К смоле добавляли раствор (2R,4R)-1-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-4-((1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогексилиден)этил)амино)пирролидин-2-карбоновой кислоты (258 мг, 0,5 ммоль) с гексафторфосфатом 1-[бис(диметиламино)метиле]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния 3-оксида (HATU, 190 мг, 0,5 ммоль) и DIPEA (200 мкл) в ДМФА (5 мл) и перемешивали при 50°C в течение 20 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), и к смоле добавляли раствор 20% пиперидина в ДМФА (5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), и к смоле добавляли раствор 5-бороно-2-нитробензойной кислоты (105 мг, 0,5 ммоль) с HATU (190 мг, 0,5 ммоль) и DIPEA (200 мкл) в ДМФА (5 мл) и перемешивали при 50°C в течение 30 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), и к смоле добавляли раствор 4% гидразина в ДМФА (3×5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), и к смоле добавляли

раствор 1-гидрокси-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоновой кислоты (89 мг, 0,5 ммоль) с HATU (190 мг, 0,5 ммоль) и DIPEA (200 мкл) в ДМФА (5 мл) и перемешивали при 50°C в течение 30 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), а затем ДХМ (3×5 мл). К смоле добавляли раствор трифторуксусной кислоты с триизопропилсиланом и водой (95:2,5:2,5, 5 мл) и перемешивали в течение 90 минут. Раствор собирали и высушивали в вакууме, растворяли в ДМСО (100 мкл) и фракционировали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (ОФ) на колонке C18 с градиентом от 20% ACN в воде с 0,1% ТФУ до 60% ACN в воде с 0,1% ТФУ в течение 10 минут. Чистые фракции выделяли, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением Примера 3 в виде белого порошка (15 мг). Ожидаемая масса [M+H]: 541,15; Наблюдаемая [M+H]: 541,13

ФИГ. 3 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 3.

Пример 4

(S)-(3-((1-амино-3-(1-гидрокси-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоксамидо)-1-оксопропан-2-ил)карбамоил)-5-нитрофенил)бороновая кислота



Синтез Примера 4:

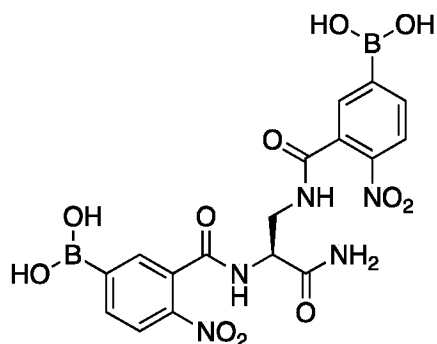
Амидную смолу Ринка (1,2 ммоль/экв., 150 мг) подвергали набуханию в ДМФА (5 мл) в течение 20 минут. Раствор удаляли в потоке азота, и к смоле добавляли раствор 20% пиперидина в ДМФА (5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл). К смоле добавляли раствор Fmoc-N^B-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-метилбутил-L-2,3-диаминопропионовой кислоты (266 мг, 0,5 ммоль) с гексафторфосфатом 1-[бис(диметиламино)метиле́н]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния-3-оксида (HATU, 190 мг, 0,5 ммоль) и DIPEA (200 мкл) в ДМФА (5 мл) и перемешивали при 50°C в течение 20 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), и к смоле добавляли раствор 20% пиперидина в ДМФА (5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), и к смоле добавляли раствор 20% пиперидина в ДМФА (5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), и к смоле добавляли раствор 3-бороно-5-нитробензойной кислоты (105 мг, 0,5 ммоль) с HATU (190 мг, 0,5 ммоль) и DIPEA (200 мкл) в ДМФА (5 мл) и перемешивали при 50°C в течение 30 минут.

Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), к смоле добавляли раствор 4% гидразина в ДМФА (3×5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), и к смоле добавляли раствор 1-гидрокси-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоновой кислоты (89 мг, 0,5 ммоль) с НАТУ (190 мг, 0,5 ммоль) и DIPEA (200 мкл) в ДМФА (5 мл) и перемешивали при 50°C в течение 30 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), а затем ДХМ (3×5 мл). К смоле добавляли раствор трифторуксусной кислоты с триизопропилсиланом и водой (95:2,5:2,5, 5 мл) и перемешивали в течение 90 минут. Раствор собирали и высушивали в вакууме, растворяли в ДМСО (100 мкл) и фракционировали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (ОФ) на колонке С18 с градиентом от 20% АСN в воде с 0,1% ТФУ до 60% АСN в воде с 0,1% ТФУ в течение 10 минут. Чистые фракции выделяли, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением Примера 4 в виде белого порошка (11 мг). Ожидаемая масса [M+H]: 457,13; Наблюдаемая [M+H]: 457,00 [M+H-H₂O]: 440,13

ФИГ. 4 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 4.

Пример 5

(S)-(3-((1-амино-3-(5-бороно-2-нитробензамидо)-1-оксопропан-2-ил)карбамоил)-4-нитрофенил)бороновая кислота

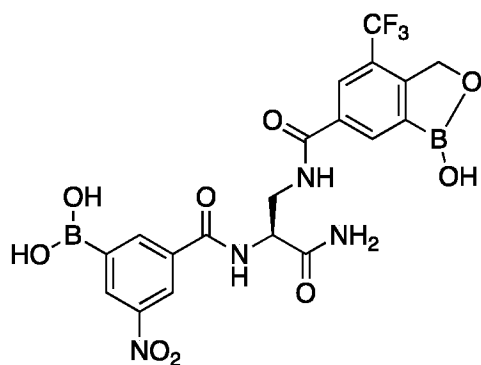


Пример 5 синтезировали подобно Примеру 4, и он содержит F27 и F1. Ожидаемая масса [M+H]: 490,11; Наблюдаемая [M+H]: 490,00

ФИГ. 5 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 5.

Пример 6

(S)-(3-((1-амино-3-(1-гидрокси-4-(трифторметил)-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоксамидо)-1-оксопропан-2-ил)карбамоил)-5-нитрофенил)бороновая кислота

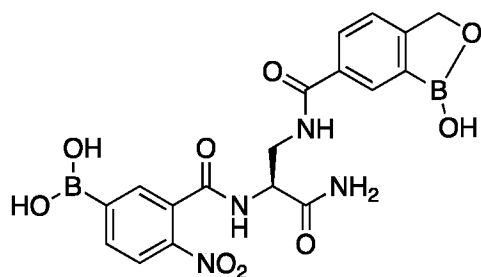


Пример 6 синтезировали подобно Примеру 4, и он содержит F27, F1 и F2. Ожидаемая масса $[M+H]^+$: 525,11; Наблюдаемая $[M+H]^+$: 525,00 $[M+H-H_2O]^+$: 508,07

ФИГ. 6 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 6.

Пример 7

(S)-(3-((1-амино-3-(1-гидрокси-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоксамидо)-1-оксопропан-2-ил)карбамоил)-4-нитрофенил)бороновая кислота

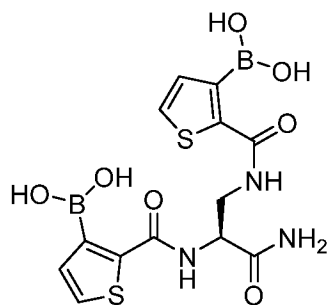


Пример 7 синтезировали подобно Примеру 4, и он содержит F27, F1 и F2. Ожидаемая масса $[M+H]^+$: 457,13; Наблюдаемая $[M+H]^+$: 457,07 $[M+H-H_2O]^+$: 439,07

ФИГ. 7 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 7.

Пример 8

(S)-(2-((1-амино-3-(3-боронотиофен-2-карбоксамидо)-1-оксопропан-2-ил)карбамоил)тиофен-3-ил)бороновая кислота

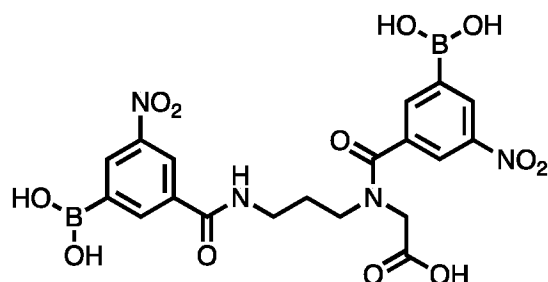


Пример 8 синтезировали подобно Примеру 4, и он содержит F27, F1 и F2. Ожидаемая масса $[M+H]^+$: 411,05; $[M+H-2xH_2O]^+$: 376,00

ФИГ. 8 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 8.

Пример 9

N-(3-(3-бороно-5-нитробензамидо)пропил)-*N*-(3-бороно-5-нитробензоил)глицин



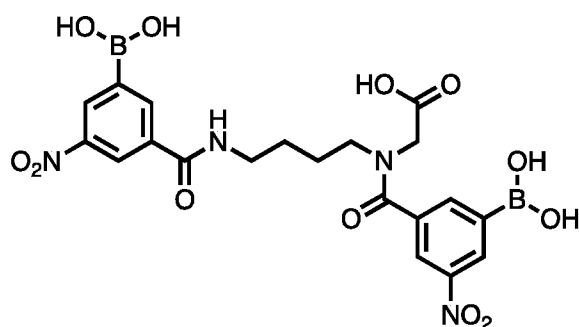
Синтез Примера 9:

Хлортритиловую смолу (1,5 ммоль/экв., 300 мг) подвергали набуханию в сухом ДХМ (5 мл) в течение 30 минут. Растворитель удаляли в потоке азота и немедленно добавляли раствор бромуксусной кислоты (1 М) в ДХМ с DIPEA (1 М) и осторожно перемешивали в течение 1 часа. Смесь промывали ДХМ и непрореагировавшие сайты кэпировали раствором 20% MeOH в растворе ДХМ и DIEA (1 М) и перемешивали в течение 1 часа. Смолу промывали ДХМ (2×5 мл), а затем ДМФА (2×5 мл). К смоле добавляли раствор 1,3-диаминопропана (1 М) в ДМФА (5 мл) и нагревали при 50°C в течение 10 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл) и раствором 3-бороно-5-нитробензойной кислоты (0,2 М, 5 мл) в ДМФА с 1 М *N,N'*-диизопропилкарбодиимидом (DIC, 1 М, 1 мл), Охута (0,5 М, 2 мл) в ДМФА и нагревали при 50°C в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), а затем ДХМ (3×5 мл). К смоле добавляли раствор трифторуксусной кислоты с триизопропилсиланом и водой (95:2,5:2,5, 5 мл) и перемешивали в течение 90 минут. Раствор собирали и высушивали в вакууме, растворяли в ДМСО (100 мкл) и фракционировали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (ОФ) на колонке C18 с градиентом от 20% ACN в воде с 0,1% ТФУ до 60% ACN в воде с 0,1% ТФУ в течение 10 минут. Чистые фракции выделяли, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением Примера 9 в виде белого порошка (15 мг). Ожидаемая масса [M+H]: 519,13; Наблюдаемая [M+H]: 519,20 [M+H-H₂O]: 501,33

ФИГ. 9 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 9.

Пример 10

N-(4-(3-бороно-5-нитробензамидо)бутил)-*N*-(3-бороно-5-нитробензоил)глицин

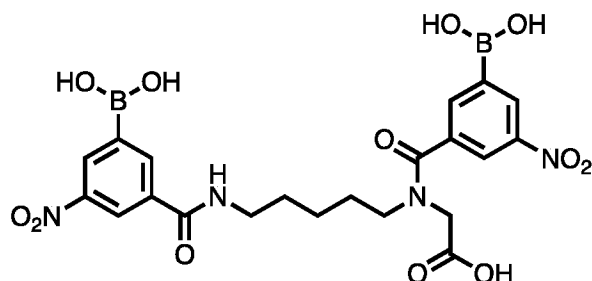


Пример 10 синтезировали подобно Примеру 9 и получали из FF2 и F1. Ожидаемая масса $[M+H]^+$: 533,14; Наблюдаемая $[M+H]^+$: 533,27; $[M+H-H_2O]^+$: 515,2

ФИГ. 10 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 10.

Пример 11

N-(5-(3-бороно-5-нитробензамидо)пентил)-*N*-(3-бороно-5-нитробензоил)глицин

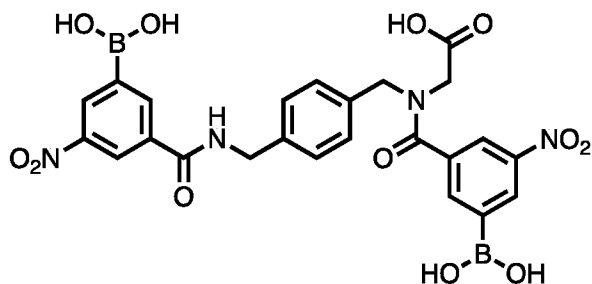


Пример 11 синтезировали подобно Примеру 9 и получали из FF2 и F1. Ожидаемая масса $[M+H]^+$: 547,16; Наблюдаемая $[M+H]^+$: 547,18; $[M+H-H_2O]^+$: 529,17

ФИГ. 11 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 11.

Пример 12

N-(4-((3-бороно-5-нитробензамидо)метил)бензил)-*N*-(3-бороно-5-нитробензоил)глицин

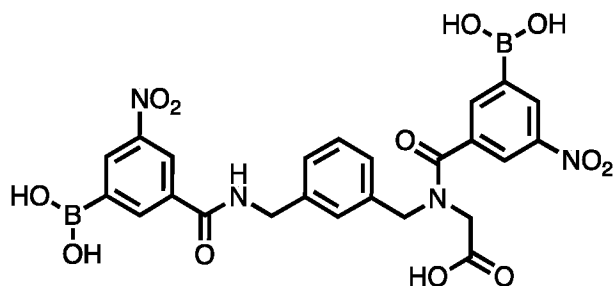


Пример 12 синтезировали подобно Примеру 9 и получали из FF8 и F1. Ожидаемая масса $[M+H]^+$: 581,14; Наблюдаемая $[M+H-H_2O]^+$: 563,16.

ФИГ. 12 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 12.

Пример 13

N-(3-((3-бороно-5-нитробензамидо)метил)бензил)-*N*-(3-бороно-5-нитробензоил)глицин

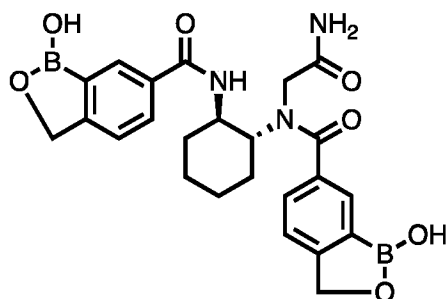


Пример 13 синтезировали подобно Примеру 9 и получали из FF4 и F1. Ожидаемая масса $[M+H]^+$: 581,14; Наблюдаемая $[M+H]^+$: 581,18 $[M+H-H_2O]^+$: 563,16

ФИГ. 13 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 13.

Пример 14

N-(2-амино-2-оксоэтил)-1-гидрокси-*N*-((1*R*,2*R*)-2-(1-гидрокси-1,3-дигидробензо[*c*][1,2]оксаборол-6-карбоксамидо)циклогексил)-1,3-дигидробензо[*c*][1,2]оксаборол-6-карбоксамид



Синтез Примера 14:

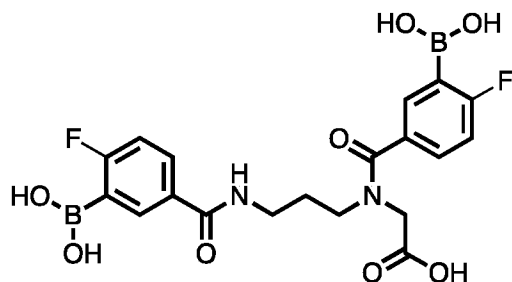
Амидную смолу Ринка (1,2 ммоль/экв., 150 мг) подвергали набуханию в ДМФА (5 мл) в течение 20 минут. Раствор удаляли в потоке азота, и к смоле добавляли раствор 20% пиперидина в ДМФА (5 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл). К смоле добавляли бромуксусную кислоту в ДМФА (1 М, 5 мл) с 1 М *N,N'*-диизопропилкарбодиимидом (DIC, 1 М, 1 мл) в ДМФА и нагревали при 50°C в течение 10 мин. Реакционную смесь промывали ДМФА (2×5 мл). К реакционной смеси добавляли раствор (1*R*,2*S*)-циклогексан-1,2-диамина (2 М, 5 мл) в ДМФА и нагревали при 50°C в течение 10 мин. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл) и добавляли раствор 1-гидрокси-1,3-дигидробензо[*c*][1,2]оксаборол-6-карбоновой кислоты (0,2 М, 5 мл) в ДМФА с 1 М *N,N'*-диизопропилкарбодиимидом (DIC, 1 М, 1 мл), Охута (0,5 М, 2 мл) в ДМФА и нагревали при 50°C в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), а затем ДХМ (3×5 мл). К смоле добавляли раствор трифторуксусной кислоты с триизопропилсиланом и водой (95:2,5:2,5, 5 мл) и перемешивали в течение 90 минут. Раствор собирали и высушивали в вакууме, растворяли в ДМСО (100 мкл) и фракционировали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (ОФ) на колонке C18 с градиентом от 20% ACN в

воде с 0,1% ТФУ до 60% АСН в воде с 0,1% ТФУ в течение 10 минут. Чистые фракции выделяли, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением Примера 14 в виде белого порошка (5 мг). Ожидаемая масса [M+H]: 492,19; Наблюдаемая [M+H]: 492,14 [M+H-H₂O]: 475,27; [M+Na]: 513,07

5 ФИГ. 14 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 14.

Пример 15

N-(3-(3-бороно-4-фторбензамидо)пропил)-*N*-(3-бороно-4-фторбензоил)глицин

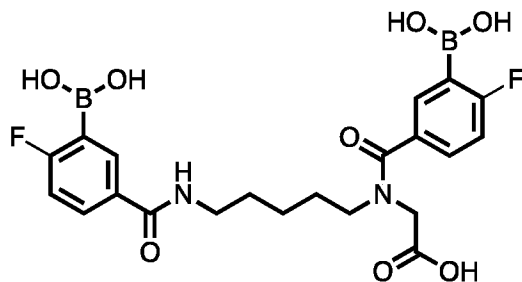


10 Пример 15 синтезировали подобно Примеру 9 и получали из FF2 и F1. Ожидаемая масса [M+H]: 465,14; Наблюдаемая [M+H]: 465,2; [M+H-H₂O]: 447,1

ФИГ. 15 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 15.

Пример 16

15 *N*-(5-(3-бороно-4-фторбензамидо)пентил)-*N*-(3-бороно-4-фторбензоил)глицин

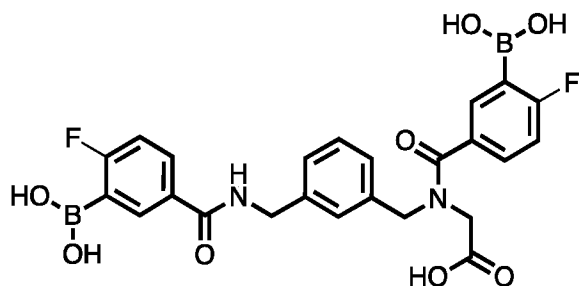


Пример 16 синтезировали подобно Примеру 9 и получали из FF2 и F1. Ожидаемая масса [M+H]: 493,17; Наблюдаемая [M+H]: 493,1

20 ФИГ. 16 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 16.

Пример 17

N-(3-((3-бороно-4-фторбензамидо)метил)бензил)-*N*-(3-бороно-4-фторбензоил)глицин

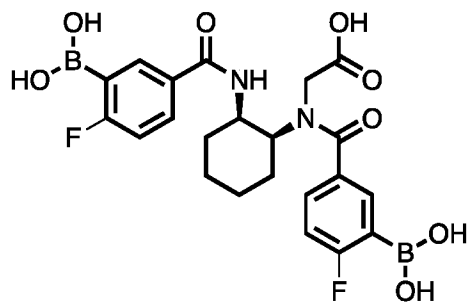


Пример 17 синтезировали подобно Примеру 9 и получали из FF4 и F1. Ожидаемая масса $[M+H]^+$: 527,15; Наблюдаемая $[M+H]^+$: 527,1; $[M+H-H_2O]^+$: 509,1

ФИГ. 17 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 17.

Пример 18

N-((1S,2R)-2-(3-бороно-4-фторбензамидо)циклогексил)-N-(3-бороно-4-фторбензоил)глицин

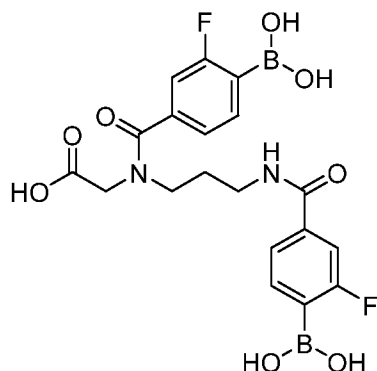


Пример 18 синтезировали подобно Примеру 9 и получали из FF5 и F1. Ожидаемая масса $[M+H]^+$: 505,17; Наблюдаемая $[M+H]^+$: 505,1

ФИГ. 18 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 18.

Пример 19

N-(3-(4-бороно-3-фторбензамидо)пропил)-N-(4-бороно-3-фторбензоил)глицин

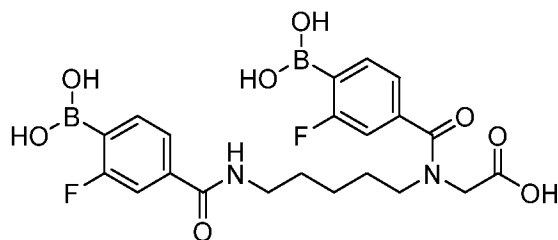


Пример 19 синтезировали подобно Примеру 9, и он содержит FF2 и F1. Ожидаемая масса $[M+H]^+$: 465,14; Наблюдаемая $[M+H]^+$: 465,1; $[M+H-H_2O]^+$: 447,1

ФИГ. 19 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 19.

Пример 20

N-(5-(4-бороно-3-фторбензамидо)пентил)-*N*-(4-бороно-3-фторбензоил)глицин

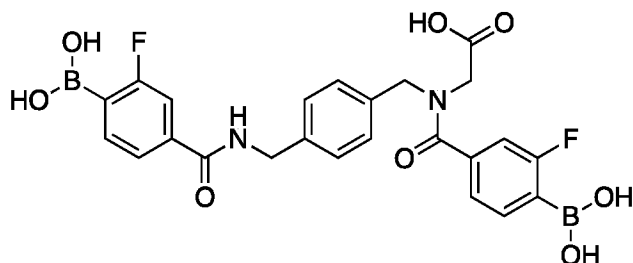


Пример 20 синтезировали подобно Примеру 9, и он содержит FF2 и F1. Ожидаемая
5 масса [M+H]: 493,17; Наблюдаемая [M+H]: 493,1; [M+H-H₂O]: 475,1

ФИГ. 20 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий
синтез Примера 20.

Пример 21

N-(4-((4-бороно-3-фторбензамидо)метил)бензил)-*N*-(4-бороно-3-фторбензоил)глицин

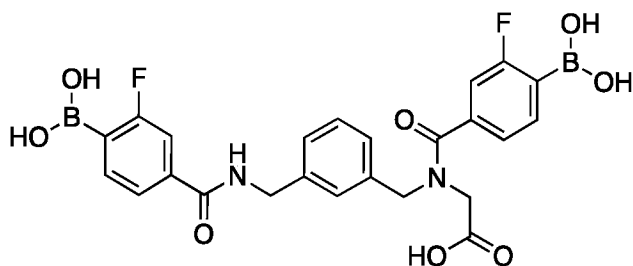


Пример 21 синтезировали подобно Примеру 9, и он содержит FF8 и F1. Ожидаемая
10 масса [M+H]: 527,15; Наблюдаемая [M+H]: 527,0

ФИГ. 21 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий
синтез Примера 21.

Пример 22

N-(3-((4-бороно-3-фторбензамидо)метил)бензил)-*N*-(4-бороно-3-фторбензоил)глицин

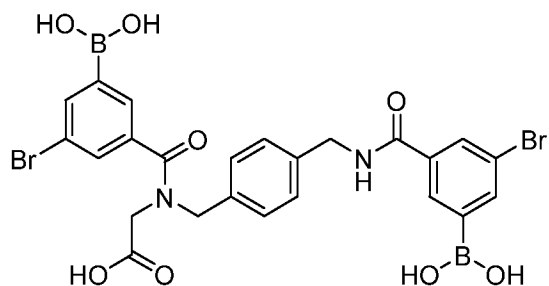


Пример 22 синтезировали подобно Примеру 9, и он содержит FF4 и F1. Ожидаемая
масса [M+H]: 527,15; Наблюдаемая [M+H]: 527,05

ФИГ. 22 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий
20 синтез Примера 22.

Пример 23

(3-((4-((N-(2-амино-2-оксоэтил)-3-бороно-5-бромбензамидо)метил)бензил)карбамоил)-5-бромфенил)бороновая кислота

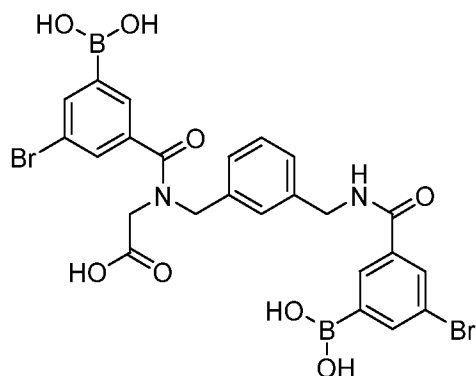


Пример 23 синтезировали подобно Примеру 9, и он содержит FF8 и F1. Ожидаемая масса [M+H]: 648,87; наблюдаемая [M+H]: 648,9

ФИГ. 23 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 23.

Пример 24

N-(3-((3-бороно-5-бромбензамидо)метил)бензил)-*N*-(3-бороно-5-бромбензоил)глицин



Пример 24 синтезировали подобно Примеру 9, и он содержит FF4 и F1. Ожидаемая масса [M+H]: 648,87; наблюдаемая [M+H]: 648,9

ФИГ. 24 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 24.

Примеры соединений, включающих лекарственное вещество, которое представляет собой инсулин:

Модифицированный инсулин 1

Синтез модифицированного инсулина, содержащего две модифицированные аминокислоты из Формул I-VI:

Следующие последовательности цепей инсулина описаны или упомянуты ниже:

25 GIVEQCCTSI~~CS~~LYQLENYCNASEKPSEA (SEQ ID NO:9)

KPGSEVGESAIKPGSEGESVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO:10)

KPGSSAEEGESAKPGSEGESVNQHLCGSHLVEALYLVCGKRGFFYTPKT (SEQ ID NO:11)

5 GIVEQCCTSICSLYQLENYCNKLSESG (SEQ ID NO:12)

KGREDEAYGNIKPGWEGESKPFVNQHLCGSHLVEALYLVCGKRGFFYTPKT (SEQ ID NO:13)

KPSGERSEGAIKPGSEGSEKFVNQHLCGSHLVEALYLVCGKRGFFYTPKT (SEQ ID NO:14)

10 KPGSEHESAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGKEGFFYTPKT (SEQ ID NO:15)

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNNAEGSK (SEQ ID NO:16)

KPGSEHESAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPRT (SEQ ID NO:17)

KPGIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO:18)

KPGSEHESAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK (SEQ ID NO:19)

15 GIVKPCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO:20)

Синтез полного инсулина может быть выполнен путем комбинирования (например, отдельного синтеза, а затем связывания) двух цепей: цепи А и цепи В. В примере синтеза модифицированного инсулина 1 цепь В модифицируют с использованием сенсора перед связыванием цепей А и В. Следующий протокол описывает общий синтез первой цепи

20 инсулина, цепи А.

Синтез цепи А:

Последовательность: GIVEQC(Acm)C(Acm)TSIC(Acm)SLYQLENYCN

Синтез А-цепи и модифицированной А-цепи (например, А-цепей, которые будут конъюгированы с сенсорами) осуществляли с использованием обычного твердофазного

25 пептидного синтеза (SPPS).

Смолу Tentagel S RAM с низкой загрузкой (LL) (0,26 ммоль/экв.) подвергали набуханию в смеси ДМФА:ДХМ (50:50, об.:об.) в течение 5 минут. Защитную группу Fmoc на смоле удаляли с использованием 20% пиперидина в ДМФА (4 мл) и при 90°C в течение 2 мин. Смолу со снятой защитой промывали ДМФА (4×5 мл). Раствор 0,5 М N,N'-диизопропилкарбодиимида (DIC, 1 мл), 0,5 М Охума (0,5 мл) и 0,2 М Fmoc-Asp(α-tBu)-ОН (0,2 М) в ДМФА связывали со смолой при 90°C. Каждый этап связывания аминокислот включал: i) снятие защиты с использованием 20% пиперидина в ДМФА при 90°C; ii) промывку ДМФА; iii) активацию и связывание Fmoc-защищенных аминокислот с 0,5 М N,N'-диизопропилкарбодиимидом (DIC, 1 мл), 0,5 М Охума и 0,2 М Fmoc-аминокислотой в ДМФА при 90 °C; iv) промывку ДМФА.

30

35

Полное снятие защиты и выделение А-цепи.

С неочищенного пептида полностью снимали защиту в ТФУ:ТIPS:H₂O (95:2,5:2,5) и осторожно встряхивали в течение 2 часов. Неочищенный раствор фильтровали, и пептид осаждали в холодном простом эфире, центрифугировали и промывали дополнительным количеством холодного простого эфира. Супернатант декантировали, и неочищенный пептид высушивали в слабом потоке газообразного азота. Неочищенный пептид растворяли в 20% ACN в воде и фракционировали с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке C18.

Следующий протокол описывает общий синтез второй цепи инсулина, цепи В.

Синтез В-цепи:

Синтез В-цепи и модифицированных (например, конъюгированных с сенсором) В-цепей с использованием твердофазного пептидного синтеза (SPPS).

Смолу МРА (0,22 ммоль/экв.) подвергали набуханию в смеси ДМФА:ДХМ (50:50, об.:об.). В реакционный сосуд добавляли раствор йодида калия (125 мМ) с DIPEA (1 М) в ДМФА вместе с Fmoc-Thr(tBu)-ОН (0,2 М). Реакционный сосуд нагревали до 90°C.

Каждый этап связывания аминокислот включал: i) снятие защиты с использованием 20% пиперидина в ДМФА при 90°C; ii) промывку ДМФА; iii) активацию и связывание Fmoc-защищенных аминокислот с 0,5 М N,N'-диизопропилкарбодиимидом (DIC), 0,5 М Охума и 0,2 М Fmoc-аминокислотой (2,5 мл) в ДМФА при 90°C; iv) промывку ДМФА. Fmoc-Arg(Pbf)-ОН связывали дважды с использованием методов, описанных выше. Последний остаток в последовательности связывали как Boc-Gly-ОН с использованием описанных выше способов с получением неочищенного пептида с последовательностью Boc-GK(Dde)FVNQHLC(Acm)GSHLVEALYLVCCK(Dde)RGFFYTPKT, присоединенного к смоле.

Снятие защиты Lys-N-ε-1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)этила (Dde) на остатках Lys в В-цепи и добавление ((1S,2R)-2-аминоциклогексил)глицина

Защитную группу Dde на остатке лизина удаляли с использованием 4% гидразина в ДМФА (3×5 мл, перемешивание 3 мин), а затем промывали ДМФА (5×5 мл). Боковую цепь остатка лизина связали с (3-(аминометил)бензил)глицином путем синтеза субмономера. Бромуксусную кислоту в ДМФА (1 М, 5 мл) с 1 М N,N'-диизопропилкарбодиимидом (DIC, 1 М, 1 мл) в ДМФА добавляли к неочищенному пептиду В-цепи и нагревали при 50°C в течение 10 мин. Реакционную смесь промывали ДМФА (2×5 мл). К реакционной смеси добавляли раствор 1,3-фенилендиметанамина (2 М, 5 мл) в ДМФА и нагревали при 50°C в течение 10 мин с получением Boc-GK((3-(аминометил)бензил)глицин)FVNQHLC(Acm)GSHLVEALYLVCCK((3-(аминометил)бензил)глицин)RGFFYTPKT.

Добавление 1-гидрокси-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоновой кислоты к (3-(аминометил)бензил)глицину на неочищенной модифицированной В-цепи.

Свободные амины (3-(аминометил)бензил)глицина связывали с 1-гидрокси-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоновой кислотой (0,2 М, 5 мл) в ДМФА с 1 М N,N'-диизопропилкарбодиимидом (DIC, 1 М, 1мл), Охута (0,5 М, 2 мл) в ДМФА и нагревали при 50°C в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл) с получением функционализированной последовательности.

Полное снятие защиты, отщепление смолы и добавление DTDP к неочищенной В-цепи.

С неочищенной функционализированной последовательности В-цепи, полученной на предыдущем этапе, полностью снимали защиту с использованием 2,2,-дитиопиридина (DTDP, 100 мг) в ТФУ:TPPS:H₂O (95:2,5:2,5, 5 мл) и осторожно встряхивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Неочищенный пептид осаждали в холодном простом эфире (50 мл), центрифугировали, декантировали, промывали дополнительным количеством холодного простого эфира (50 мл) и снова центрифугировали. Супернатант декантировали, и неочищенный пептид высушивали в слабом потоке газообразного азота. Неочищенный пептид растворяли в 20% CAN в воде и фракционировали с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке С18 с градиентом от 20% ACN в воде с 0,1% ТФУ до 50% ACN в воде с 0,1% ТФУ в течение 30 мин. Фракции собирали, замораживали и лиофилизировали.

Комбинация А и В-цепей инсулина и модифицированных инсулинов.

Две синтетические цепи (например, А-цепь и В-цепь) комбинировали в молярном соотношении 1:1 в 0,2 М NH₄HCO₃ с 6 М мочевиной при pH 8. Смесь осторожно встряхивали в течение 1 часа, разбавляли водой и фракционировали с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке С18 с градиентом от 20% ACN в воде с 0,1% ТФУ до 50% ACN в воде с 0,1% ТФУ в течение 45 мин.

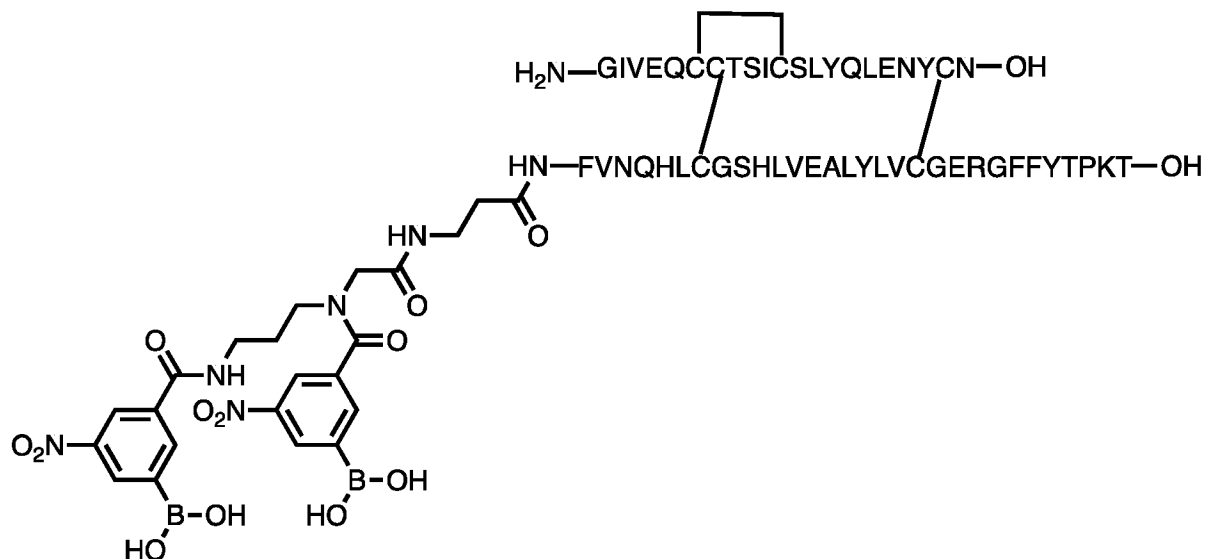
Снятие защиты Cys-Асм-защитных групп, окисление свободных тиолов и окончательная укладка модифицированных инсулинов.

Объединенное промежуточное соединение с предыдущего этапа растворяли в ледяной уксусной кислоте и воде и энергично встряхивали. К реакционной смеси добавляли раствор йода в ледяной уксусной кислоте (20 экв.) и осторожно встряхивали в течение 10 минут. Раствор аскорбиновой кислоты (5 мМ) добавляли непосредственно к реакционной смеси. Смесь разводили в 20% ACN в воде и фракционировали с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Higgsins С18 с градиентом от 20% ACN в воде с 0,1% ТФУ до 50% ACN в воде с 0,1% ТФУ в течение 45 мин. Фракции выделяли, объединяли, замораживали

и лиофилизировали с получением Примера 25 в виде белого порошка (1,1 мг). Ожидаемая масса 6940. Наблюдаемая масса $[M+5-4H_2O]^{+5}$: 1383,6; $[M+4-4H_2O]^{+4}$: 1729,05.

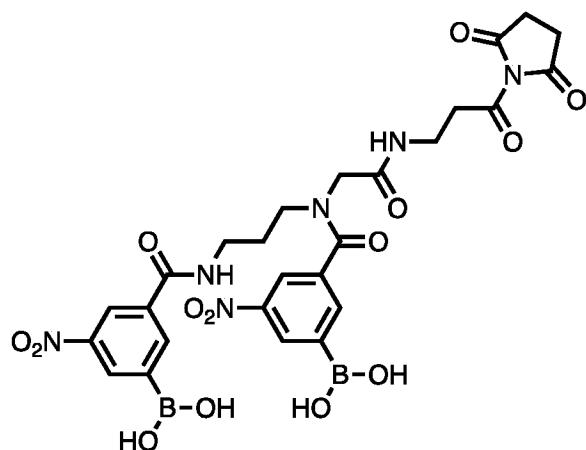
ФИГ. 25 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез Примера 25.

5 Модифицированный инсулин 2



Синтез модифицированного инсулина 2:

В примерном синтезе модифицированного инсулина 2 модифицирующий агент (например, предшественник сенсора) связывают с полным инсулином (в котором А-цепь и В-цепь уже объединены) с созданием тем самым модифицированного инсулина. Например, следующий примерный способ описывает синтез модифицирующего агента и связывание модифицирующего агента с инсулином дикого типа.



Синтез модифицирующего агента

Хлортритиловую смолу (1,5 ммоль/экв., 300 мг) подвергали набуханию в сухом ДХМ (5 мл) в течение 30 минут. Растворитель удаляли в потоке азота и немедленно добавляли раствор Fmoc-бета-Ala-OH (0,5 М) в ДХМ с DIPEA (1 М) и осторожно перемешивали в течение 1 часа. Смесь промывали ДХМ и непрореагировавшие сайты

кэпировали раствором 20% MeOH в растворе ДХМ и DIEA (1 М) и перемешивали в течение 1 часа. Смолу промывали ДХМ (2×5 мл), а затем ДМФА (2×5 мл). К смоле добавляли раствор 20% пиперидина в ДМФА (3×5 мл) и промывали ДМФА (3×5 мл). Добавляли раствор бромуксусной кислоты (1 М) с 1 М N,N'-диизопропилкарбодиимидом (DIC, 1 М, 1 мл) в ДМФА и нагревали при 50°C в течение 30 мин. К смоле добавляли раствор 1,3-диаминопропана (1 М) в ДМФА (5 мл) и нагревали при 50°C в течение 10 минут. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл) и раствором 3-бороно-5-нитробензойной кислоты (0,2 М, 5 мл) в ДМФА с 1 М N,N'-диизопропилкарбодиимидом (DIC, 1 М, 1 мл), Охута (0,5 М, 2 мл) в ДМФА и нагревали при 50°C в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл), а затем ДХМ (3×5 мл). К смоле добавляли отщепляющий раствор 20% 1,1,1,3,3,3-гексафторпропан-2-ола (HFIP) в ДХМ (5 мл) и встряхивали в течение 90 минут. Раствор собирали, и смолу промывали дополнительным раствором HFIP в ДХМ (5 мл). Растворы объединяли и высушивали в вакууме с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт растворяли в сухом ДМФА, и 3-(этилиминометиленамино)-N,N-диметилпропан-1-амин (EDC, 60 мг, 2 экв., предполагая 100% выход на предыдущих этапах) и N-гидроксисукцинимид (NHS, 30 мг, 2 экв., предполагая 100% выход на предыдущих этапах) добавляли к неочищенному продукту и встряхивали в течение 90 минут. К смеси добавляли разбавленную кислоту (100 мМ HCl в воде, 20 мл), и продукт экстрагировали этилацетатом (2×50 мл). Слои этилацетата объединяли, высушивали над сульфатом магния, фильтровали, а затем высушивали в вакууме с получением 3-((3-((3-бороно-5-нитрофенил)(2-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-2-оксоэтил)амино)пропил)амино)-5-нитрофенил)бороновой кислоты в виде неочищенных кристаллов. Неочищенный продукт растворяли в ДМСО (100 мкл) и фракционировали с помощью флэш-хроматографии на колонке C18. Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением чистого NHS-активированного модифицирующего агента. Ожидаемая масса $[M+H]^+$: 671,18, наблюдаемая $[M+H]^+$: 671,33.

ФИГ. 26А представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез модифицирующего агента.

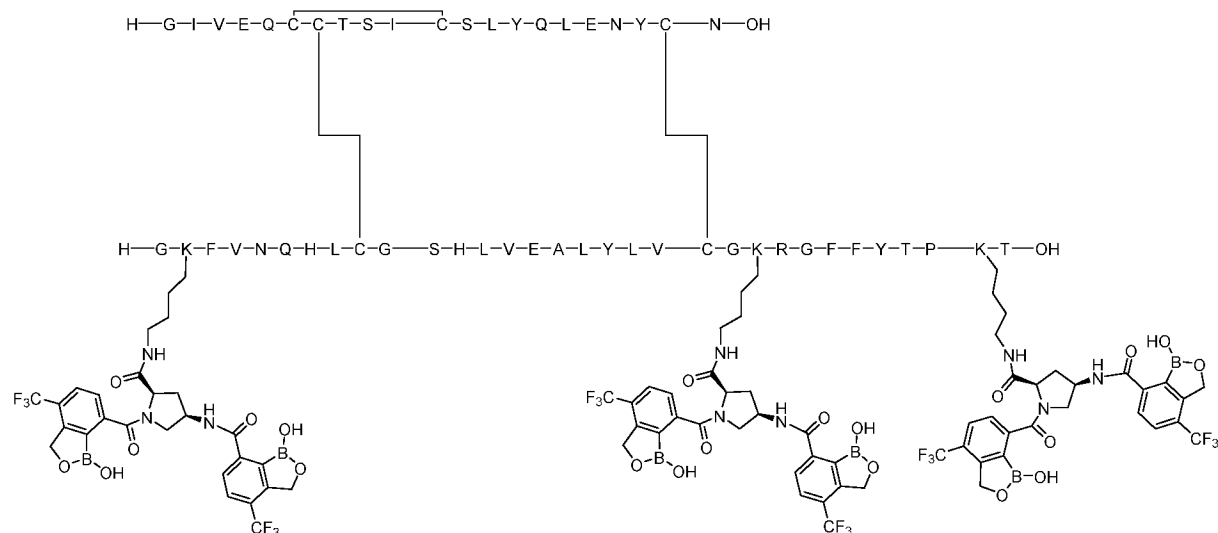
30 Добавление модифицирующего агента к инсулину дикого типа

Инсулин дикого типа (WT) (10 мг) растворяли в 100 мМ фосфате калия при pH 11,5 (1 мл). NHS-активированный модифицирующий агент растворяли в ДМСО (10 мг/мл) и добавляли 50 мкл к раствору инсулина дикого типа. Смесь осторожно встряхивали в течение 1 часа, разбавляли 20% ACN в воде (3 мл) и фракционировали с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке C18. Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали с

получением чистого модифицированного инсулина. Ожидаемая масса $[M+4H]^{+4}$ 1595,75, наблюдаемая $[M+4H-4H_2O]^{+4}$: 1577,8.

ФИГ. 26В представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез модифицированного инсулина.

5 Модифицированный инсулин 3



Синтез модифицированного инсулина 3.

А-цепь модифицированного инсулина 3 синтезировали с использованием метода, описанного в отношении модифицированного инсулина 1. Затем синтезировали неочищенный пептид с последовательностью Boc-GK(Dde)FVNQHLC(Acm)GSHLVEALYLVCCK(Dde)RGFFYTPK(Dde)T, присоединенный к смоле, с использованием метода, описанного для В-цепи модифицированного инсулина 1.

Продолжение синтеза В-цепи: снятие защиты Lys-N-ε-1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)этила (Dde) на остатках Lys в В-цепи и добавление 4-аминопирролидин-2-карбоновой кислоты (4-Pro).

Защитную группу Dde на остатке лизина удаляли с использованием 4% гидразина в ДМФА (3×5 мл, перемешивание 3 мин), а затем промывали ДМФА (5×5 мл). Боковую цепь остатка лизина связывали с 1-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-4-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)аминопирролидин-2-карбоновой кислотой (Fmoc-4-амино-Fmoc-Pro-OH) в ДМФА (0,2 М, 5 мл) с 1 М N,N'-диизопропилкарбодиимидом (DIC, 1 М, 1 мл), Охута (0,5 М, 2 мл) в ДМФА и нагревали при 50°C в течение 30 мин. Защитные группы Fmoc на 4-амино-Pro удаляли с использованием 20% пиперидина в ДМФА (2×3 мл) при 50°C и промывали ДМФА (3×5 мл) с обеспечением последовательности: Boc-GK(4-Pro)FVNQHLC(Acm)GSHLVEALYLVCCK(4-Pro)RGFFYTPK(4-Pro)T

Добавление 1-гидрокси-4-(трифторметил)-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоновой кислоты к 4-Про модифицированной В-цепи.

Свободные амины 4-аминопролина (4-Про) связывали с 1-гидрокси-4-(трифторметил)-1,3-дигидробензо[с][1,2]оксаборол-6-карбоновой кислотой (0,2 М, 5 мл) в ДМФА с 1 М N,N'-диизопропилкарбодиимидом (DIC, 1 М, 1 мл), Охута (0,5 М, 2 мл) в ДМФА и нагревали при 50°C в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФА (3×5 мл) с получением функционализированной последовательности.

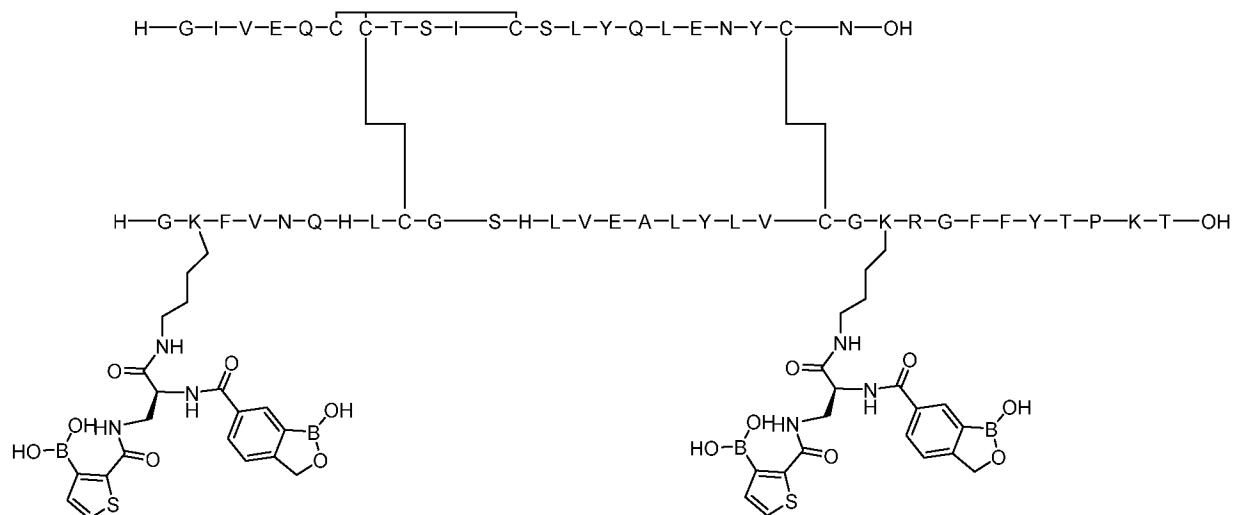
Полное снятие защиты, отщепление смолы и добавление DTDP к неочищенной В-цепи.

С неочищенной функционализированной последовательности В-цепи, полученной на предыдущем этапе, снимали защиту и объединяли с А-цепью, используя метод, сходный с тем, который описан в отношении модифицированного инсулина 1. С полученного полного инсулина далее снимали защиту, как описано в отношении модифицированного инсулина 1, с обеспечением модифицированного инсулина 3.

Ожидаемая масса $[M+4]^+4$: 1924,5 наблюдаемая $[M+4-6H_2O]^+4$ 1897,7.

ФИГ. 27 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез инсулина.

Пример 28: Модифицированный инсулин 4

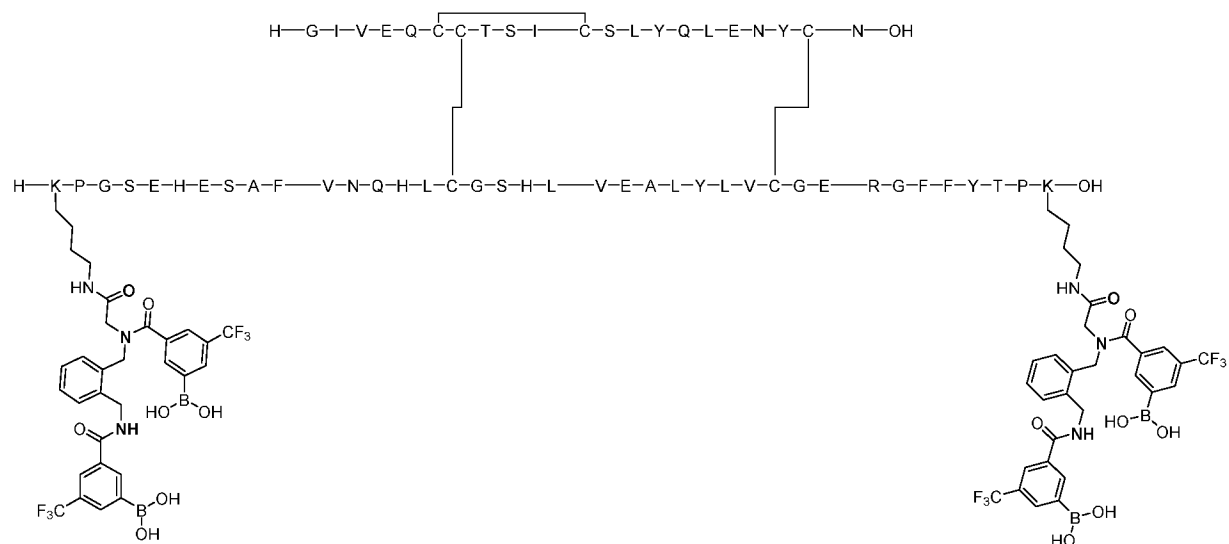


Модифицированный инсулин 4 синтезировали подобно модифицированному инсулину 3. Ожидаемая масса $[M+5]^+5$: 1359,5 наблюдаемая $[M+5-6H_2O]^+5$ 1338,1.

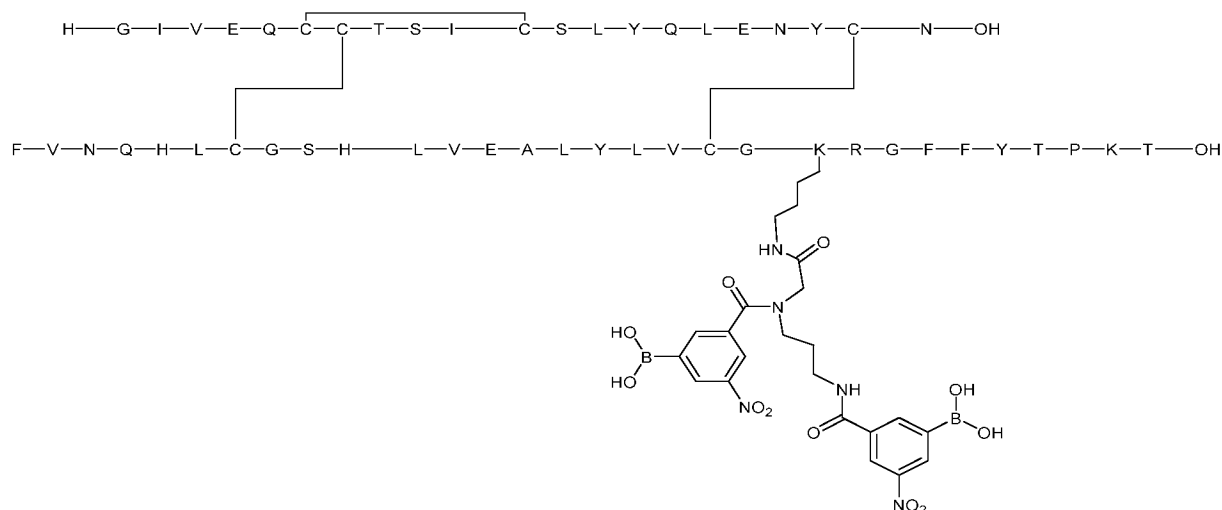
ФИГ. 28 представляет собой масс-спектрометрический график, подтверждающий синтез инсулина.

Модифицированный инсулин 5

Модифицированный инсулин 6

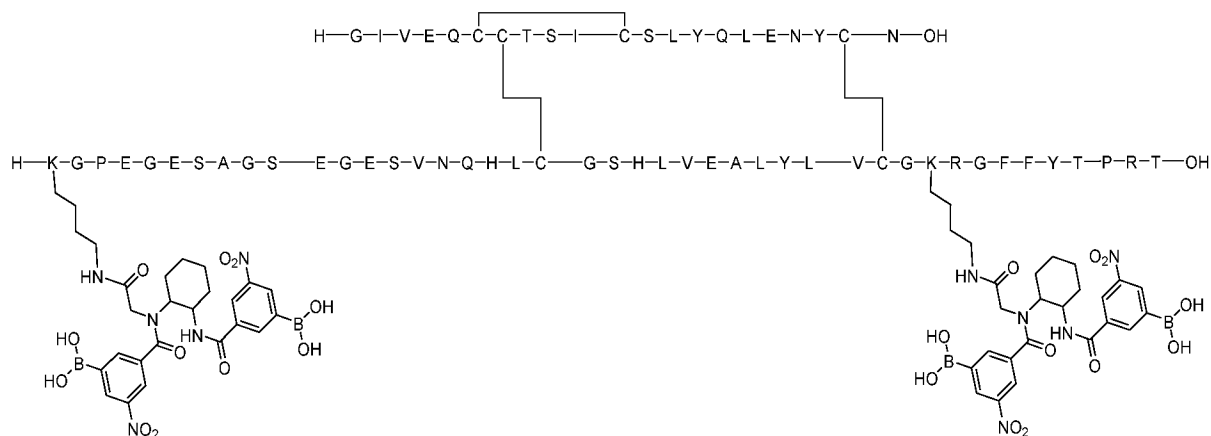


Модифицированный инсулин 7



Модифицированный инсулин 7 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

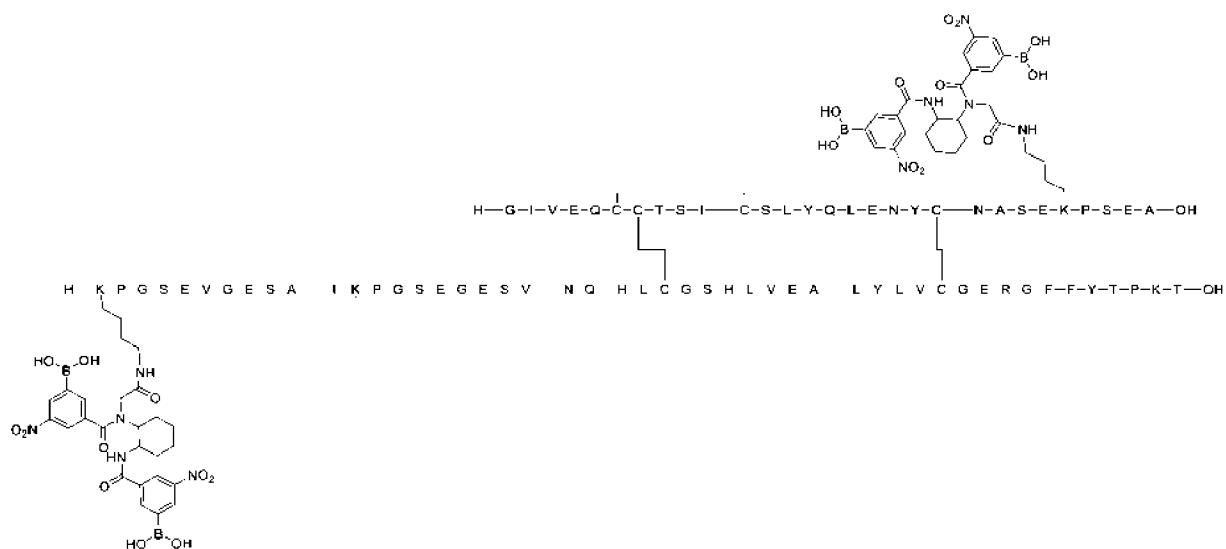
Модифицированный инсулин 8



5

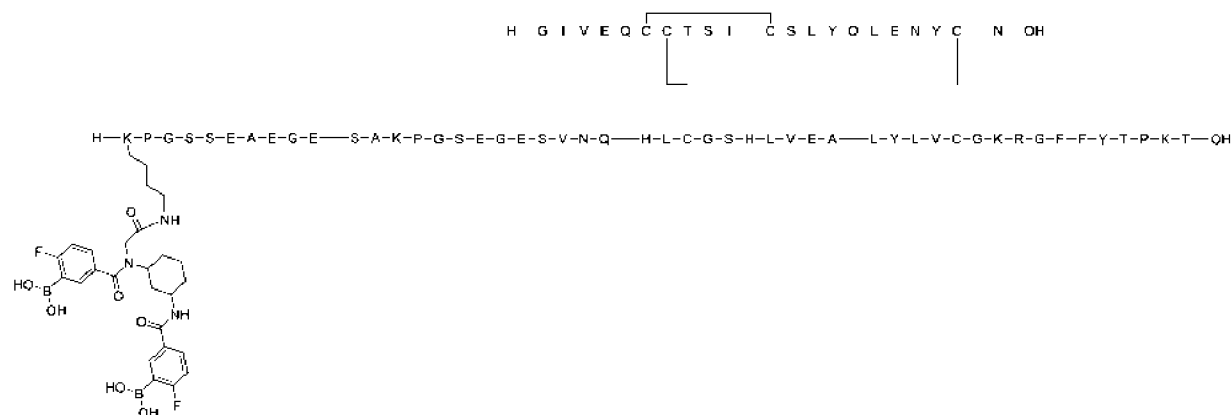
Модифицированный инсулин 8 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 9



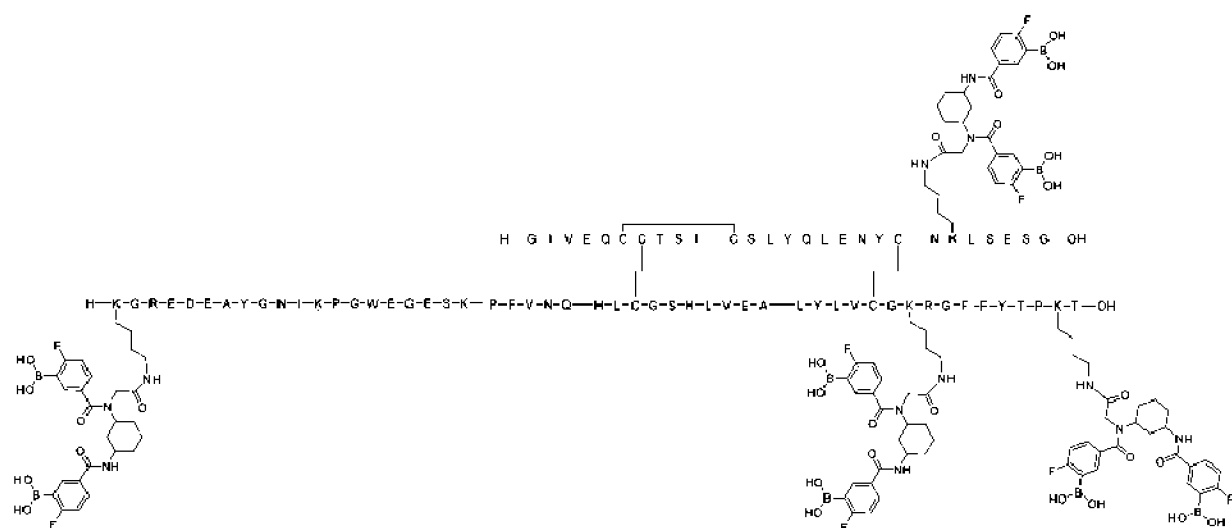
Модифицированный инсулин 9 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 10



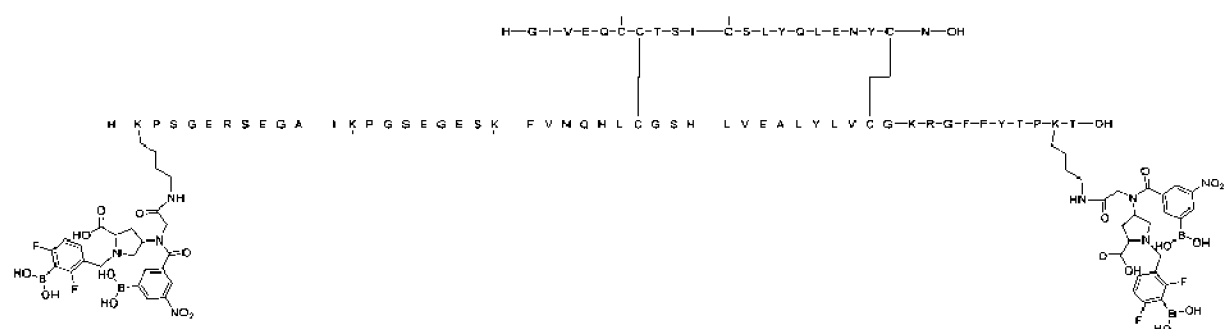
- 5 Модифицированный инсулин 10 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 11



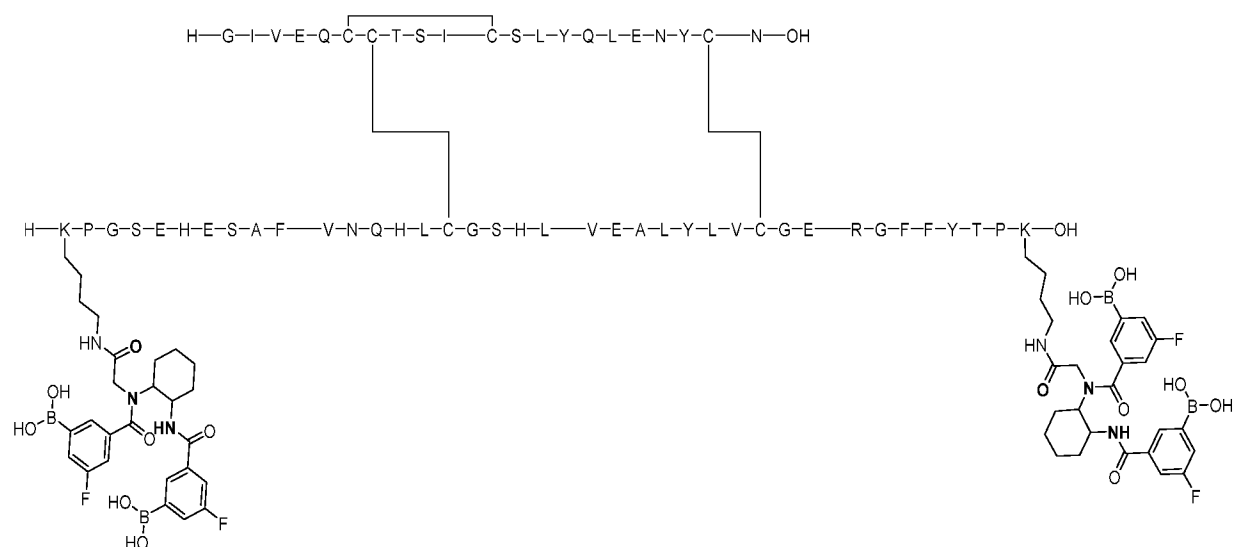
- 10 Модифицированный инсулин 11 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 12



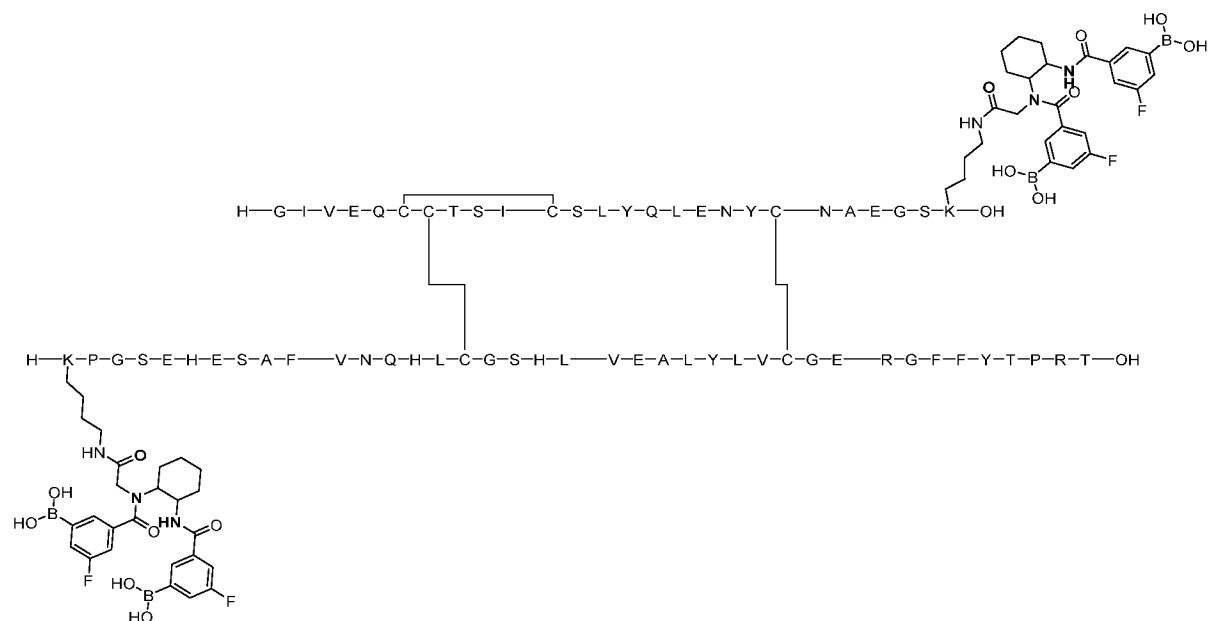
Модифицированный инсулин 12 может быть получен подобно модифицированному инсулину 3.

Модифицированный инсулин 13



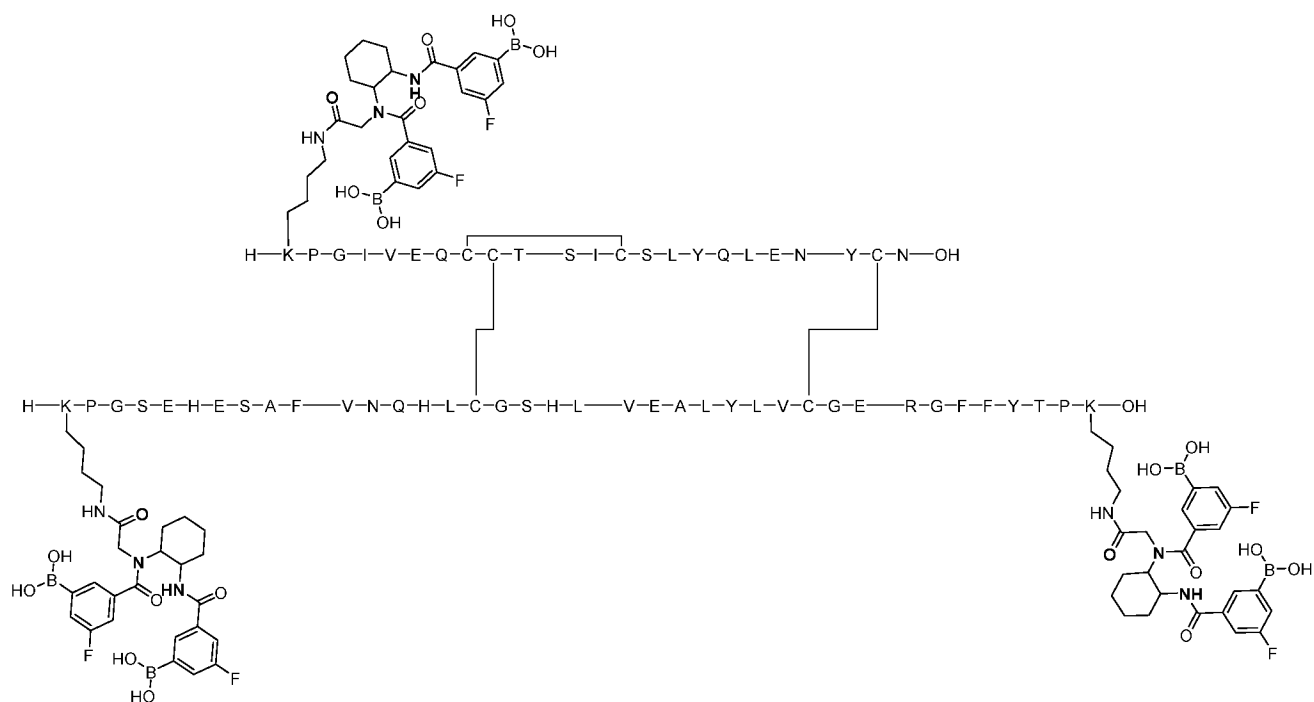
- 5 Модифицированный инсулин 13 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 14



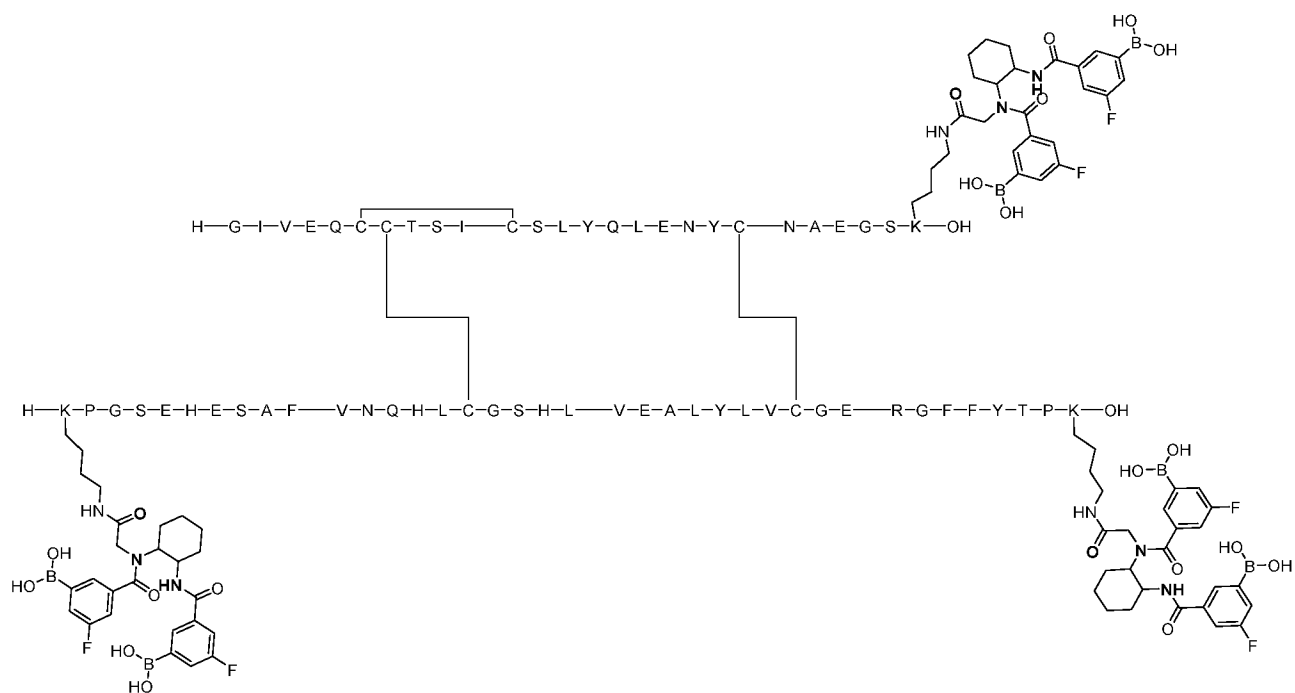
- 10 Модифицированный инсулин 14 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 15



Модифицированный инсулин 15 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

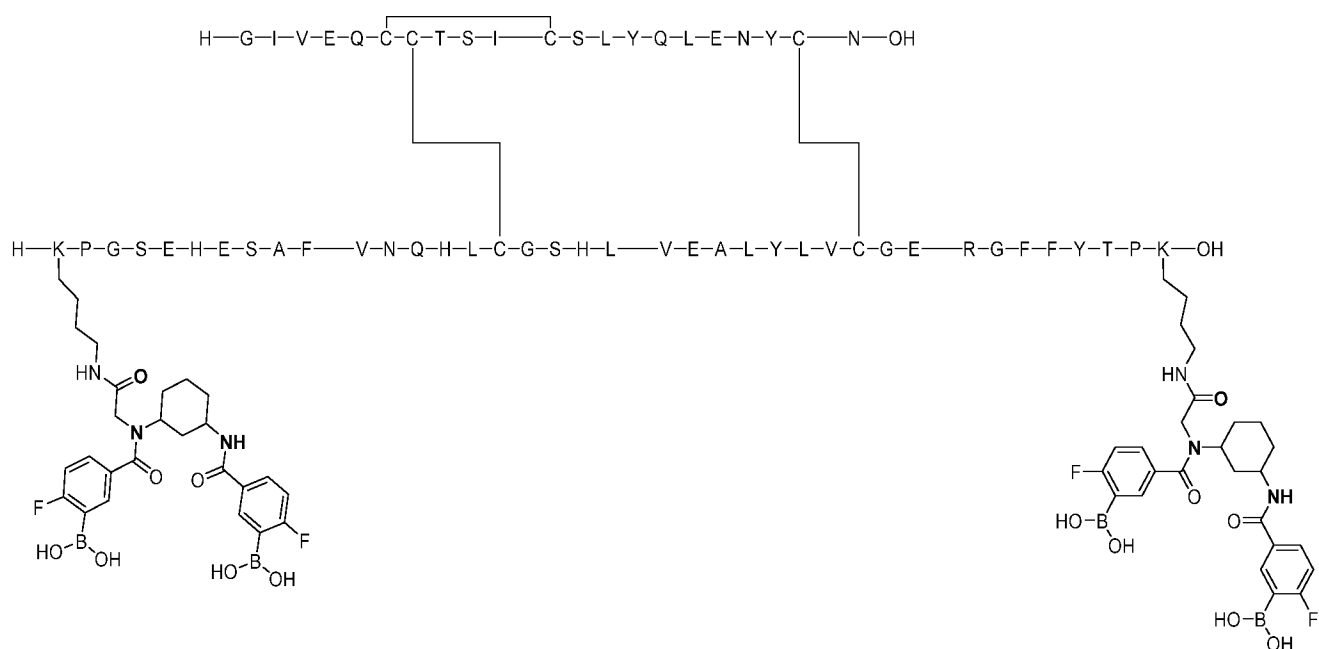
Модифицированный инсулин 16



5

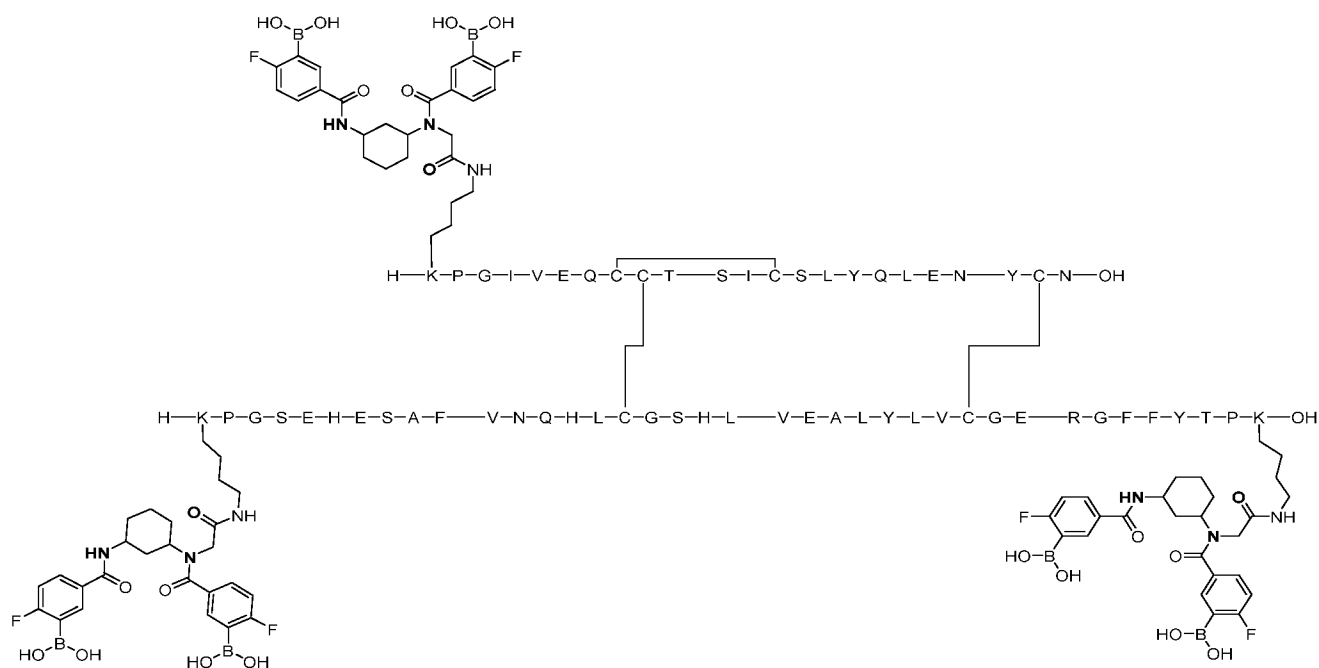
Модифицированный инсулин 16 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 17



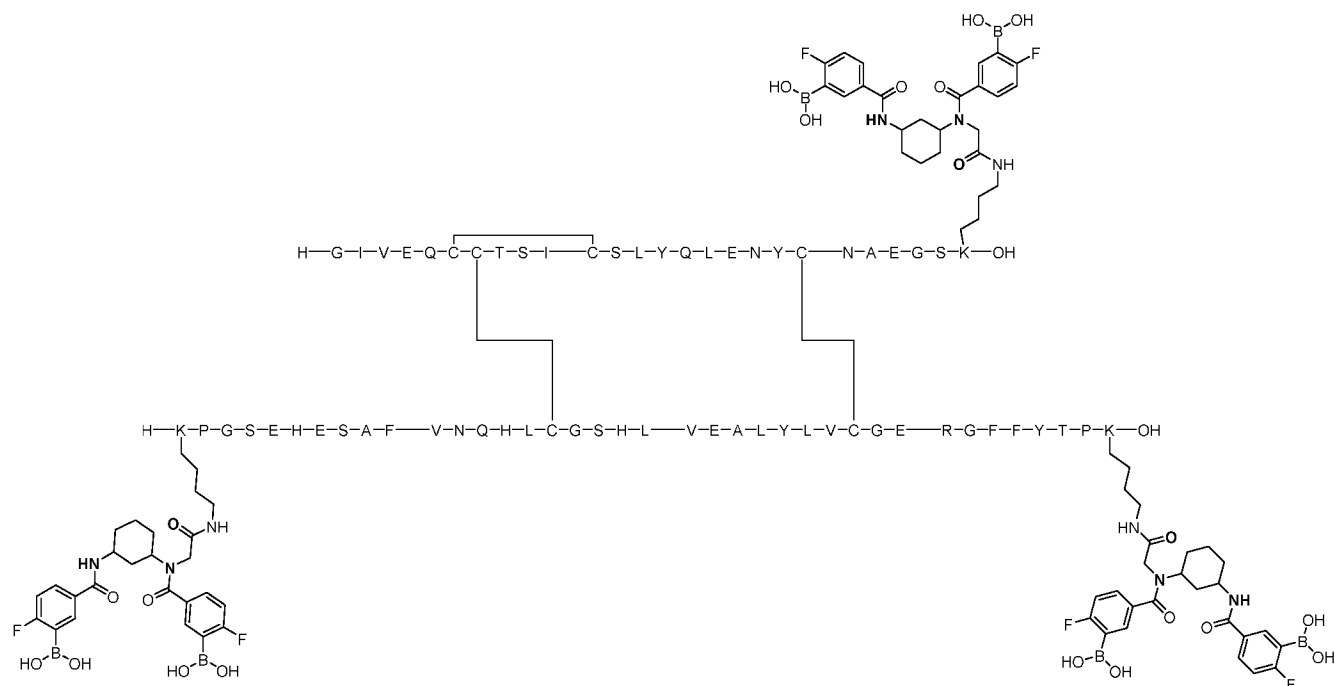
Модифицированный инсулин 17 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 18



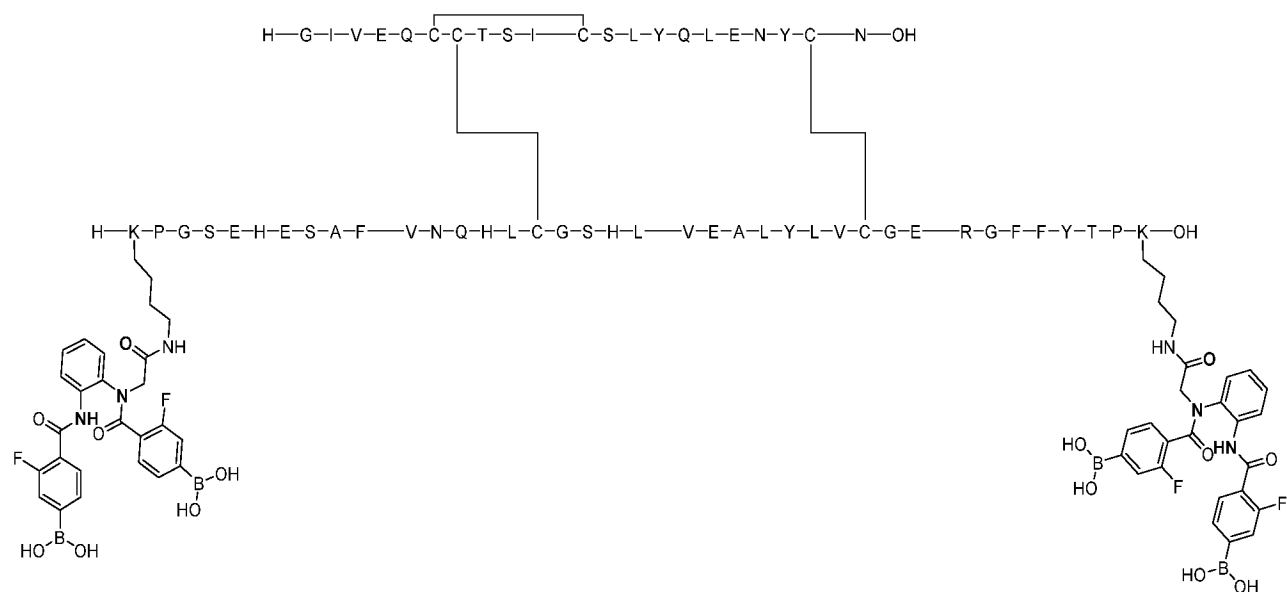
Модифицированный инсулин 18 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 19



Модифицированный инсулин 19 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

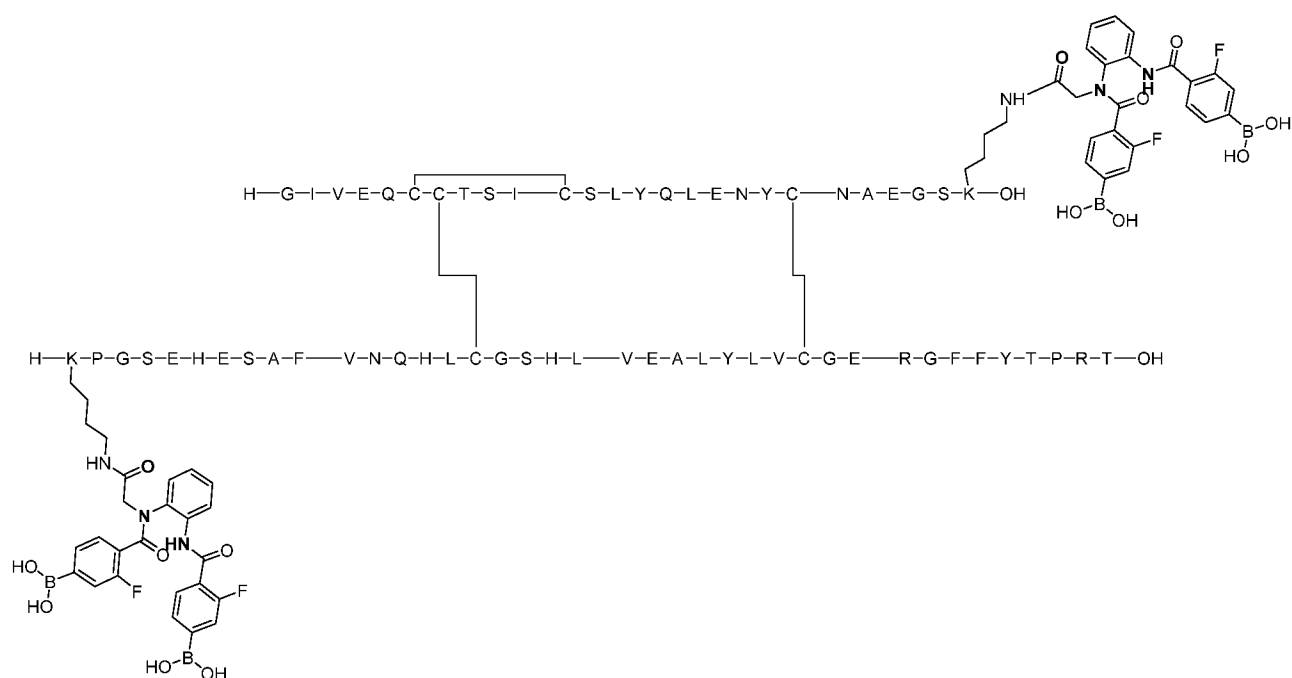
Модифицированный инсулин 20



5

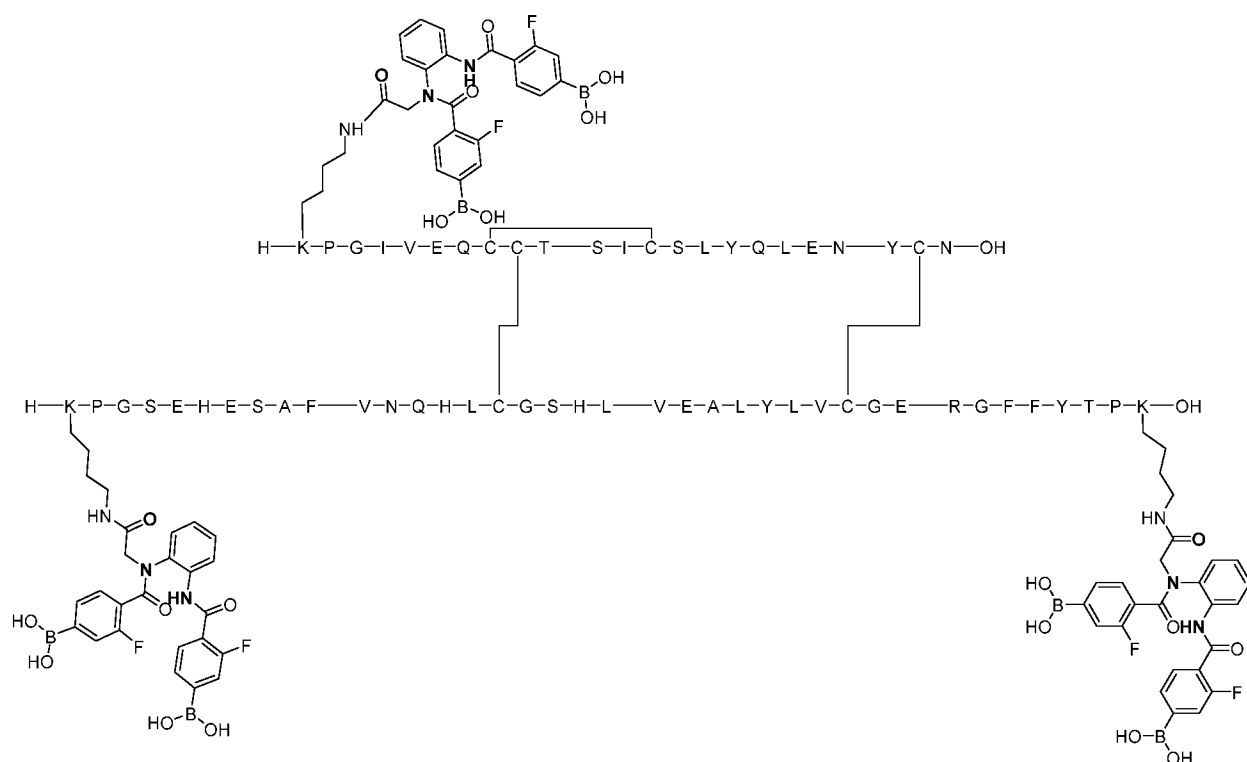
Модифицированный инсулин 20 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 21



Модифицированный инсулин 21 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

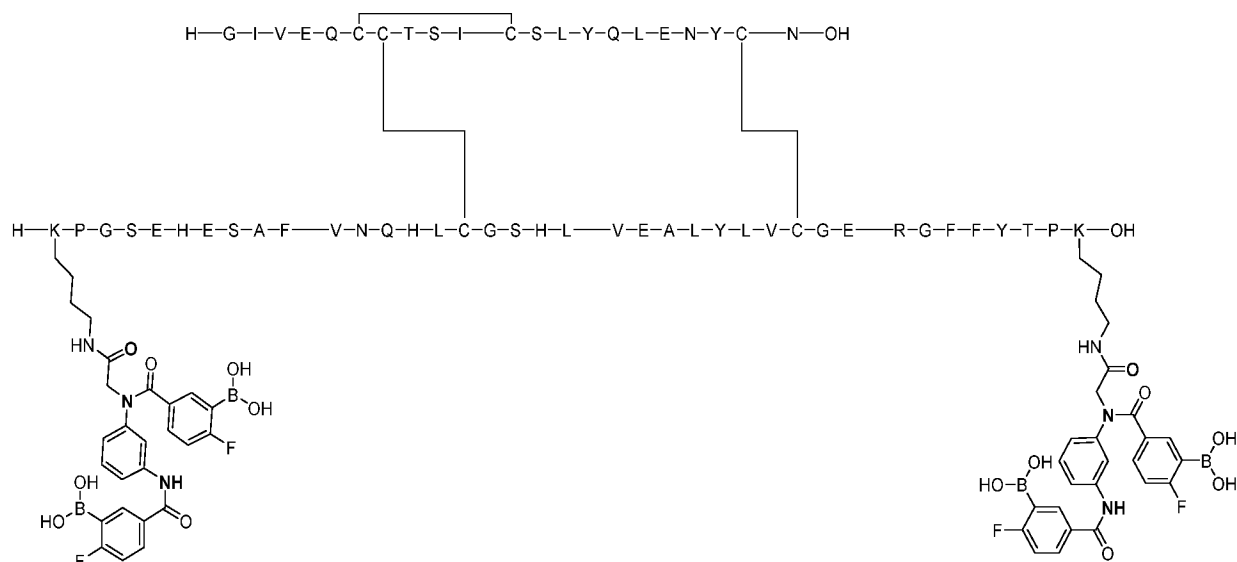
Модифицированный инсулин 22



5

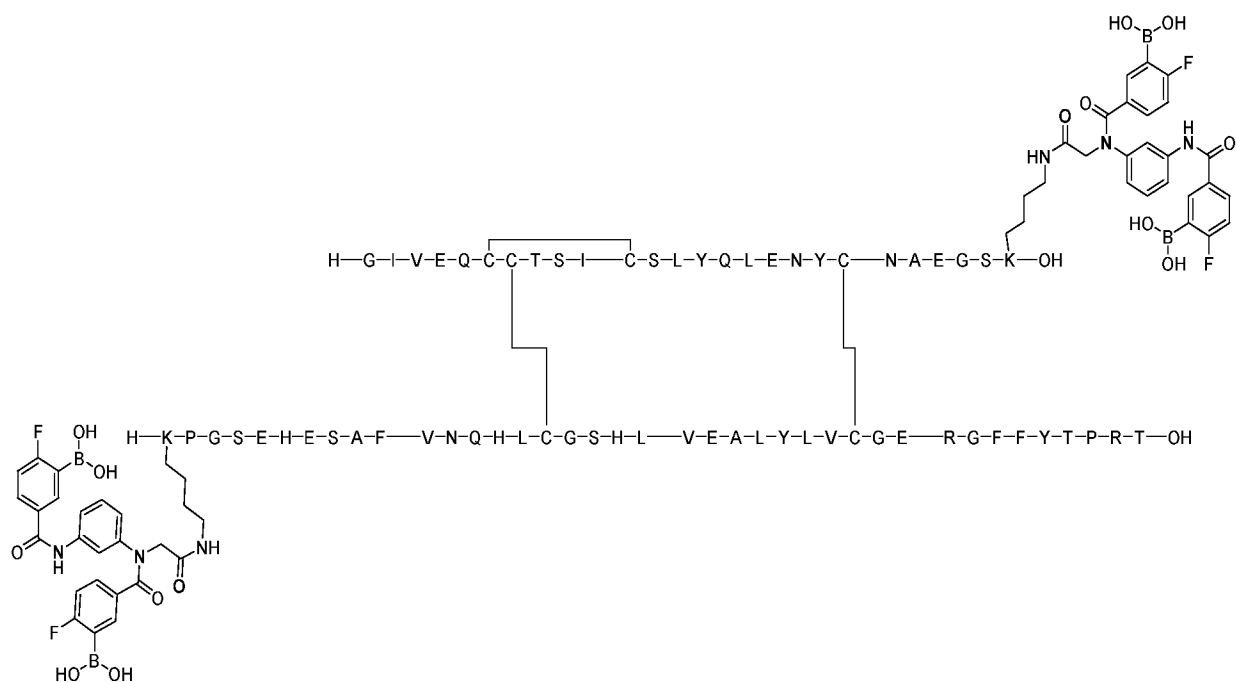
Модифицированный инсулин 22 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 23



Модифицированный инсулин 23 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

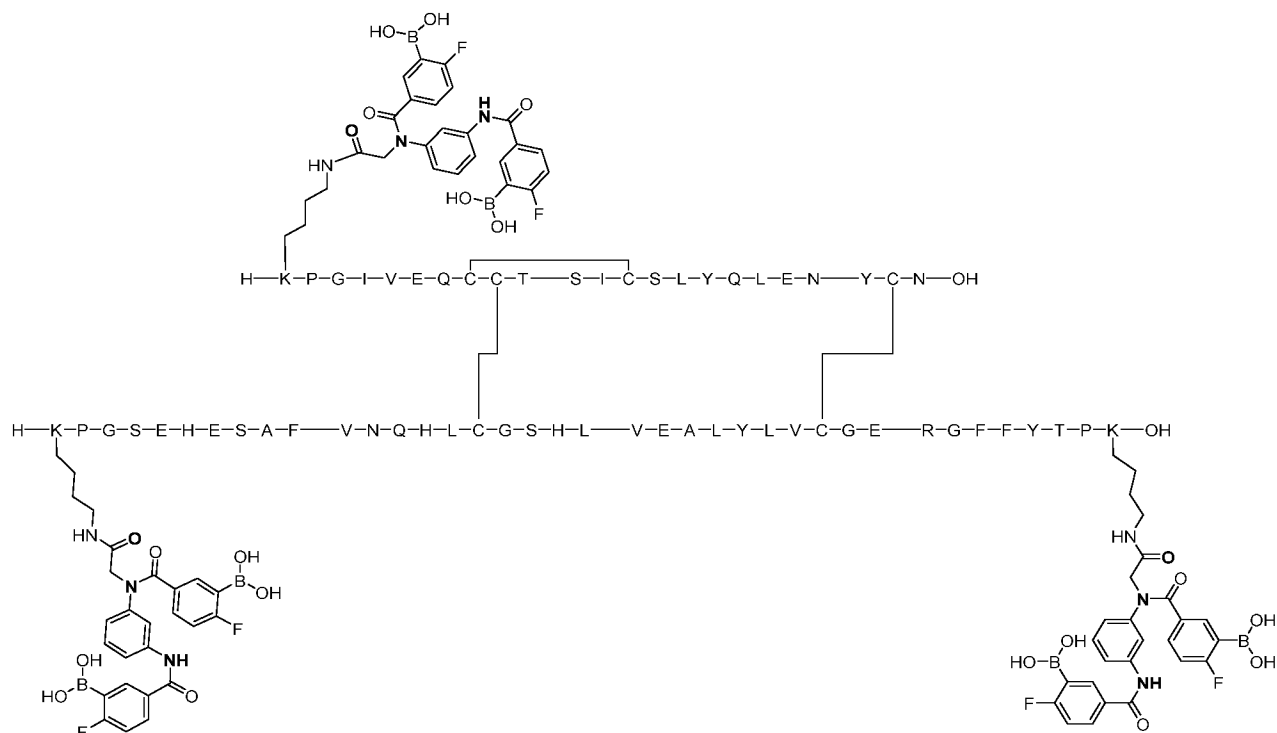
Модифицированный инсулин 24



5

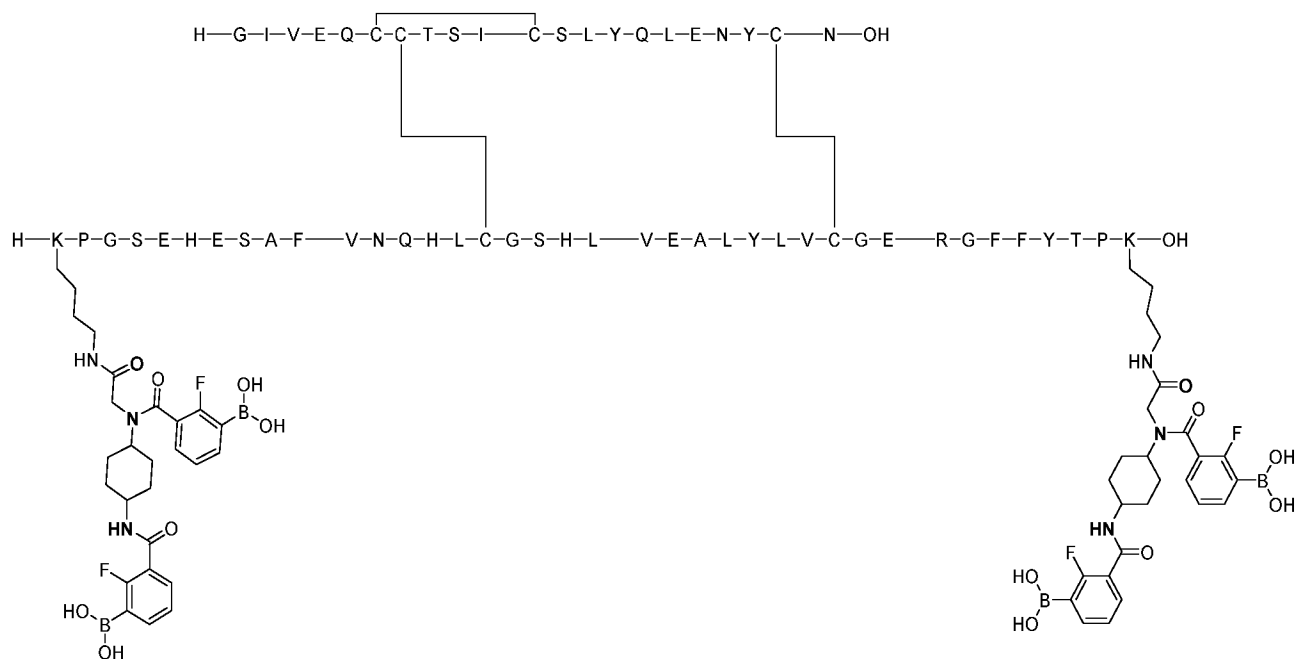
Модифицированный инсулин 24 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 25



Модифицированный инсулин 25 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

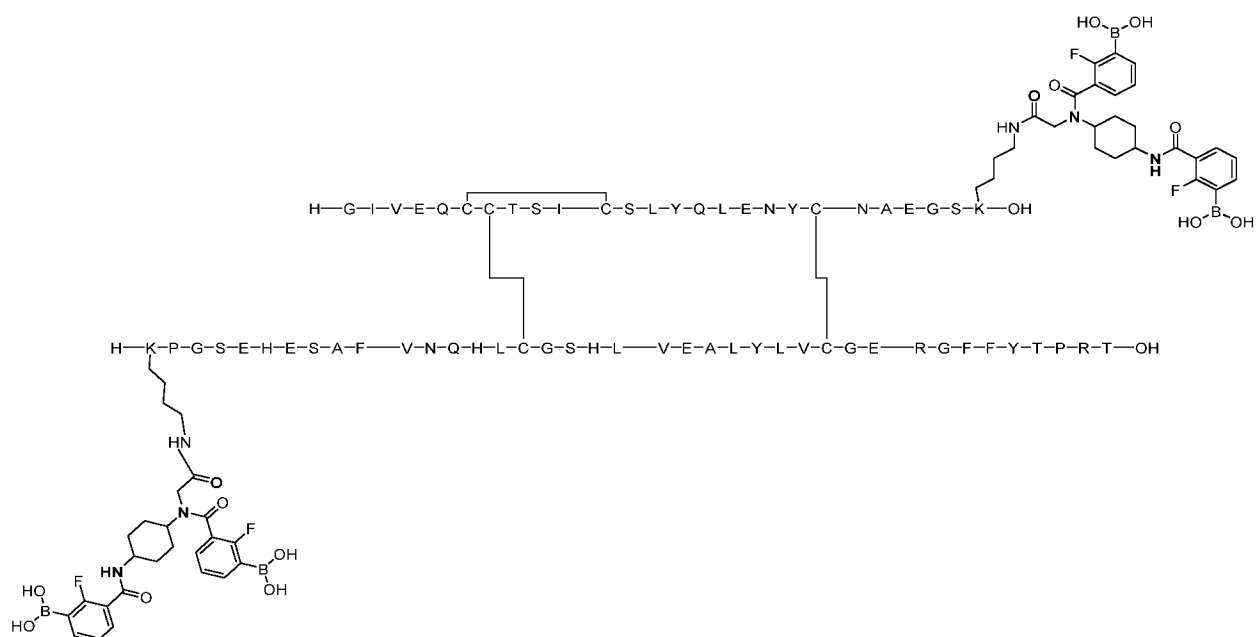
Модифицированный инсулин 26



5

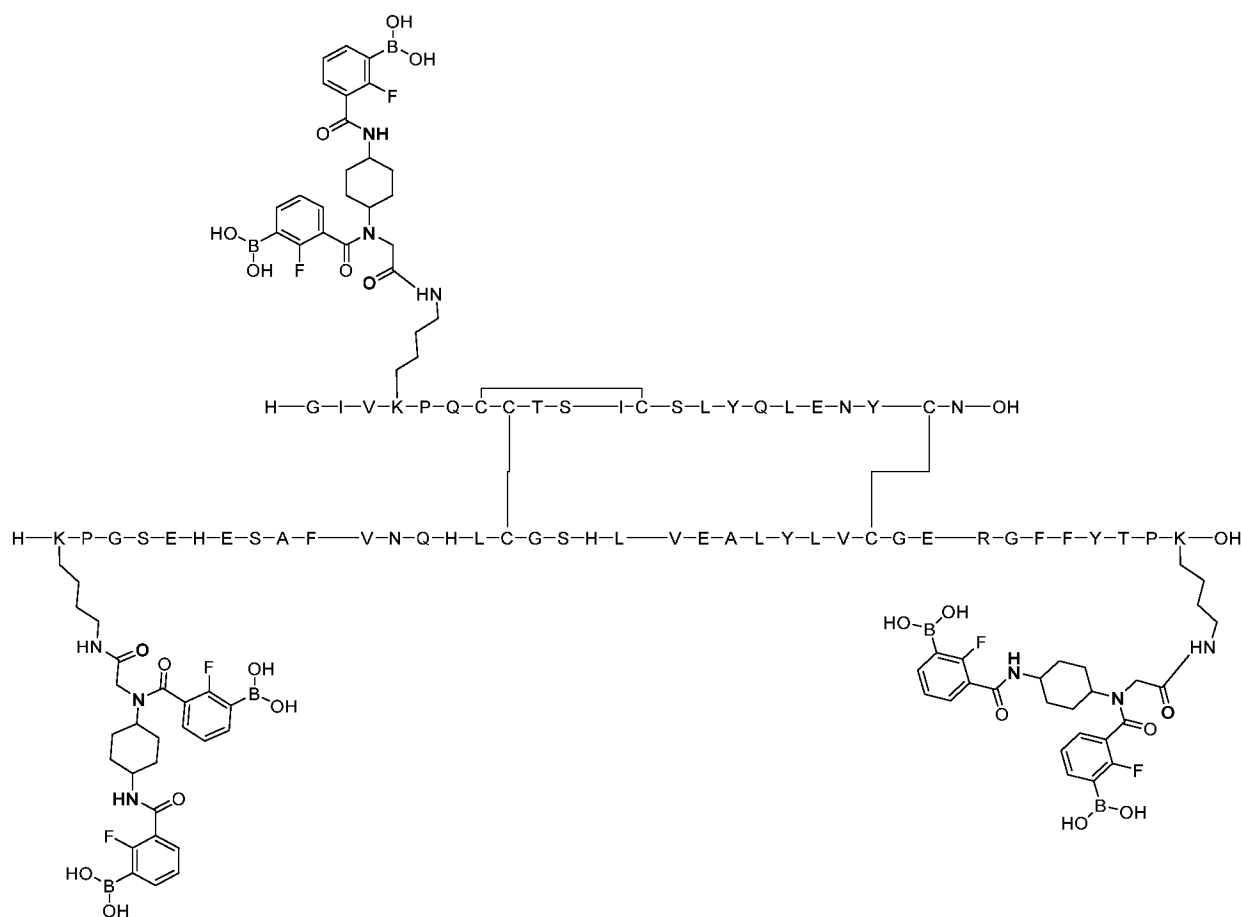
Модифицированный инсулин 26 может быть получен подобно инсулину 1.

Модифицированный инсулин 27



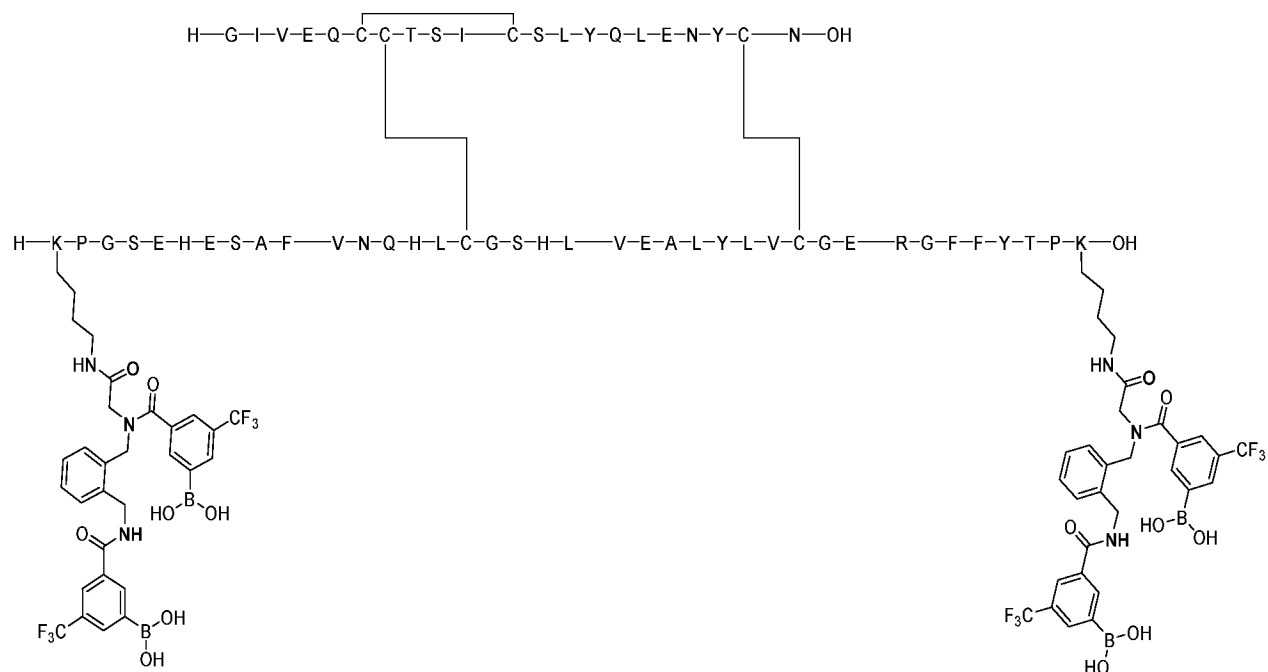
Модифицированный инсулин 27 может быть получен подобно инсулину 1.

Модифицированный инсулин 28



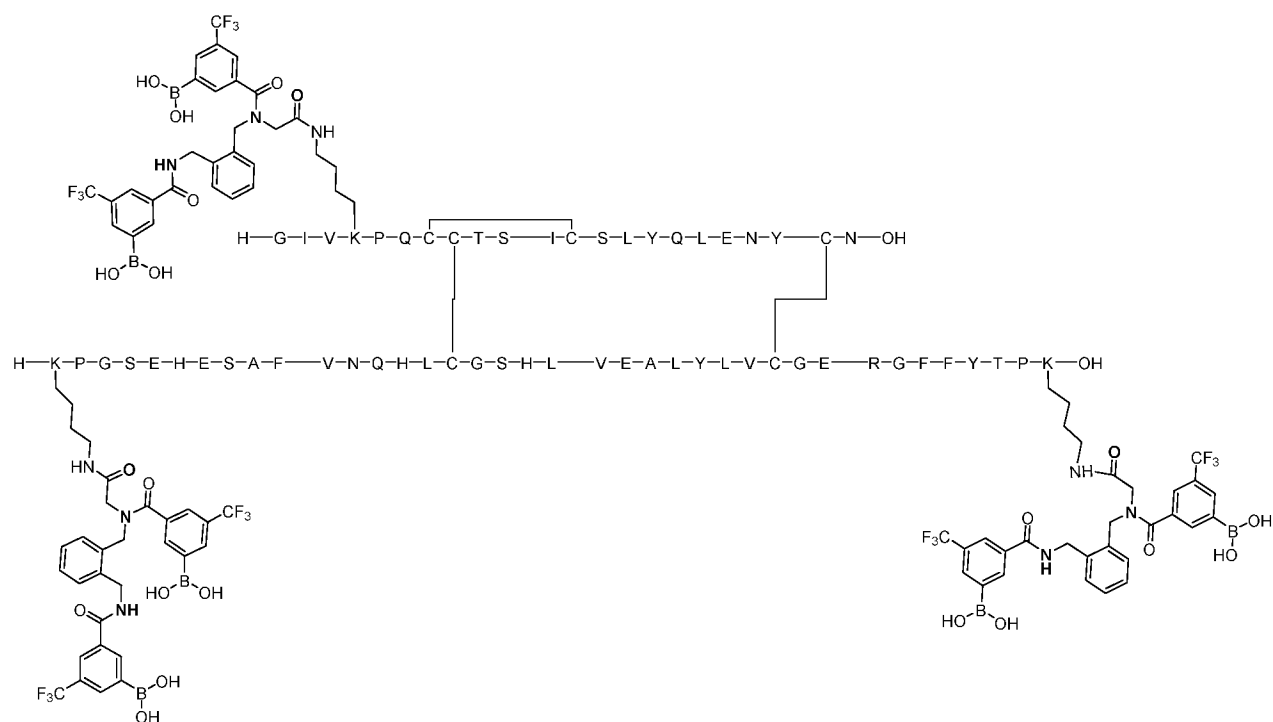
5 Модифицированный инсулин 28 может быть получен подобно инсулину 1.

Модифицированный инсулин 29



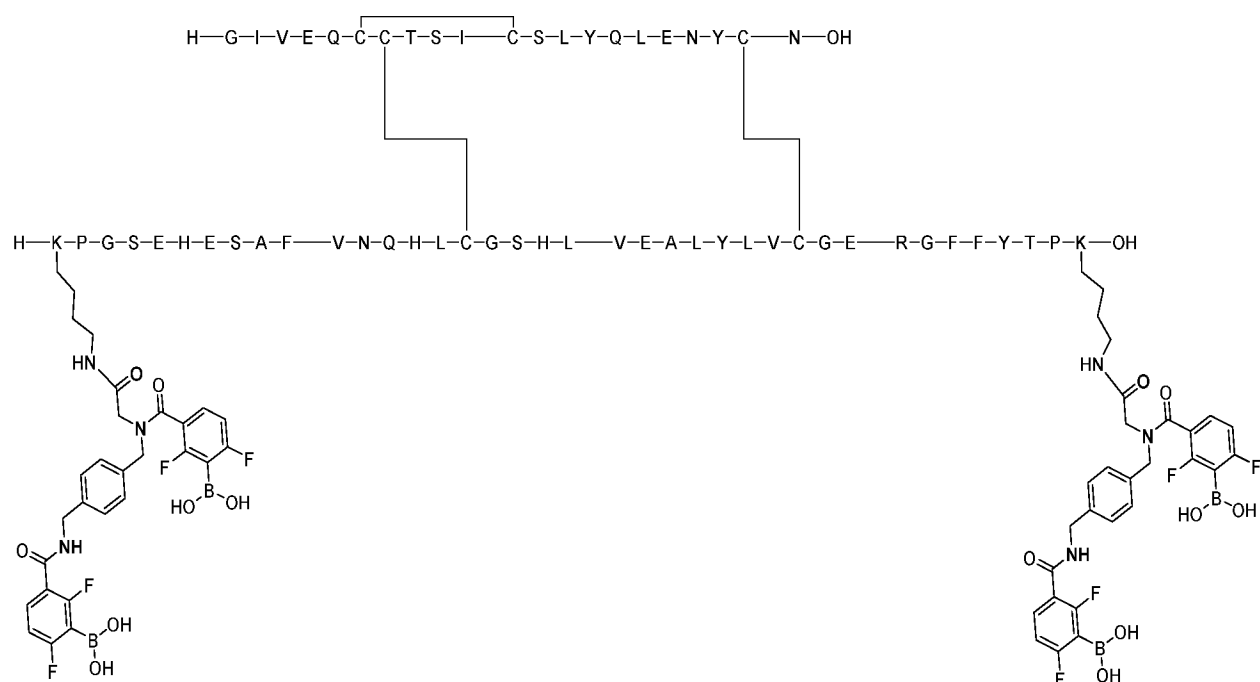
Модифицированный инсулин 29 может быть получен подобно инсулину 1.

Модифицированный инсулин 30



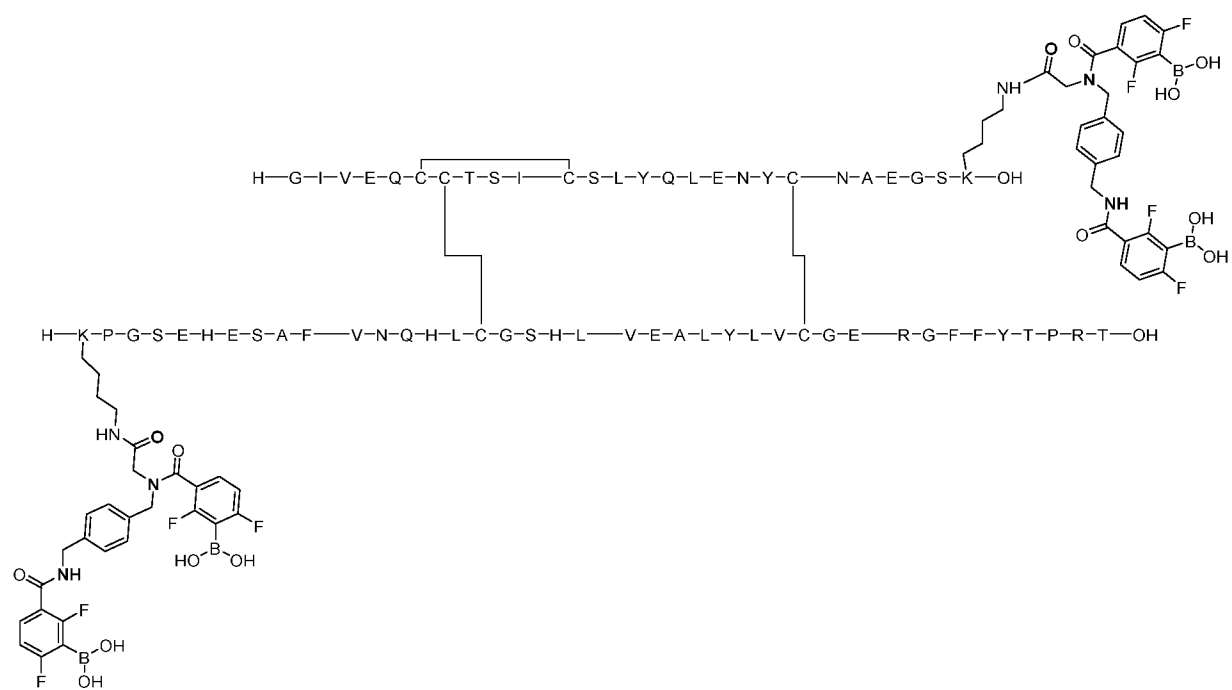
5 Модифицированный инсулин 30 может быть получен подобно инсулину 1.

Модифицированный инсулин 31



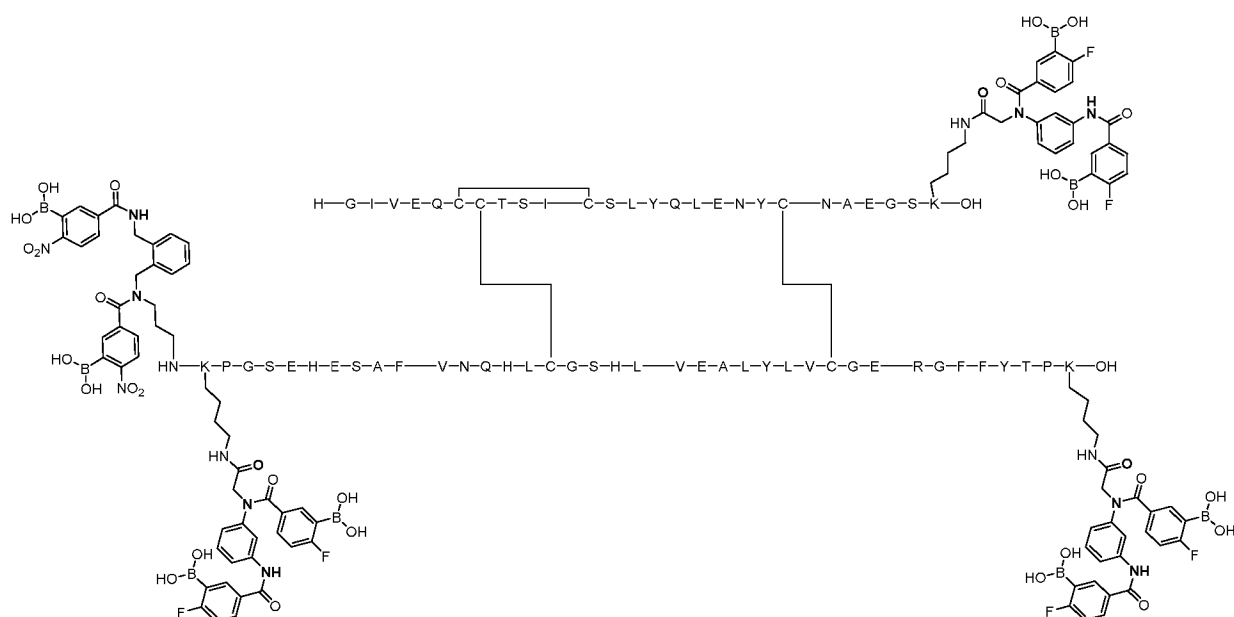
Модифицированный инсулин 31 может быть получен подобно инсулину 1.

Модифицированный инсулин 32



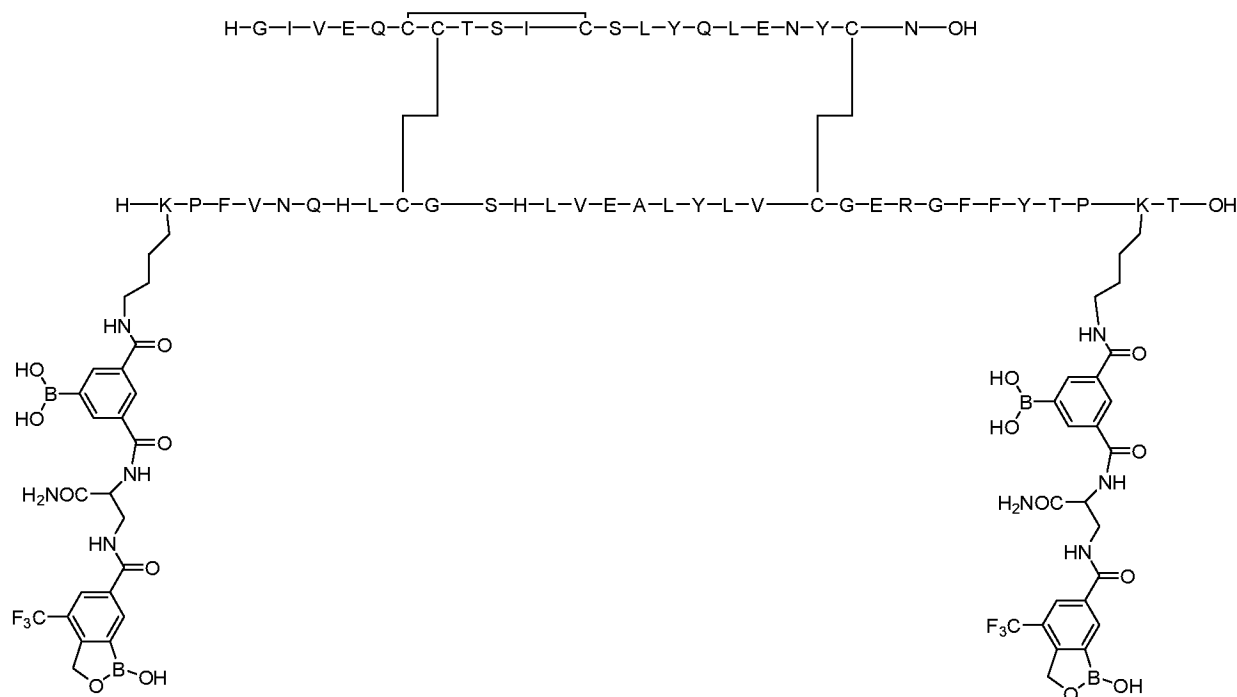
5 Модифицированный инсулин 32 может быть получен подобно инсулину 1.

Модифицированный инсулин 33



Модифицированный инсулин 33 может быть получен подобно модифицированному инсулину 1.

Модифицированный инсулин 34



Модифицированный инсулин 34 может быть получен подобно модифицированному инсулину 2.

Определение связывания глюкозы (Kd) с использованием анализа вытеснения ализаринового красного S (ARS).

- 10 Константу ассоциации для события связывания между ализариновым красным S (ARS) и соединениями каждого из Примеров 1-24 определяли с использованием стандартных методов в данной области техники. Титрования с тремя повторами 10^{-5} M ARS в 0,1 M фосфатном буфере, pH 7,4, выполняли в 96-луночном планшете против последовательных

разведений примерных соединений в диапазоне концентраций от 0 до 0,1 М при 25°C. Раствор примерного соединения и ARS инкубировали в течение 5-45 минут при 25°C и измеряли интенсивность поглощения с использованием длины волны возбуждения 468 нм и длины волны испускания 585 нм. Изменения интенсивности наносили на график в зависимости от концентрации примерного соединения, и данные по интенсивности аппроксимировали с получением константы ассоциации для связывания ARS.

Константу ассоциации для связывания между целевым сахарным соединением (например, глюкозой) и боронатным соединением определяли посредством вытеснения ARS, связанного с примерными соединениями. По три лунки с 10^{-5} М ARS и 0,1 М примерных соединений в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4, титровали в 96-луночном планшете против последовательных разведений целевого сахарного соединения в диапазоне концентраций от 0 до 2,0 М при 25°C. Раствор боронат-ARS-углевод инкубировали в течение 30-60 минут при 25°C и измеряли интенсивность в каждой лунке в считывающем устройстве для планшетов при длине волны возбуждения 468 нм и длине волны испускания 585 нм. Изменения интенсивности наносили на график в зависимости от концентрации целевого сахарного соединения, и данные аппроксимировали к уравнению конкуренции для одного сайта:

$$y = \text{мин.}(y) + \frac{\text{макс.}(y) - \text{мин.}(y)}{1 + 10^{x - \log EC_{50}}}$$

с получением константы ассоциации для события связывания боронатного соединения с целевым сахарным соединением.

В Таблице 1 показаны константы связывания Примеров 1-24 с глюкозой, фруктозой и лактатом.

Таблица 1

Пример	Kd (мМ) для глюкозы	Kd (мМ) для фруктозы	Kd (мМ) для лактата
Пример 1	25,2	1,7	38,3
Пример 2	3,7	2,0	58
Пример 3	14	1,9	48
Пример 4	13	5,6	132,6
Пример 5	29,4	11	224,8
Пример 6	3,4	4,6	74,1
Пример 7	4,4	1,2	39,5
Пример 8	32	2,2	184
Пример 9	6,5	10,63	261

Пример 10	99,85	11,48	183,47
Пример 11	210,83	24,7	241,65
Пример 12	197,6	12,09	201,1
Пример 13	371,45	17,8	196,7
Пример 14	1,642	5,882	59,8
Пример 15	59,02	4,8	51,6
Пример 17	88,6	6,5	53,52
Пример 18	95,4	6,04	67,5
Пример 19	43,02	2,87	31,02
Пример 20	30,36	5,86	70,27
Пример 21	127,38	13,54	116,85
Пример 22	16,127	9,522	97,3
Пример 23	28,09	4	53,36
Пример 24	93,7	9,36	134,69

Один или более вариантов реализации настоящего изобретения включают следующие варианты реализации 1-43:

1. Соединение, представленное Формулой I:

5

Z-R

(Формула I),

причем в Формуле I

R выбран из Формул FF1-FF24; и

Z выбран из одного из:

10

a) NH_2 или OH ,

b) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с лекарственным веществом,

c) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с N-концевым амином или эpsilon-аминогруппой

15

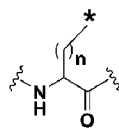
одной или более аминокислот в полипептидном лекарственном веществе, и группы, представленной $\text{J-SCH}_2-\emptyset$, $\text{J-S(CH}_2)_2-\emptyset$, $\text{J-NH}-\emptyset$, $\text{J-NH}-$ (необязательный линкер)— $\emptyset$, $\text{J-S(CH}_2)_k\text{NH}-\emptyset$ или $\text{J-триазол(CH}_2)_k\text{NH}-\emptyset$;

где $-\emptyset$ представляет собой ковалентную связь с R;

20

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14, например, от 4 до 12, от 5 до 10 или от 6 до 8; и

J представляет собой аминокислоту или одну или более аминокислот в полипептидном лекарственном веществе, причем каждая из указанной одной или более аминокислот в указанном полипептидном лекарственном веществе представлена Формулой I':

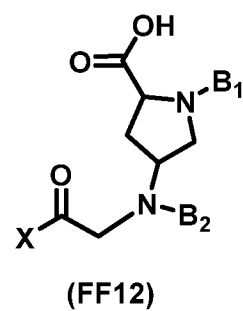
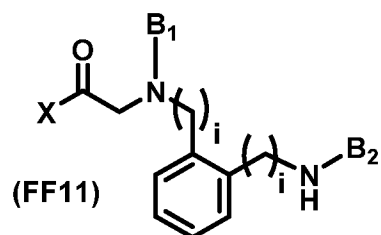
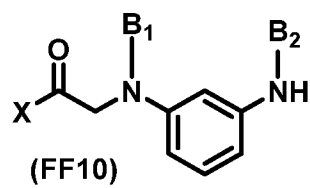
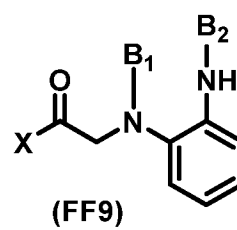
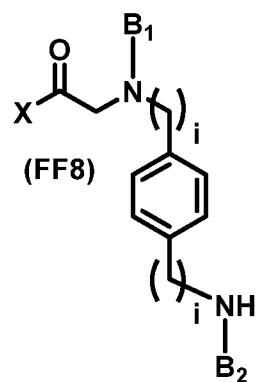
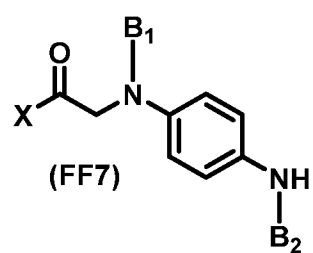
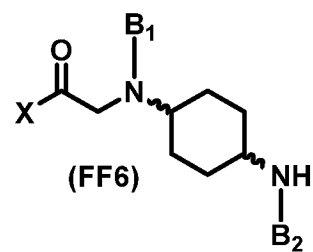
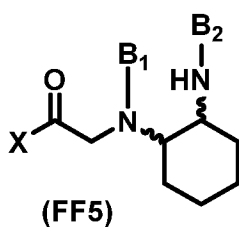
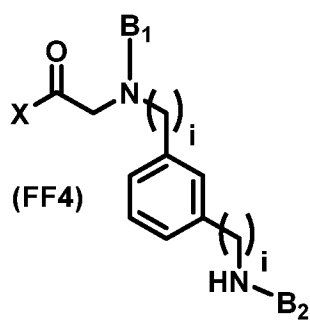
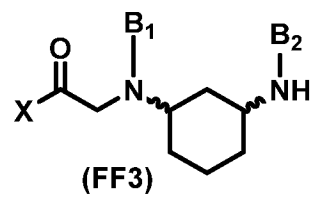
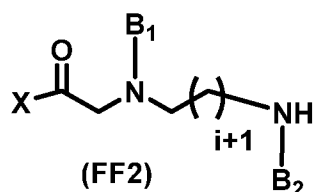
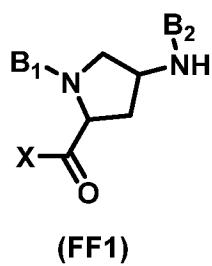


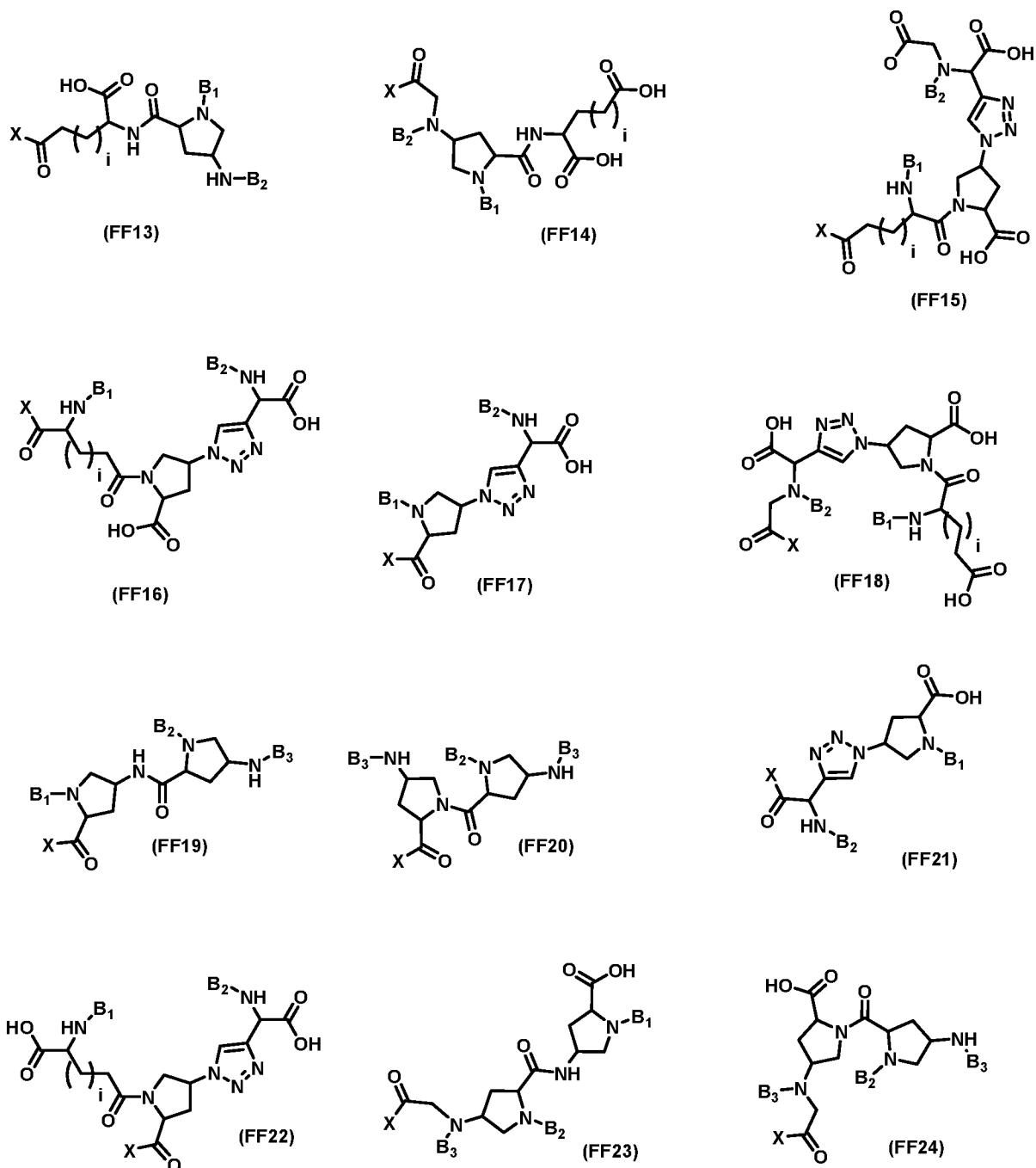
(Формула I'),

причем в Формуле I'

 и  обозначают положения присоединения к остальным частям указанного полипептидного лекарственного вещества;

- 10 * обозначает положение присоединения к остальной части Z; и
индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8,
причем для Формул FF1-FF24:



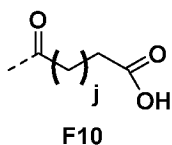
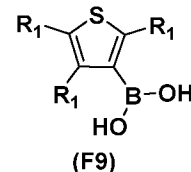
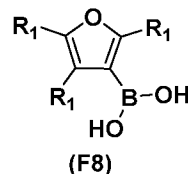
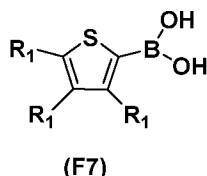
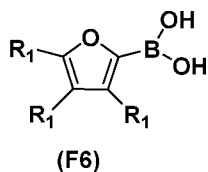
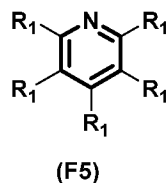
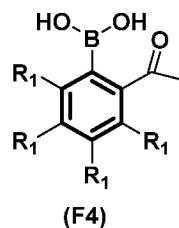
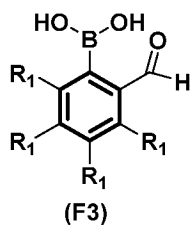
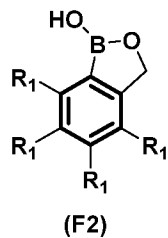
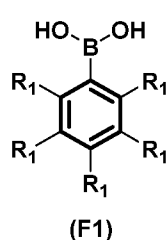


X представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле I;

индекс i представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20, например, от 2 до 18, от 3 до 16, от 4 до 14, от 6 до 12 или от 8 до 10;

B_1 и B_2 являются одинаковыми или различными и каждый независимо представляет собой группу, представленную группой, выбранной из Формул F1-F9; и

B_3 представляет собой группу, представленную группой, выбранной из Формул F1-F11,



причем для каждой из Формул F1-F9:

один R₁ представляет собой (C=O)---, S(=O)(=O)---, (CH₂)_m(C=O)--- или (CH₂)_m---, где --- представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле I;

ни один, один или два R₁ каждый независимо представляет собой F, Cl, Br, OH, CH₂-NH₂, NH₂, (C=O)-NH₂, SO₂CH₃, CF₃, NO₂, CH₃, OCH₃, O(CH₂)_mCH₃, —(SO₂)NH CH₃, —(SO₂)NH(CH₂)_mCH₃ или OCF₃,

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14, например, от 2 до 12, от 3 до 10, от 4 до 8 или от 5 до 7;

один R₁ в F5 представляет собой B(OH)₂, и все остальные R₁ представляют собой H, и в Формуле F10 индекс j представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 13, например, от 2 до 12, от 3 до 10, от 4 до 8 или от 5 до 7.

2. Соединение, представленное Формулой II:

Z-R

(Формула II),

причем в Формуле II либо:

(i) R выбран из Формул FF25-FF31;

B₁ и B₂ в FF25-FF31 являются одинаковыми или различными и каждый независимо выбран из Формул F12-F19; и

Z представляет собой NH₂ и не конъюгирован с каким-либо лекарственным веществом;

либо

(ii) R выбран из Формул FF25-FF31;

B_1 и B_2 каждый независимо выбран из Формул F20-F27; и

Z выбран из одного из:

a) OH

b) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством
необязательного линкера, с лекарственным веществом,

c) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством
необязательного линкера, с N-концевым амином или эpsilon-
аминогруппой одной или более аминокислот в полипептидном
лекарственном веществе, и

d) группы, представленной $J-SCH_2-\emptyset$, $J-S(CH_2)_2-\emptyset$, $J-NH-\emptyset$, $J-$
 $NH-(\text{необязательный линкер})-\emptyset$, $J-S(CH_2)_kNH-\emptyset$ или $J-$
триазол $(CH_2)_kNH-\emptyset$,

где $-\emptyset$ представляет собой ковалентную связь с R,

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14,
например, от 4 до 12, от 5 до 10 или от 6 до 8; и

J представляет собой аминокислоту или одну или более аминокислот
в полипептидном лекарственном веществе, причем каждая из
указанной одной или более аминокислот в указанном полипептидном
лекарственном веществе представлена Формулой II';

либо

(iii) R выбран из Формул FF32-FF33,

B_1 и B_2 в FF32 каждый независимо выбран из Формул F28-F35;

B_1 и B_2 в FF33 каждый независимо выбран из Формул F36-F43; и

Z выбран из одного из:

a) лекарственного вещества,

b) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством
необязательного линкера, с N-концевым амином или эpsilon-
аминогруппой аминокислоты в полипептидном лекарственном
веществе, и

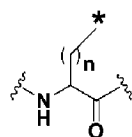
c) группы, представленной $J-SCH_2-\emptyset$, $J-S(CH_2)_2-\emptyset$, $J-NH-\emptyset$, $J-$
 $NH-(\text{необязательный линкер})-\emptyset$, $J-S(CH_2)_kNH-\emptyset$ или $J-$
триазол $(CH_2)_kNH-\emptyset$,

где $-\emptyset$ представляет собой ковалентную связь с R,

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14,
например, от 4 до 12, от 5 до 10 или от 6 до 8; и

J представляет собой аминокислоту или одну или более аминокислот в полипептидном лекарственном веществе, причем каждая из указанной одной или более аминокислот в указанном полипептидном лекарственном веществе представлена Формулой II';

5 причем для Формулы II':



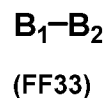
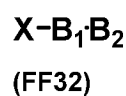
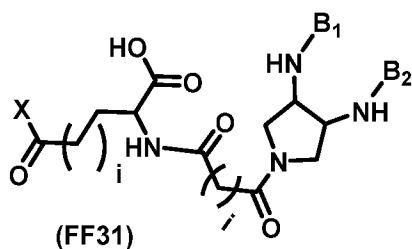
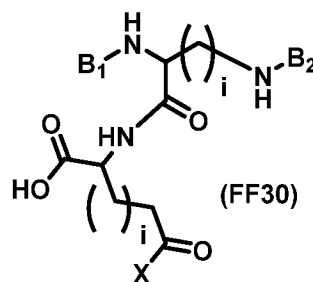
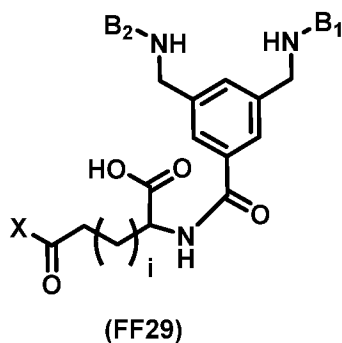
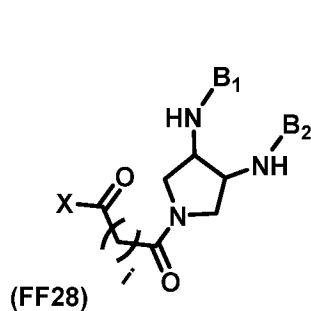
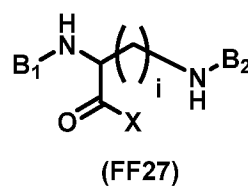
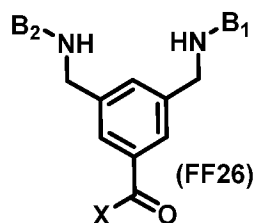
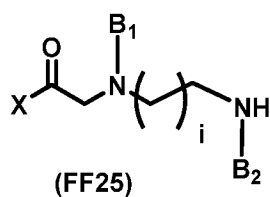
(Формула II'),

и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного полипептидного лекарственного вещества;

10 * обозначает положение присоединения к остальной части Z; и

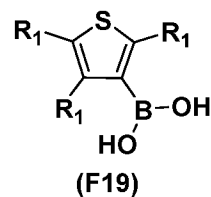
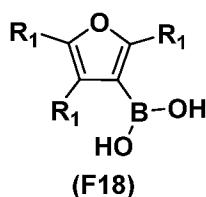
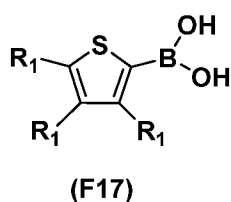
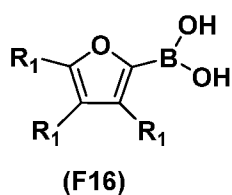
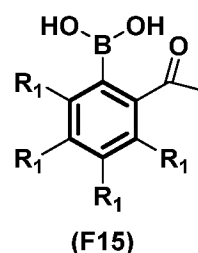
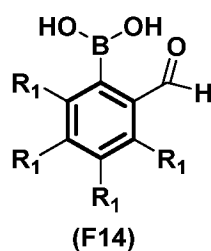
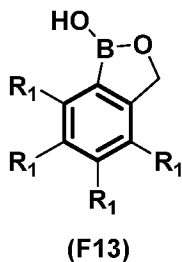
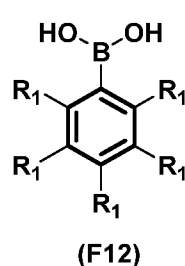
индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до 7, от 3 до 6 или от 4 до 5;

причем для Формул FF25-FF33:



15 X представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле II; и

индекс i представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20, например, 1, 2, 3, 4, от 2 до 18, от 3 до 16, от 4 до 14, от 6 до 12 или от 8 до 10; причем для каждой из Формул F12-F19:



5 один R_1 из любого B_1 или B_2 представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с лекарственным веществом;

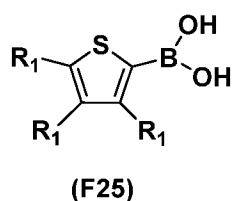
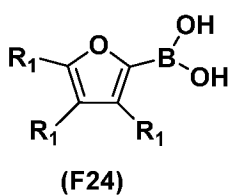
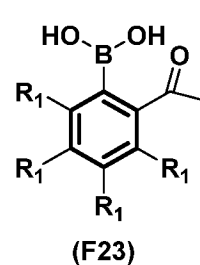
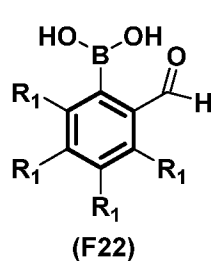
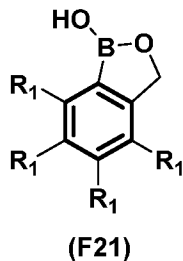
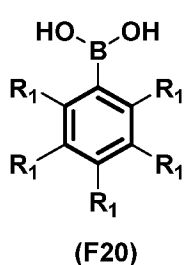
один R_1 в каждом из B_1 и B_2 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где $---$ представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле II;

ни один, один или два R_1 в каждом из B_1 и B_2 независимо представляют собой $COOH$, F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CF_3 , NO_2 , CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$, $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$ или OCF_3 ;

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14, например, от 2 до 12, от 3 до 10, от 4 до 8 или от 5 до 7; и

все остальные R_1 представляют собой H ;

причем для каждой из Формул F20-F25:



один R_1 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где --- представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле II;

либо:

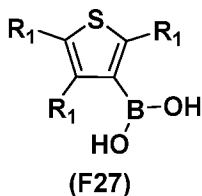
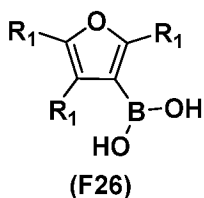
(а) один или два R_1 на одном и том же B_1 и/или B_2 представляют собой $COOH$, причем по меньшей мере один $COOH$ не конъюгирован с лекарственным веществом, и/или

(б) один или два R_1 каждый независимо представляет собой NO_2 , CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$, $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$, где индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14, например, от 2 до 12, от 3 до 10, от 4 до 8 или от 5 до 7, и

ни один, один или два R_1 каждый независимо представляет собой NO_2 , F, Cl, Br, OH, CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CH_3 , CF_3 или OCF_3 , и

все остальные R_1 представляют собой H;

причем для каждой из Формул F26-F27:



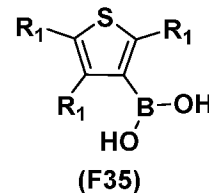
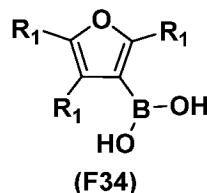
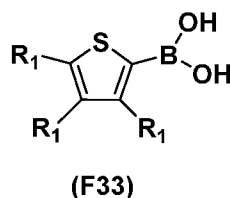
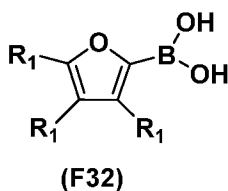
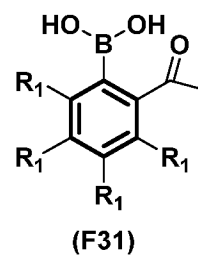
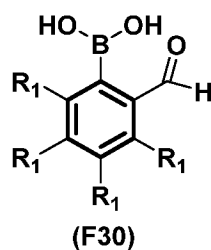
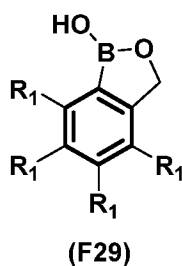
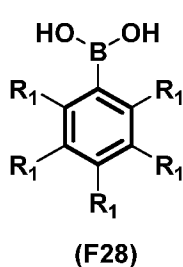
один R_1 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где --- представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле II;

ни один, один или два R_1 каждый независимо представляет собой $COOH$, F, Cl, Br, OH, CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CF_3 , NO_2 , CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$, $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$ или OCF_3 ;

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14, например, от 2 до 12, от 3 до 10, от 4 до 8 или от 5 до 7; и

все остальные R_1 представляют собой H;

причем для каждой из Формул F28-F35:



один R_1 в B_1 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где $---$ представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле II;

5 один R_1 для каждого из B_1 и B_2 представляет собой ковалентную связь между B_1 и B_2 , причем указанная ковалентная связь выбрана из $-(S=O)-$, $-(S(=O)(=O))-$, $-(CF_2)-$, $-(C=O)-$, $-(CH_2)_m-SCH_2CO(CH_2)_k-$, $-(CH_2)_m-S(CH_2)_2CO(CH_2)_k-$ и $-(CH_2)_m(CO)NH(CH_2)_k-$;

либо (i) две группы R_1 в B_2 представляют собой $COOH$, и эти две группы R_1 не
10 конъюгированы с лекарственным веществом, либо (ii) один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой NO_2 , $CH=O$, CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$ или $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$;

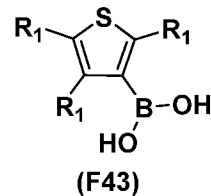
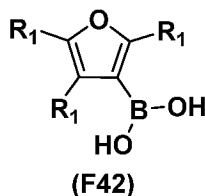
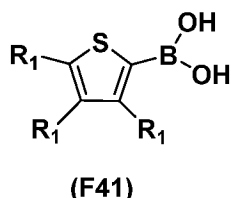
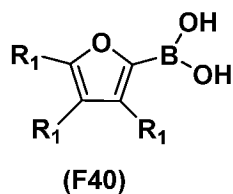
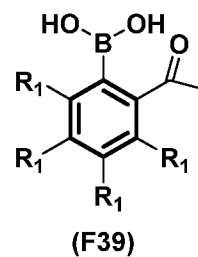
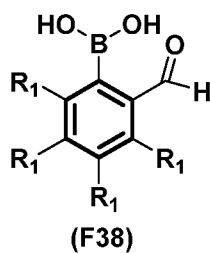
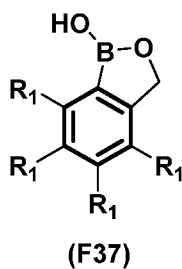
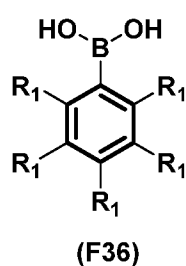
ни один, один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой $CH=O$, F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CH_3 , CF_3 , CHF_2 или OCF_3 ;

15 остальные R_1 представляют собой H ;

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7, например, от 2 до 6 или от 3 до 5; и

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7, например, от 2 до 6 или от 3 до 5;

20 причем для каждой из Формул F36-F43:



один R_1 для каждого из B_1 и B_2 представляет собой ковалентную связь с сульфоксиминной группой так, что B_1 и B_2 связаны друг с другом сульфоксиминной группой, и при этом аминогруппа указанного сульфоксимины ковалентно связана, либо непосредственно посредством линкера, содержащего кислоту, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле II;

либо (i) две группы R_1 в B_1 и/или B_2 представляют собой $COOH$, и эти две группы R_1 не конъюгированы с лекарственным веществом, либо (ii) один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой NO_2 , $CH=O$, CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, —
(SO_2) $NHCH_3$ или —(SO_2) $NH(CH_2)_mCH_3$;

ни один, один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой $CH=O$, F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CH_3 , CF_3 , CHF_2 или OCF_3 ; остальные R_1 представляют собой H ;

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7, например, от 2 до 6 или от 3 до 5; и

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7, например, от 2 до 6 или от 3 до 5.

3. Соединение, включающее лекарственное вещество, характеризующееся тем, что указанное лекарственное вещество включает инсулин, и указанный инсулин содержит одну или более модифицированных аминокислот, представленных Формулой III:

Z-R

(Формула III),

причем в Формуле III

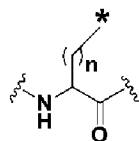
R выбран из Формул FF1-FF24; и

Z выбран из необязательного линкера, $J-SCH_2-\emptyset$, $J-S(CH_2)_2-\emptyset$, $J-NH-\emptyset$, $J-NH(CO)$ линкер— $\emptyset$, $J-S(CH_2)_kNH-\emptyset$ и J —триазол(CH_2) $_kNH-\emptyset$,

где — $\emptyset$ представляет собой ковалентную связь с R ,

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14, например, от 4 до 12, от 5 до 10 или от 6 до 8; и

J описан Формулой III':



5

(Формула III'),

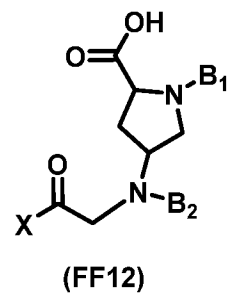
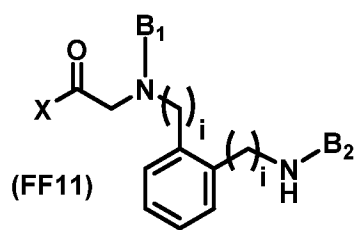
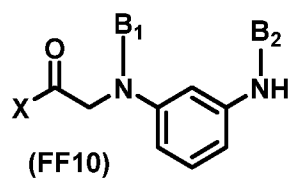
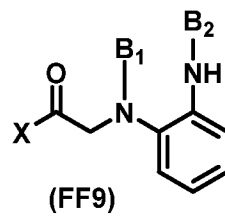
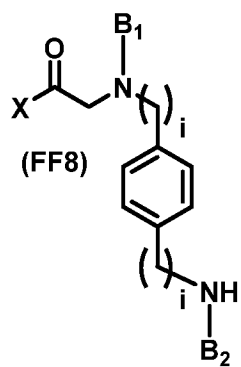
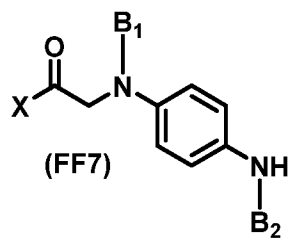
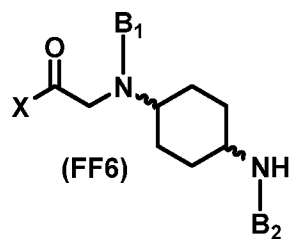
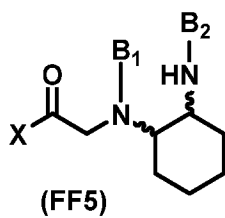
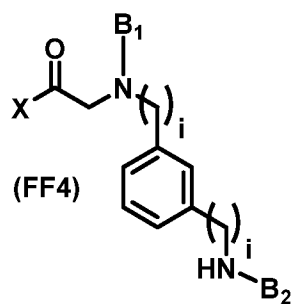
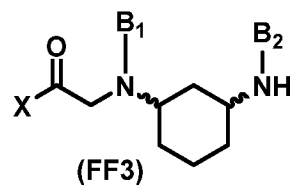
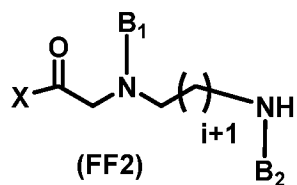
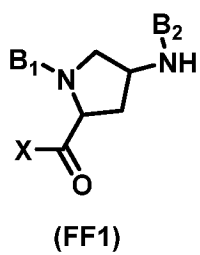
причем в Формуле III':

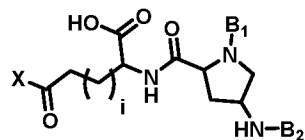
 и  обозначают положения присоединения к остальным частям указанного инсулина;

* обозначает положение присоединения к остальной части Z; и

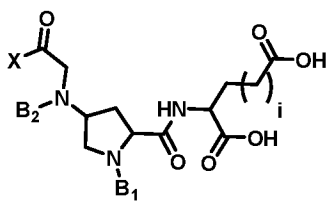
10 индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до 7, от 3 до 6 или от 4 до 5;

причем для Формул FF1-FF24:

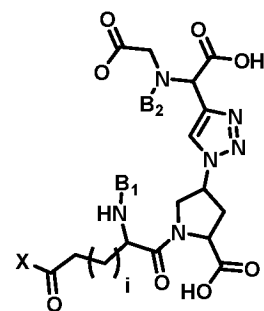




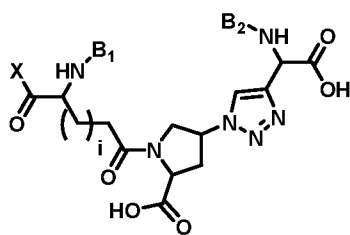
(FF13)



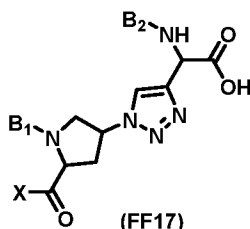
(FF14)



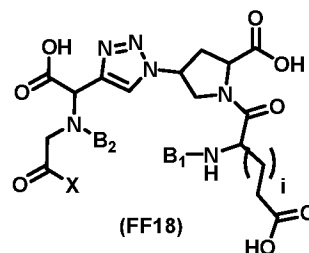
(FF15)



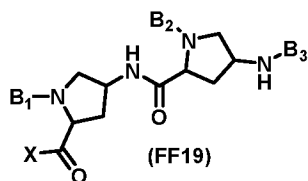
(FF16)



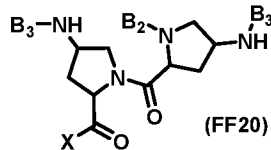
(FF17)



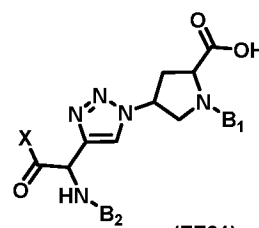
(FF18)



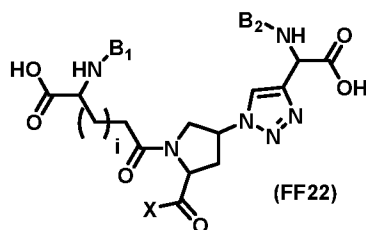
(FF19)



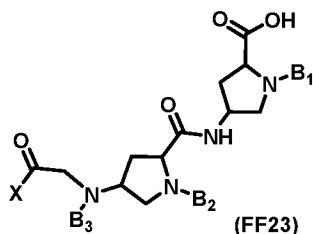
(FF20)



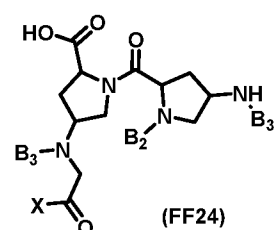
(FF21)



(FF22)



(FF23)



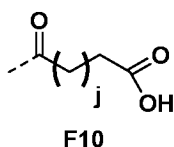
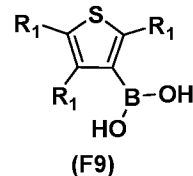
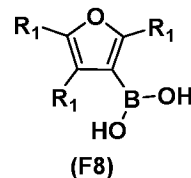
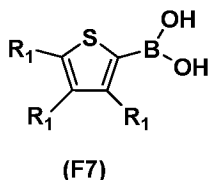
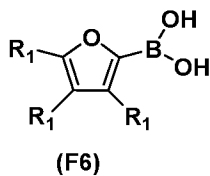
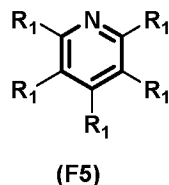
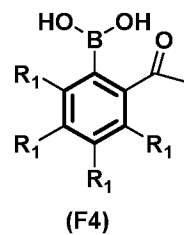
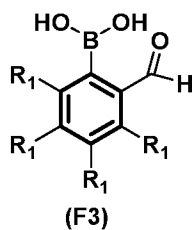
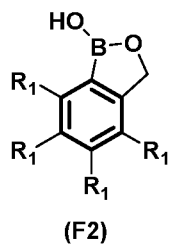
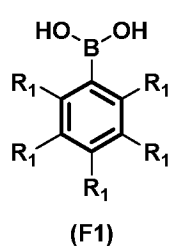
(FF24)

X представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле III;

индекс i представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20, например, от 2 до 18, от 3 до 16, от 4 до 14, от 6 до 12 или от 8 до 10;

B₁ и B₂ являются одинаковыми или различными и каждый независимо представляет собой группу, представленную группой, выбранной из Формул F1-F9; и

B₃ представляет собой группу, представленную группой, выбранной из Формул F1-F11;



причем для каждой из Формул F1-F9:

один R₁ представляет собой (C=O)---, S(=O)(=O)---, (CH₂)_m(C=O)--- или (CH₂)_m---, где --- представляет собой ковалентную связь с остальной частью R;

ни один, один или два R₁ каждый независимо представляет собой F, Cl, Br, OH, CH₂-NH₂, NH₂, (C=O)-NH₂, SO₂CH₃, CF₃, NO₂, CH₃, OCH₃, O(CH₂)_mCH₃, —(SO₂)NH CH₃, —(SO₂)NH(CH₂)_mCH₃ или OCF₃;

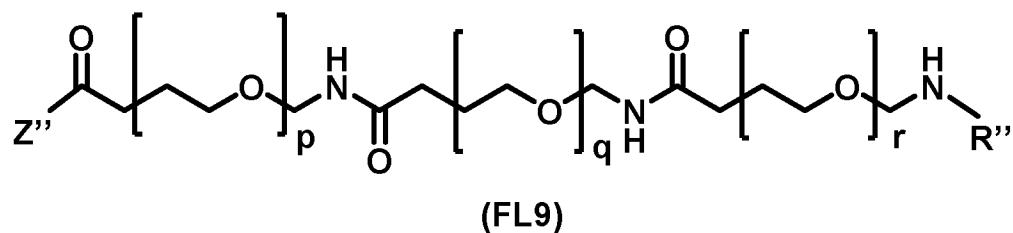
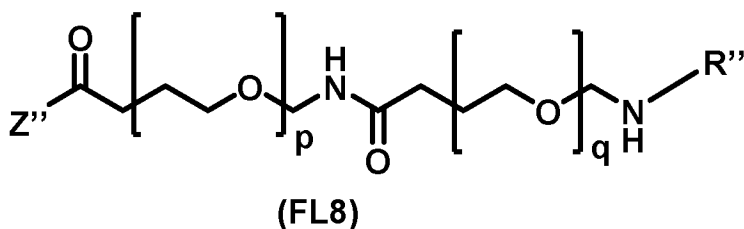
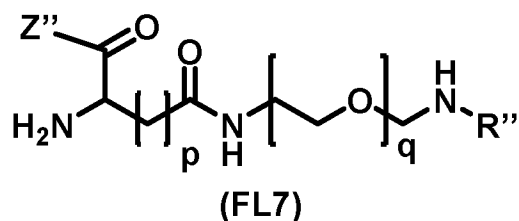
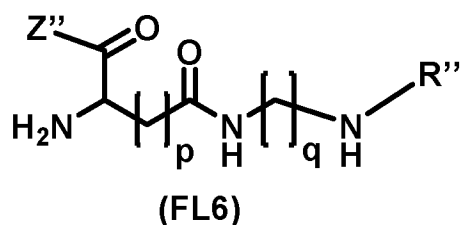
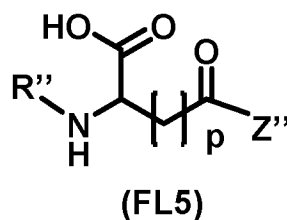
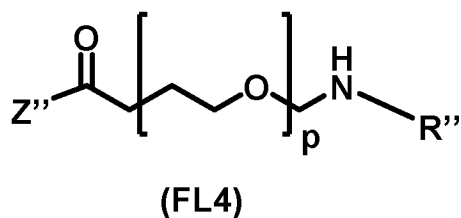
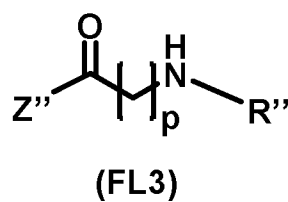
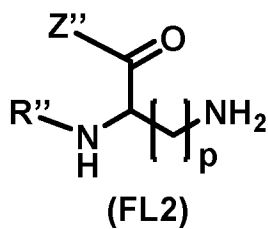
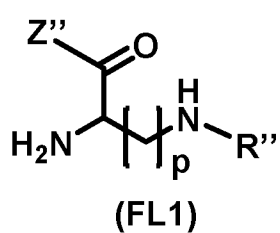
индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14, например, от 2 до 12, от 3 до 10, от 4 до 8 или от 5 до 7;

один R₁ в F5 представляет собой B(OH)₂; и

все остальные R₁ представляют собой H, и

в Формуле F10 индекс j представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 13, например, от 2 до 12, от 3 до 10, от 4 до 8 или от 5 до 7.

4. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3, характеризующееся тем, что указанный необязательный линкер представляет собой L- или D-аминокислоту, имеющую по меньшей мере одну функциональную группу, непосредственно конъюгированную с R, или указанный необязательный линкер выбран из Формул FL1-FL9:



причем в Формулах FL1-FL9:

Z'' представляет собой ковалентную связь с Z;

R'' представляет собой ковалентную связь с R;

5 р представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 5;

q представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 5; и

г представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 5.

5. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3, характеризующееся тем, что указанное соединение представляет собой лекарственное вещество, которое

дополнительно модифицировано как описано в вариантах реализации 1-3, и/или тем, что каждый из одного или более аминов независимо ацетилирован или алкилирован.

6. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3, характеризующееся тем, что указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, включая
5 человеческий инсулин или его аналог, и указанный инсулин включает А-цепь и В-цепь.

7. Соединение по любому из вариантов реализации 1-2, характеризующееся тем, что указанное лекарственное вещество включает полипептидное лекарственное вещество или человеческий пептидный гормон.

8. Соединение по варианту реализации 6, характеризующееся тем, что указанный
10 инсулин включает одну или две пептидные последовательности, каждая из которых независимо добавлена к указанной А-цепи и/или В-цепи инсулина, и каждая пептидная последовательность независимо включает от 1 до 20 смежных остатков, например, от 2 до 18, от 3 до 16, от 4 до 14, от 6 до 12 или от 8 до 10 смежных остатков.

9. Соединение по варианту реализации 6, характеризующееся тем, что указанный
15 инсулин включает от 2 до 10 аминокислот, каждая из которых независимо модифицирована, как описано Формулами I, II или III.

10. Соединение по варианту реализации 6, характеризующееся тем, что указанный
инсулин включает одну или более модификаций, каждая из которых независимо описана Формулами I, II или III, причем каждая из указанной одной или более модификаций
20 расположена:

(i) на боковой цепи аминокислоты и/или на N-конце полипептида, включающего до
20 остатков, присоединенного к N- и/или C-концу указанной А-цепи и/или В-цепи инсулина; и/или

(ii) в пределах 4 остатков от остатков B1, B21, B22, B29, A1, A22 или A3 в
25 указанной А- или В-цепи инсулина; и/или

(iii) на боковой цепи аминокислоты и/или на N-конце полипептида, присоединенного или встроенного в указанную А-цепь и/или В-цепь инсулина, причем указанный полипептид включает последовательность $(X_2)_nX_1(X_2)_m$ (SEQ ID NO:3), где: X_1 представляет собой остаток лизина, в котором боковая цепь
30 указанного остатка лизина модифицирована, как описано Формулами I, II или III; каждый X_2 независимо выбран из группы аминокислот K, P, E, G, N, M, A, R, L, W, S, F, V, C, H, D, I, Y, Q, T или X_1 ; индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 20 (например, от 1 до 18, от 2 до 16, от 3 до 14, от 4 до 12, от 5 до 10 или от 6 до 8); и индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 18
35 (например, от 1 до 16, от 2 до 14, от 3 до 12, от 4 до 10, от 5 до 9 или от 6 до 8). SEQ

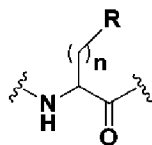
ID NO:3 представляет собой самый длинный вариант полипептидной последовательности и включает ее более короткие подпоследовательности.

11. Конъюгат, включающий соединение по любому из вариантов реализации 1-2, характеризующийся тем, что указанное соединение по любому из вариантов реализации 1-2 конъюгировано, либо непосредственно, либо посредством ковалентного линкера, с лекарственным веществом, при условии, что указанная конъюгация осуществляется не через Z, если Z представляет собой NH_2 в Формуле II.

12. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3, характеризующееся тем, что указанное соединение по любому из вариантов реализации 1-3 применяют в качестве промежуточного соединения для изготовления любых соединений по вариантам реализации 1-11.

13. Соединение по любому из вариантов реализации 5-6, характеризующееся тем, что указанное соединение содержит одну или более модификаций, описанных Формулами IV, V или VI,

причем для Формулы IV:

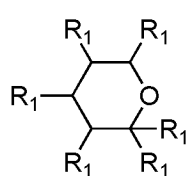


(Формула IV),

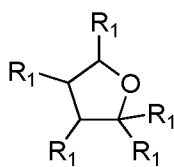
и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного лекарственного вещества;

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до 7, от 3 до 6 или от 4 до 5; и

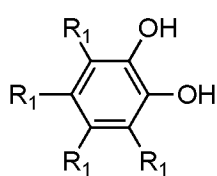
R выбран из группы, состоящей из формул F111, F222, F333, F444 и F555:



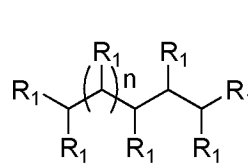
(F111)



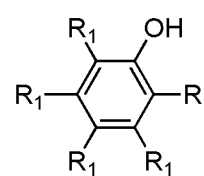
(F222)



(F333)



(F444)



(F555)

причем в Формулах F111, F222, F333, F444 и F555:

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до 7, от 3 до 6 или от 4 до 5;

каждый атом углерода, присоединенный к R^1 , независимо имеет (R) или (S) стереохимию;

каждый R_1 независимо выбран из $-\text{H}$, $-\text{OR}^3$, $-\text{N}(\text{R}^3)_2$, $-\text{SR}^3$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OR}^5$, $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{R}^3$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHOH}$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{OR}^5$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{R}^4$, $-\text{OR}^8$, $-\text{R}^6$, $-\text{R}^8$ и $-\text{R}^7$,

5 каждый R^3 независимо выбран из $-\text{H}$, ацетила, фосфата, $-\text{R}^2$, $-\text{SO}_2\text{R}^2$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^2)_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{CO}_2\text{R}^2$ и $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)_2$,

каждый R^2 независимо выбран из $-\text{H}$, необязательно замещенного C_{1-6} алифатического кольца, необязательно замещенного фенильного кольца, необязательно замещенного 5-6-членного моноциклического гетероарильного кольца, имеющего 1-4 гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы, 4-7-
10 членного гетероциклического кольца, имеющего 1-2 гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы, и алкильной или амидной ковалентной связи с R в Формуле IV,

каждый R^4 независимо выбран из $-\text{H}$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^3$, $-\text{N}(\text{R}^3)_2$, $-\text{OR}^5$ и $-\text{SR}^3$;

15 каждый R^5 независимо выбран из моносахарида, дисахарида, трисахарида, пентозы и гексозы,

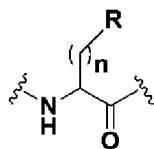
каждый R^6 независимо выбран из $-\text{NCOCH}_2-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$, $-\text{O}-\text{C}_{1-9}$ алкиленовой группы и замещенной C_{1-9} алкиленовой группы, в которой одна или более метиленовых групп необязательно замещены $-\text{O}-$, $-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{OCH}_2-$,
20 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})-$, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^2)-$, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{SO}_2-$, $-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}^2)-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)-$ или $-\text{N}(\text{R}^2)\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^2)-$, где индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до 7, от 3 до 6 или от 4 до 5,

каждый R^7 независимо выбран из $-\text{N}(\text{R}^2)_2$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{SH}$, $-\text{OR}^2$, $-\text{SR}^2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{C}\equiv\text{CR}^2$, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CO}_2\text{R}^2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^2$,
25 $-\text{OSO}_2\text{R}^2$, $-\text{N}(\text{R}^2)_2$, $-\text{OR}^2$, $-\text{SR}^2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, и непосредственной связи с R в Формуле IV,

R^8 представляет собой (i) боковую цепь одного из L-серина, D-серина, L-треонина, D-треонина, L-аллотреонина или D-аллотреонина и соответствует R в
30 Формуле IV, где индекс $n=1$ в Формуле IV, (ii) амидную связь с C-концом лизина, цистеина, 2,3-диаминопропионовой кислоты или (iii) $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, и

структуры F111, F222, F333, F444 и/или F555 необязательно включают одну или более ацетильных, ацетиленовых, ацетонидных и/или пинаколовых защитных групп;

35 причем для Формулы V:



(Формула V),

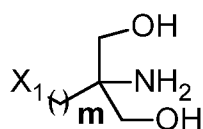
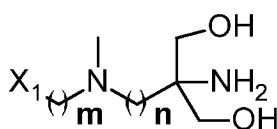
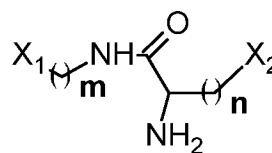
$\sim$ и $\sim$ обозначают положения присоединения к остальным частям указанного лекарственного вещества;

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до 7, от 3 до 6 или от 4 до 5;

R представляет собой X-Y,

где X представляет собой ковалентную связь, выбранную из группы, состоящей из триазола, амидной связи, иминной связи или тиоэфирной связи;

Y выбран из группы, состоящей из структур, представленных Формулами F200-F203:

(F₂₀₀)(F₂₀₁)(F₂₀₂)

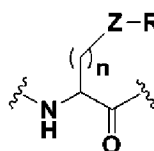
X₁ представляет собой ковалентную связь с X;

X₂ представляет собой SH, OH или NH₂;

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до 7, от 3 до 6 или от 4 до 5; и

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до 7, от 3 до 6 или от 4 до 5;

причем для Формулы VI:



(Формула VI),

$\sim$ и $\sim$ обозначают положения присоединения к остальным частям указанного лекарственного вещества;

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до

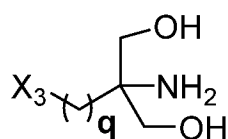
7, от 3 до 6 или от 4 до 5;

Z выбран из группы, состоящей из: аминокислоты, $-(CH_2)_p-$, $-CH_2(OCH_2CH_2)_p-$, $-SCH_2-$, $-S(CH_2)_2-$, $-NH-$, $-NH(CO)-$, $-(CO)NH-$, $-S(CH_2)_kNH-$, —триазол— $(CH_2)_k-NH-$, триазола, амидной связи, иминной связи и тиоэфирной связи;

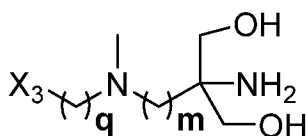
5 индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 5;

индекс p представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до 7, от 3 до 6 или от 4 до 5; и

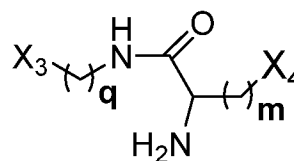
R выбран из группы, состоящей из структур, представленных Формулами F203-F205:



(F203)



(F204)



(F205)

где X₃ представляет собой ковалентную связь с Z;

X₄ представляет собой SH, OH или NH₂

индекс q представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до 7, от 3 до 6 или от 4 до 5; и

15 индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8, например, от 2 до 7, от 3 до 6 или от 4 до 5.

14. Способ изготовления соединения по любому из вариантов реализации 1-13, характеризующийся тем, что В₁ и В₂ необязательно сначала конъюгируют с одной из структур, представленных FF1-FF33, а затем полученный конъюгат ковалентно связывают с лекарственным веществом, или необязательно структуры, представленные FF1-FF33, сначала конъюгируют с лекарственным веществом, а затем В₁ и В₂ ковалентно связывают с соответствующими структурами в FF1-FF33.

15. Способ введения соединения по любому из вариантов реализации 1-13 субъекту-человеку в качестве терапевтического или профилактического агента.

16. Соединение по любому из вариантов реализации 1-13, характеризующееся тем, что одна или более аминогрупп независимо ацетилированы или алкилированы.

17. Соединение по варианту реализации 6, характеризующееся тем, что указанный инсулин включает две, три или четыре модификации, каждая из которых независимо описана Формулами I, II или III.

18. Соединение по вариантам реализации 1-3, характеризующееся тем, что указанное лекарственное вещество представляет собой человеческий полипептидный

гормон или пептид, имеющий по меньшей мере 10% гомологии с одним, двумя, тремя или четырьмя различными человеческими пептидными гормонами и включающий двойные или тройные агонисты, гибридные синтетические пептиды на основе одного или более человеческих полипептидных гормонов или их аналогов.

5 19. Соединение по вариантам реализации 1-3, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин и аминокислота в остатке 21 В-цепи представляет собой модифицированную аминокислоту, представленную Формулами I, II или III.

10 20. Соединение по вариантам реализации 1-3, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, и в котором каждый из одного или более остатков, которые находятся в пределах 4 остатков от остатка 22 В-цепи инсулина, независимо представлен Формулами I, II или III, и один или более дополнительных остатков в полипептиде, присоединенном к С- и/или N-концу В- и/или А-цепи, независимо представлены Формулами I, II или III.

15 21. Соединение по вариантам реализации 1-3, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что указанные модифицированные аминокислоты либо заменяют аминокислоту в определенном остатке в пептидной последовательности А- и/или В-цепи, либо указанные модифицированные аминокислоты присоединены к пептидной последовательности А- и/или В-цепи на концах и/или внутри пептидных последовательностей А- и/или В-цепи.

20 22. Соединение по вариантам реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, и характеризующееся тем, что указанная аминокислота в остатке 21 В-цепи представляет собой модифицированную аминокислоту, представленную Формулами IV, V или VI, и остаток на С-конце А-цепи представлен Формулами I, II или III.

25 23. Соединение по вариантам реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, в котором каждый из одного или более остатков, которые находятся в пределах 4 остатков С-конца А-цепи или которые присоединены к С-концу А-цепи, независимо представлен Формулами I, II или III, и каждый из одного или более остатков, которые находятся в пределах 4 остатков от остатка 22 В-цепи, независимо представлен Формулами IV, V или VI.

30 24. Соединение по вариантам реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, в котором каждый из одного или более остатков, которые находятся в пределах 4 остатков С-конца А-цепи или которые присоединены к С-концу А-цепи, независимо представлен Формулами IV, V или VI, и

35

каждый из одного или более остатков, которые находятся в пределах 4 остатков от остатка 22 В-цепи, независимо представлен Формулами I, II или III.

25. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что две модифицированные аминокислоты введены в В-цепь инсулина в любом положении между С-концевым цистеином В-цепи и С-концом В-цепи, и две дополнительные модифицированные аминокислоты введены в любом месте А-цепи инсулина, в том числе присоединены к одному или обоим концам указанной А-цепи.

26. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что один или более остатков находятся (i) в пределах 4 остатков от остатка 21 В-цепи и/или (ii) в пределах 6 остатков N- или С-конца А- и/или В-цепи и/или (iii) в пределах 4 остатков от остатка 13 А-цепи и/или (iv) каждый независимо представлен Формулами I, II, III, IV, V или VI, и каждый из одного или более остатков, которые находятся в пределах 4 остатков от С-конца А-цепи, независимо представлен Формулами I, II, III, IV, V или VI.

27. Модифицированный инсулин по любому из вариантов реализации 1, 2 или 3, в котором две или более аминокислот В-цепи в диапазоне от В1 до В29 заменены природными или неканоническими, или искусственными аминокислотами.

28. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, в котором одна или более аминокислот А- или В-цепи заменены природными или неканоническими аминокислотами.

29. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что указанный инсулин дополнительно конъюгирован, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с полипептидом, включающим до 31 аминокислоты.

30. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что указанный инсулин конъюгирован на N- или С-конце А- или В-цепи с полипептидом, включающим до 31 аминокислоты.

31. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что указанный инсулин конъюгирован на N- или С-конце А- или В-цепи с полипептидом,

включающим до 31 аминокислоты, и указанный полипептид соединен с указанным инсулином пептидной связью.

32. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что указанный инсулин дополнительно конъюгирован, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с полипептидом, включающим до 31 аминокислоты, и при этом одна или более пар боковых цепей указанного полипептида ковалентно связаны, и согласно определенным вариантам реализации указанная ковалентная связь между боковыми цепями представляет собой связь, выбранную из группы, состоящей из триазольной связи, связи, полученной в результате азид-алкинового циклоприсоединения, дисульфидной связи, тиоэфирной связи, оксимной связи, амидной связи, лактамной связи, сложноэфирной связи, олефиновой связи, иминной связи, сложноэфирной связи и тиоэфирной связи.

33. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что по меньшей мере одна первичная или одна вторичная аминогруппа в R в Формуле I ковалентно конъюгирована посредством амидной связи с боковой цепью L- и D-гамма-глутаминовой кислоты, и N-конец указанной глутаминовой кислоты ковалентно конъюгирован посредством амидной связи с незамещенной или монозамещенной алкильной цепью двухосновной кислоты, содержащей от 3 до 16 атомов углерода, например, от 4 до 14, от 5 до 12, от 6 до 11 или от 7 до 9 атомов углерода.

34. Модифицированный инсулин по варианту реализации 2, характеризующийся тем, что для Формулы FF25 индекс i равен 0.

35. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что от 1 до 10 аминокислот присоединены к полипептидной последовательности инсулина, и они присоединены на N-конце к остаткам 1 В-цепи инсулина, и при этом указанный остаток, который вставлен на N-конце к остаткам 1, представляет собой модифицированную аминокислоту, описанную Формулами I, II или III.

36. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что от 1 до 10 аминокислот присоединены к С-концу В-цепи инсулина, и при этом указанный остаток в положении В29 указанного инсулина представляет собой модифицированную аминокислоту, описанную Формулой I.

37. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что к полипептидной последовательности инсулина присоединено до 6 остатков, и при этом по меньшей мере два из них представляют собой модифицированные аминокислоты, описанные Формулами I-VI.

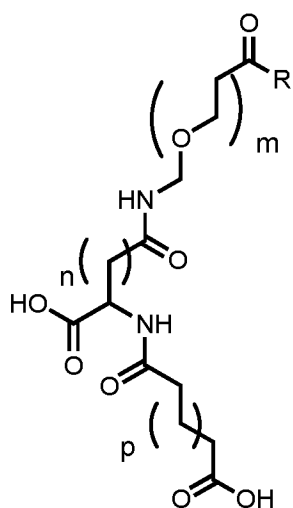
38. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, и указанный инсулин модифицирован так, что он имеет 4 или 5 внутримолекулярных дисульфидных связей.

39. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, и указанный инсулин связан с полипептидом с использованием фермента.

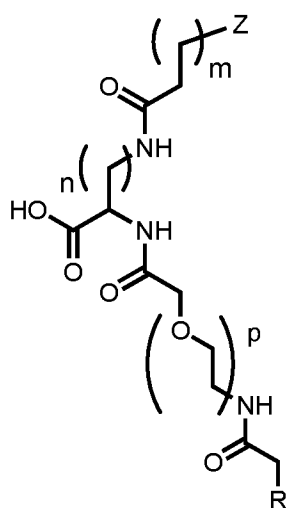
40. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, и указанный инсулин связан с неборонированным полипептидом, включающим до 31 аминокислоты, с использованием фермента.

41. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, характеризующееся тем, что указанный инсулин связан с полипептидом, включающим до 31 аминокислоты, и боковые цепи по меньшей мере двух аминокислот в полипептидной последовательности ковалентно связаны вместе или необязательным линкером.

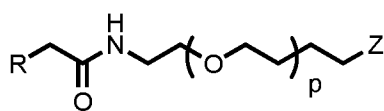
42. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, характеризующееся тем, что указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, и указанный инсулин ковалентно конъюгирован с использованием амидной связи со структурами, описанными Формулами F411-F416, или структурами, включающими структуру, в которой F411 дополнительно ковалентно конъюгирован с использованием амидных связей со структурами, описанными Формулами F412-F416,



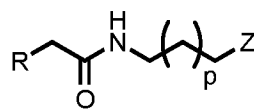
(F411)



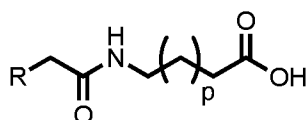
(F412)



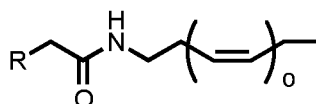
(F413)



(F414)



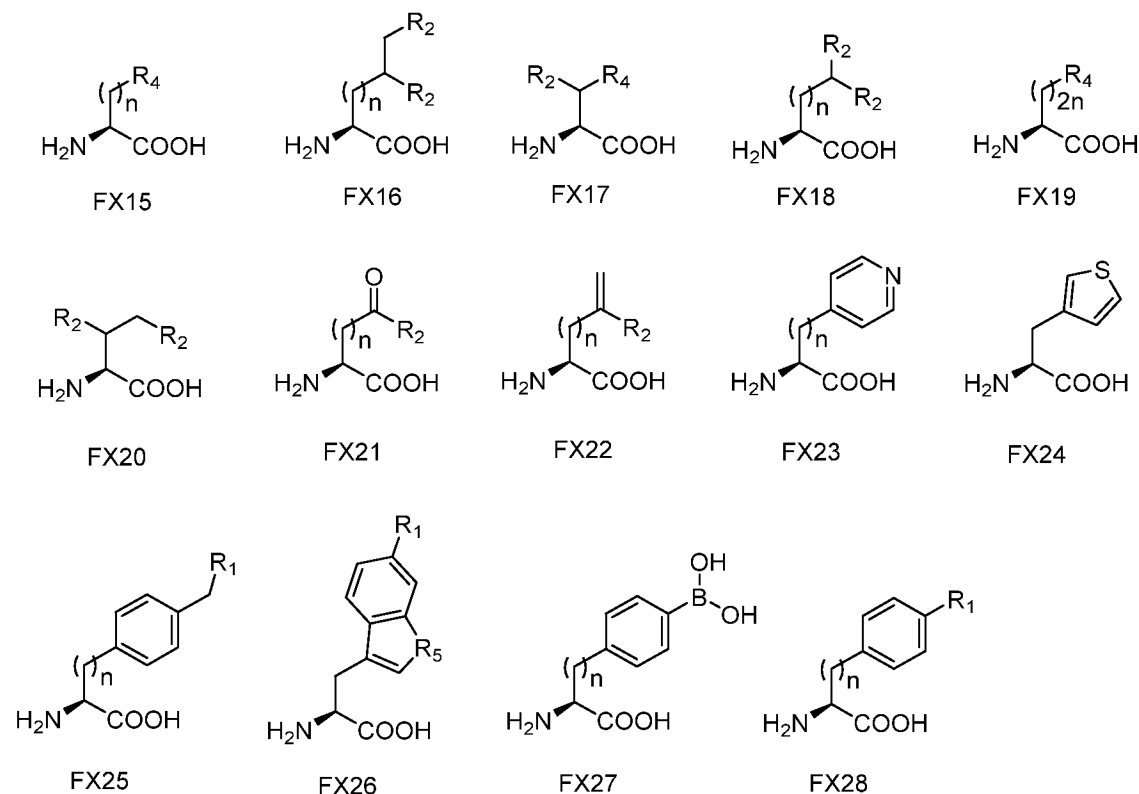
(F415)



(F416)

где R представляет собой первичный или вторичный амин либо на N-конце указанного модифицированного инсулина, либо первичный или вторичный амин в боковых цепях подгруппы аминокислот в указанном модифицированном инсулине, причем присоединение к R представляет собой положение присоединения к указанному модифицированному инсулину; индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14 (например, от 2 до 12, от 3 до 10, от 4 до 8 или от 5 до 7), индекс m представляет целое число в диапазоне от 1 до 12 (например, от 3 до 10, от 4 до 8 или от 5 до 7), индекс o представляет целое число в диапазоне от 1 до 6 (например, от 2 до 5 или от 3 до 4), индекс p представляет целое число в диапазоне от 1 до 12 (например, от 3 до 10, от 4 до 8 или от 5 до 7), Z представляет собой одно из $-(C=O)-OH$, $-NH_2$, холестерина, 7-OH холестерина, 7,25-дигидроксихолестерина, хелевой кислоты, хенодезоксихолевоы кислоты, литохолевоы кислоты, дезоксихолевоы кислоты, гликохалевоы кислоты, гликодезоксихолевоы кислоты, гликолитохалевоы кислоты, гликохенодезоксихолевоы кислоты, α -токоферола, β -токоферола, γ -токоферола, δ -токоферола, α -токотриенола, β -токотриенола, γ -токотриенола или δ -токотриенола.

43. Соединение по любому из вариантов реализации 1-3 и 13, характеризующееся тем, что указанное лекарственное вещество включает одну или более из структур, представленных Формулами FX15-FX28:



- 5 где
- каждый R_1 независимо выбран из H, NH_2 , NO_2 , Cl, CF_3 , I, COCH_3 , CN, $\text{C}\equiv\text{CH}$, N_3 или Br;
- каждый R_2 независимо выбран из CF_3 , H или CH_3 ;
- каждый R_3 независимо выбран из $\text{C}\equiv\text{CH}$, H, N_3 или винильной группы;
- 10 каждый R_4 независимо выбран из NH_2 , R_2 или R_3 ;
- каждый R_5 независимо выбран из S или NH; и
- индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4, например, от 2 до 3.

Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в отношении

15 определенных примерных вариантов реализации, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается раскрытыми вариантами реализации, а напротив предназначено для охвата различных модификаций и эквивалентных вариантов, включенных в сущность и объем следующей формулы изобретения и ее эквивалентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное Формулой I:

Z-R

(Формула I),

причем в Формуле I

R выбран из Формул FF1-FF24; и

Z выбран из одного из:

a) NH_2 или OH ,

b) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством
необязательного линкера, с лекарственным веществом,

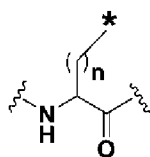
c) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством
необязательного линкера, с N-концевым амином или эpsilon-аминогруппой
одной или более аминокислот в полипептидном лекарственном веществе, и

d) группы, представленной $\text{J-SCH}_2-\emptyset$, $\text{J-S(CH}_2)_2-\emptyset$, $\text{J-NH}-\emptyset$, $\text{J-NH}-$
(необязательный линкер)— $\emptyset$, $\text{J-S(CH}_2)_k\text{NH}-\emptyset$ или $\text{J-триазол(CH}_2)_k\text{NH}-$
 $\emptyset$;

где $-\emptyset$ представляет собой ковалентную связь с R;

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14; и

J представляет собой аминокислоту или одну или более аминокислот в
полипептидном лекарственном веществе, причем каждая из указанной
одной или более аминокислот в указанном полипептидном лекарственном
веществе представлена Формулой I':



(Формула I'),

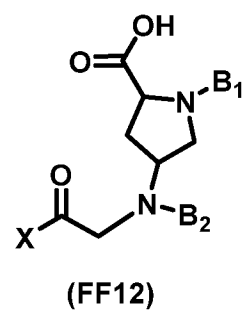
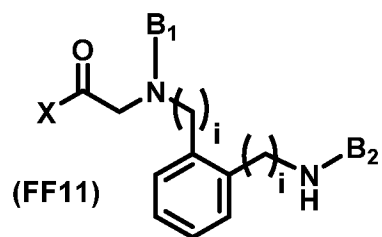
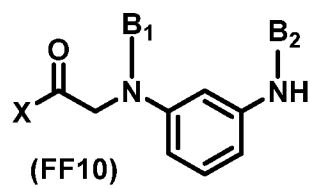
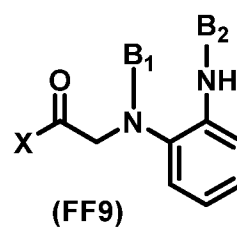
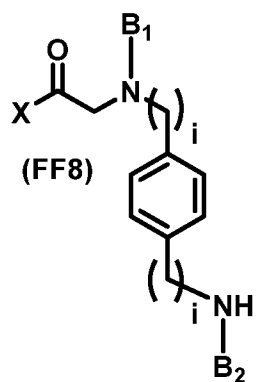
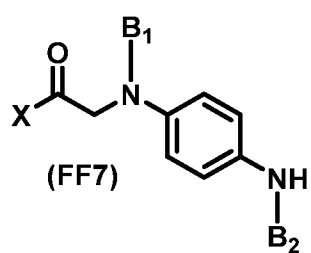
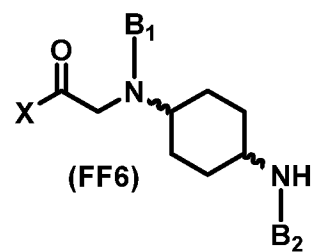
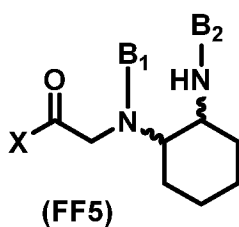
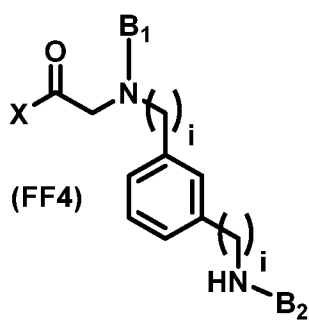
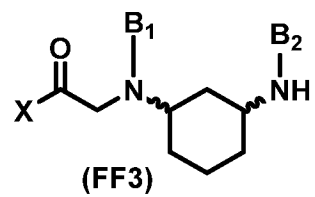
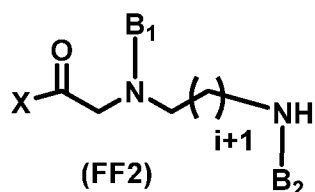
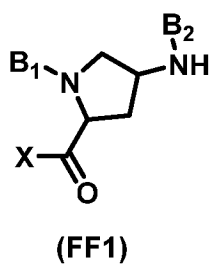
причем в Формуле I'

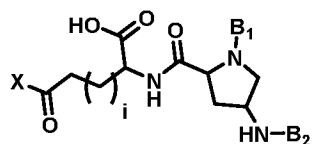
и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного
полипептидного лекарственного вещества;

*обозначает положение присоединения к остальной части Z; и

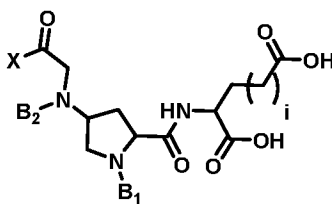
индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8,

причем для Формул FF1-FF24:

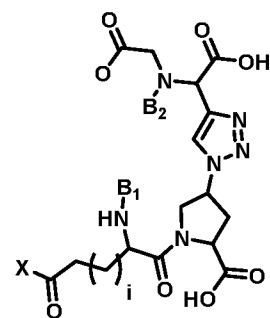




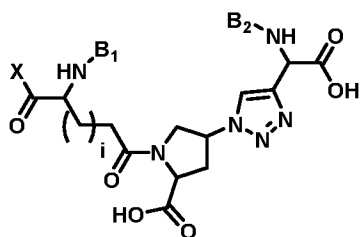
(FF13)



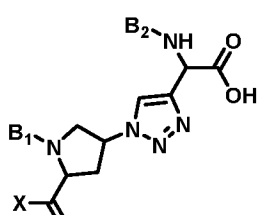
(FF14)



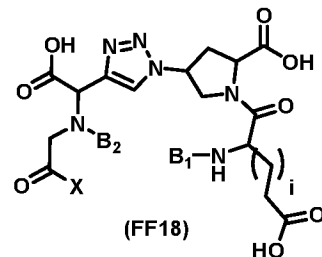
(FF15)



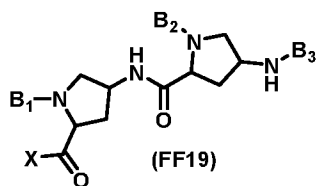
(FF16)



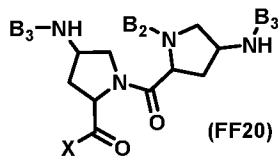
(FF17)



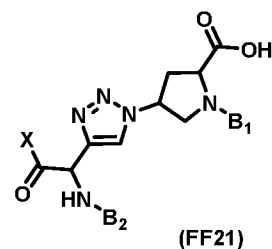
(FF18)



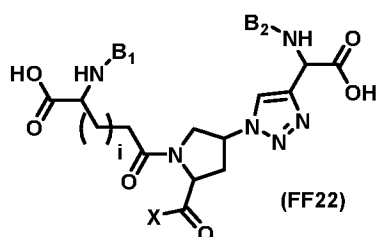
(FF19)



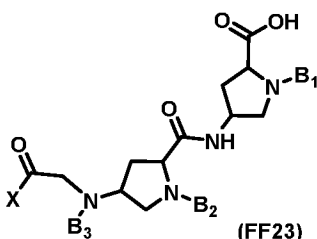
(FF20)



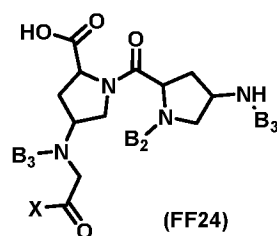
(FF21)



(FF22)



(FF23)



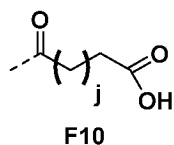
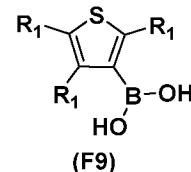
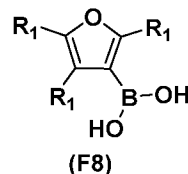
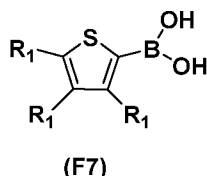
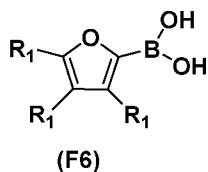
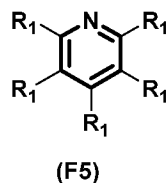
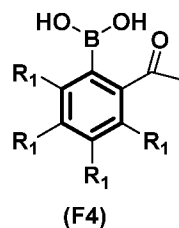
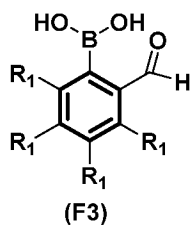
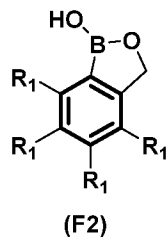
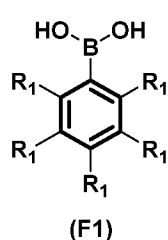
(FF24)

X представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле I;

индекс i представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20;

В₁ и В₂ являются одинаковыми или различными и каждый независимо представляет собой группу, выбранную из Формул F1-F9; и

В₃ представляет собой группу, выбранную из Формул F1-F11,



причем для каждой из Формул F1-F9:

один R₁ представляет собой (C=O)---, S(=O)(=O)---, (CH₂)_m(C=O)--- или (CH₂)_m---, где --- представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле I;

ни один, один или два R₁ каждый независимо представляет собой F, Cl, Br, OH, CH₂-NH₂, NH₂, (C=O)-NH₂, SO₂CH₃, CF₃, NO₂, CH₃, OCH₃, O(CH₂)_mCH₃, —(SO₂)NH CH₃, —(SO₂)NH(CH₂)_mCH₃ или OCF₃,

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14;

один R₁ в F5 представляет собой B(OH)₂, и

все остальные R₁ представляют собой H, и

в Формуле F10 индекс j представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 13.

2. Соединение, представленное Формулой II:

Z-R

(Формула II),

причем в Формуле II либо:

(i) R выбран из Формул FF25-FF31;

B₁ и B₂ в FF25-FF31 являются одинаковыми или различными и каждый независимо выбран из Формул F12-F19; и

Z представляет собой NH₂ и не конъюгирован с каким-либо лекарственным веществом;

либо

(ii) R выбран из Формул FF25-FF31;

B₁ и B₂ каждый независимо выбран из Формул F20-F27; и

Z выбран из одного из:

- a) OH
- b) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с лекарственным веществом,
- 5 c) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с N-концевым амином или эpsilon-аминогруппой одной или более аминокислот в полипептидном лекарственном веществе, и
- d) группы, представленной $J-SCH_2-\emptyset$, $J-S(CH_2)_2-\emptyset$, $J-NH-\emptyset$, $J-NH-(\text{необязательный линкер})-\emptyset$, $J-S(CH_2)_kNH-\emptyset$ или $J-\text{триазол}(CH_2)_kNH-\emptyset$,
 10 где $-\emptyset$ представляет собой ковалентную связь с R,
 индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14; и
 J представляет собой аминокислоту или одну или более аминокислот
 15 в полипептидном лекарственном веществе, причем каждая из
 указанной одной или более аминокислот в указанном полипептидном
 лекарственном веществе представлена Формулой II';

либо

(iii) R выбран из Формул FF32-FF33,

В₁ и В₂ в FF32 каждый независимо выбран из Формул F28-F35;

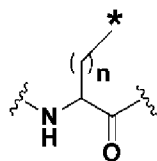
В₁ и В₂ в FF33 каждый независимо выбран из Формул F36-F43; и

Z выбран из одного из:

- a) лекарственного вещества,
- b) ковалентной связи, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с N-концевым амином или эpsilon-аминогруппой аминокислоты в полипептидном лекарственном веществе, и
- 25 c) группы, представленной $J-SCH_2-\emptyset$, $J-S(CH_2)_2-\emptyset$, $J-NH-\emptyset$, $J-NH-(\text{необязательный линкер})-\emptyset$, $J-S(CH_2)_kNH-\emptyset$ или $J-\text{триазол}(CH_2)_kNH-\emptyset$,
 30 где $-\emptyset$ представляет собой ковалентную связь с R,
 индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14; и
 J представляет собой аминокислоту или одну или более аминокислот
 в полипептидном лекарственном веществе, причем каждая из

указанной одной или более аминокислот в указанном полипептидном лекарственном веществе представлена Формулой II';

причем для Формулы II':



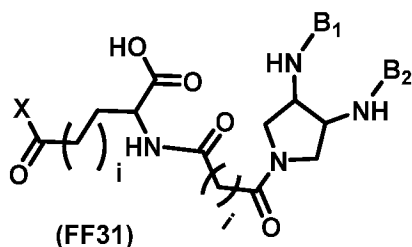
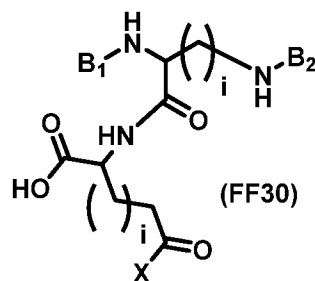
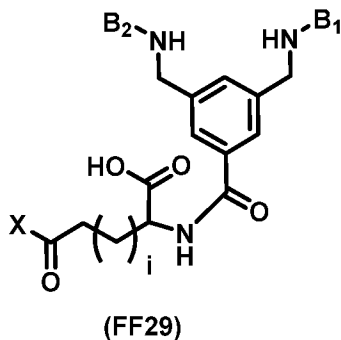
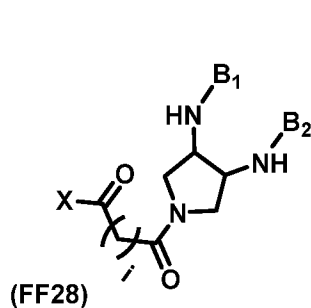
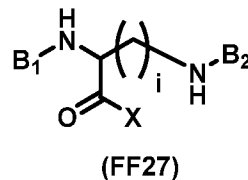
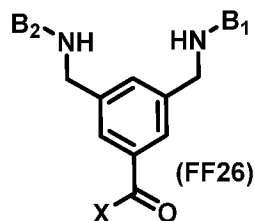
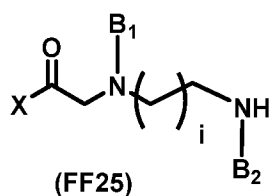
(Формула II'),

и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного полипептидного лекарственного вещества;

* обозначает положение присоединения к остальной части Z; и

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

причем для Формул FF25-FF33:



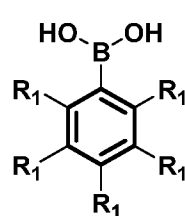
X-B₁B₂
(FF32)

B₁-B₂
(FF33)

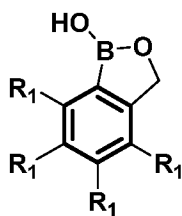
X представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле II; и

индекс i представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20;

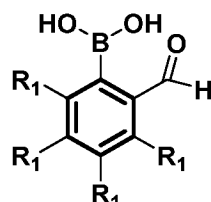
причем для каждой из Формул F12-F19:



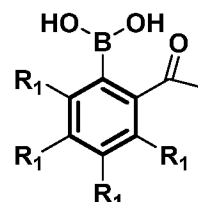
(F12)



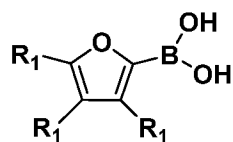
(F13)



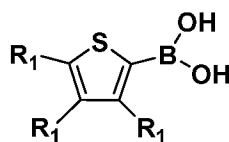
(F14)



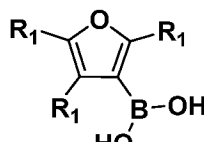
(F15)



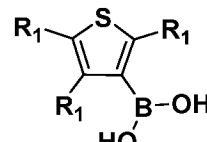
(F16)



(F17)



(F18)



(F19)

один R_1 из любого B_1 или B_2 представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с лекарственным веществом;

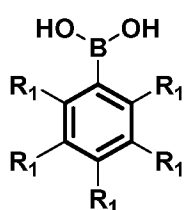
5 один R_1 в каждом из B_1 и B_2 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где $---$ представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле II;

ни один, один или два R_1 в каждом из B_1 и B_2 независимо представляют собой $COOH$, F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CF_3 , NO_2 , CH_3 , OCH_3 ,
10 $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$, $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$ или OCF_3 ;

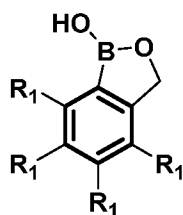
индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14; и

все остальные R_1 представляют собой H ;

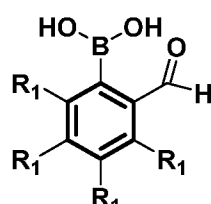
причем для каждой из Формул F20-F25:



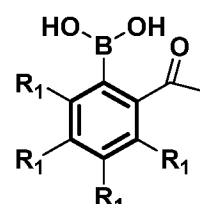
(F20)



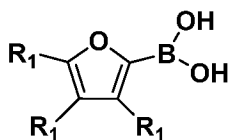
(F21)



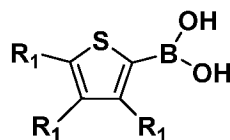
(F22)



(F23)



(F24)



(F25)

15 один R_1 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где $---$ представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле II;
либо:

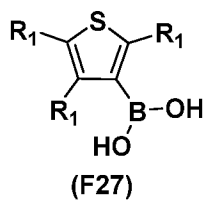
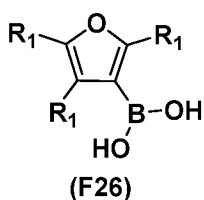
(a) один или два R_1 на одном и том же B_1 и/или B_2 представляют собой $COOH$, причем по меньшей мере один $COOH$ не конъюгирован с лекарственным веществом, и/или

(b) один или два R_1 каждый независимо представляет собой NO_2 , CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$, $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$, где индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14, и

ни один, один или два R_1 каждый независимо представляет собой NO_2 , F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CH_3 , CF_3 или OCF_3 , и

все остальные R_1 представляют собой H ;

10 причем для каждой из Формул F26-F27:



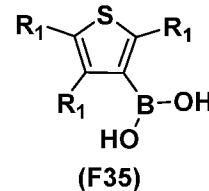
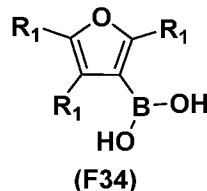
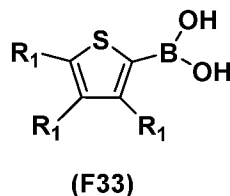
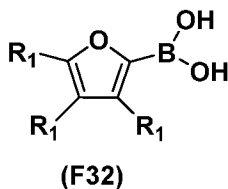
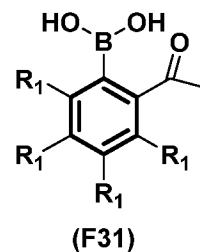
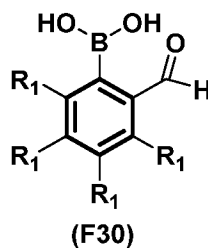
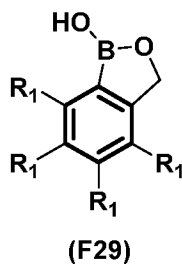
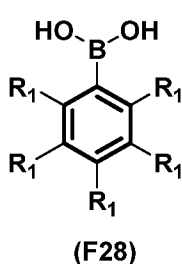
один R_1 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где $---$ представляет собой ковалентную связь с остальной частью R в Формуле II;

ни один, один или два R_1 каждый независимо представляет собой $COOH$, F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CF_3 , NO_2 , CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$, $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$ или OCF_3 ;

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14; и

все остальные R_1 представляют собой H ;

причем для каждой из Формул F28-F35:



один R_1 в B_1 представляет собой $(C=O)---$, $S(=O)(=O)---$, $(CH_2)_m(C=O)---$ или $(CH_2)_m---$, где $---$ представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле II;

один R_1 для каждого из B_1 и B_2 представляет собой ковалентную связь между B_1 и B_2 , причем указанная ковалентная связь выбрана из $-(S=O)-$, $-(S(=O)(=O))-$, $-(CF_2)-$, $-(C=O)-$, $-(CH_2)_mSCH_2CO(CH_2)_k-$, $-(CH_2)_mS(CH_2)_2CO(CH_2)_k-$ и $-(CH_2)_m(CO)NH(CH_2)_k-$;

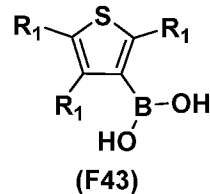
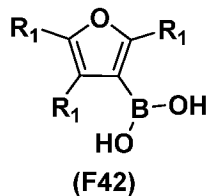
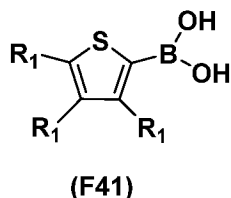
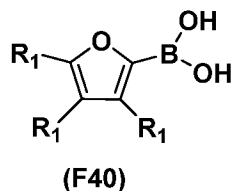
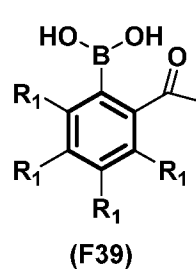
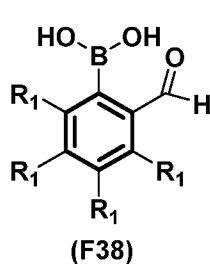
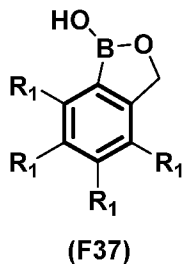
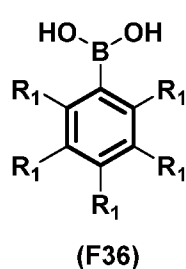
5 либо (i) две группы R_1 в B_2 представляют собой $COOH$, и эти две группы R_1 не конъюгированы с лекарственным веществом, либо (ii) один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой NO_2 , $CH=O$, CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$ или $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$;

ни один, один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой $CH=O$, F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CH_3 , CF_3 , CHF_2 или OCF_3 ;
10 остальные R_1 представляют собой H ;

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7; и

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7;

причем для каждой из Формул F36-F43:



15 один R_1 для каждого из B_1 и B_2 представляет собой ковалентную связь с сульфоксиминной группой так, что B_1 и B_2 соединены друг с другом сульфоксиминной группой, и при этом аминогруппа указанного сульфоксимины ковалентно связана, либо непосредственно посредством линкера, содержащего кислоту, либо посредством
20 необязательного линкера, с Z в Формуле II;

либо (i) две группы R_1 в B_1 и/или B_2 представляют собой $COOH$, и эти две группы R_1 не конъюгированы с лекарственным веществом, либо (ii) один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой NO_2 , $CH=O$, CH_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_mCH_3$, $-(SO_2)NHCH_3$ или $-(SO_2)NH(CH_2)_mCH_3$;

25 ни один, один или два R_1 в любом B_1 и/или B_2 каждый независимо представляет собой $CH=O$, F , Cl , Br , OH , CH_2-NH_2 , NH_2 , $(C=O)-NH_2$, SO_2CH_3 , CH_3 , CF_3 , CHF_2 или OCF_3 ;
остальные R_1 представляют собой H ;

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7; и

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 7.

3. Соединение, содержащее лекарственное вещество, отличающееся тем, что указанное лекарственное вещество содержит инсулин, и указанный инсулин содержит

5 одну или более модифицированных аминокислот, представленных Формулой III:

Z-R

(Формула III),

причем в Формуле III

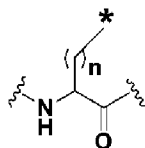
R выбран из Формул FF1-FF24; и

10 Z выбран из необязательного линкера, J-SCH₂—ø, J-S(CH₂)₂—ø, J—NH—ø, J—NH(CO) линкер—ø, J—S(CH₂)_kNH—ø и J—триазол(CH₂)_kNH—ø,

где —ø представляет собой ковалентную связь с R,

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 14; и

J описан Формулой III':



15

(Формула III'),

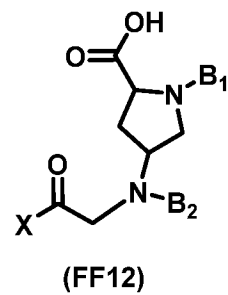
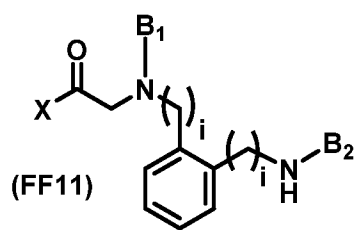
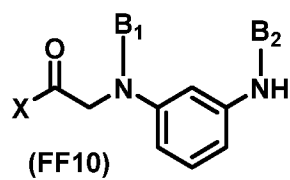
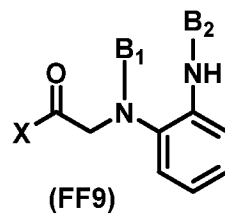
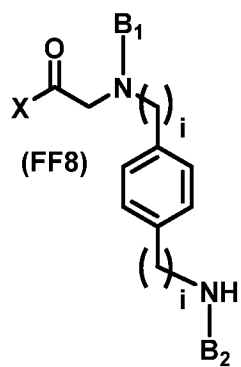
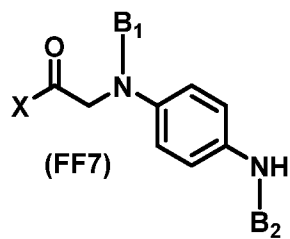
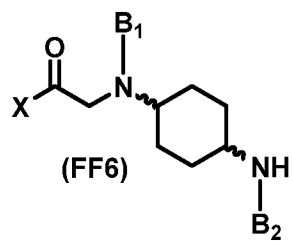
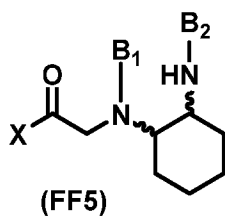
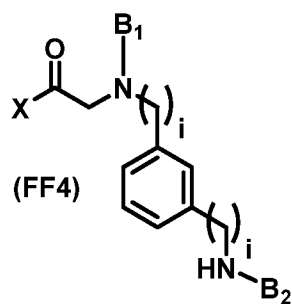
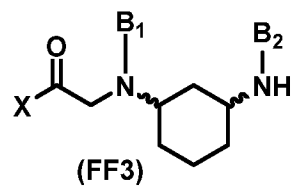
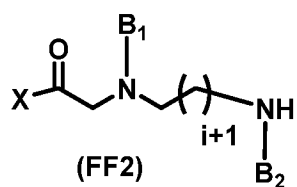
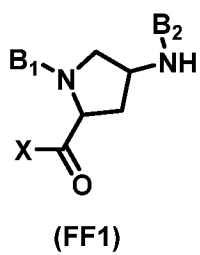
причем в Формуле III':

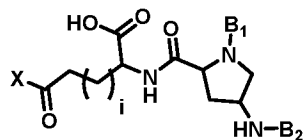
и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного инсулина;

20 * обозначает положение присоединения к остальной части Z; и

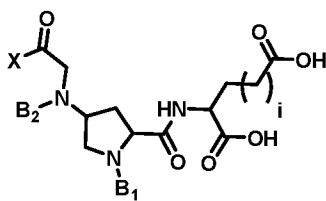
индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

причем для Формул FF1-FF24:

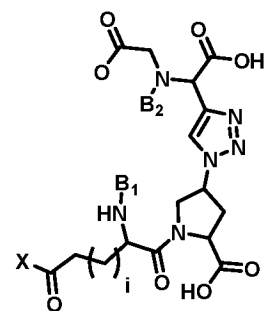




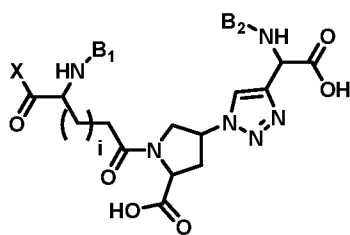
(FF13)



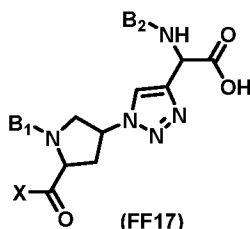
(FF14)



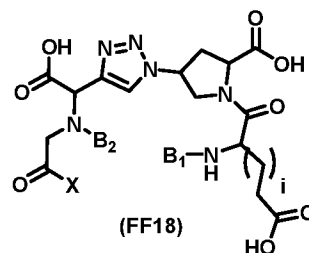
(FF15)



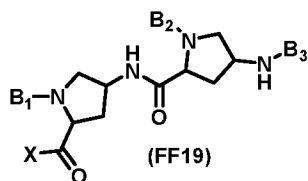
(FF16)



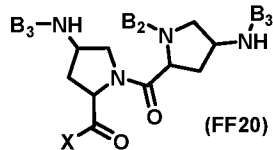
(FF17)



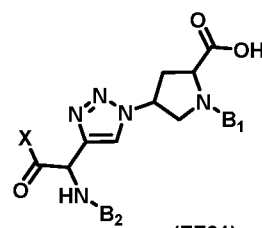
(FF18)



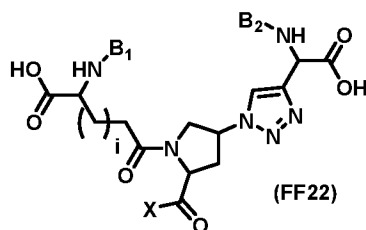
(FF19)



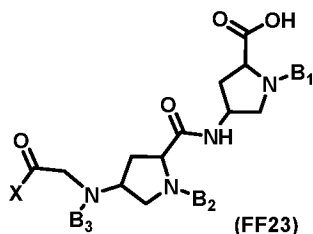
(FF20)



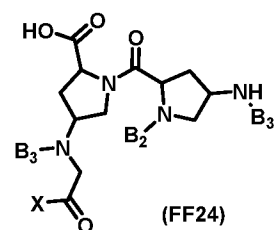
(FF21)



(FF22)



(FF23)



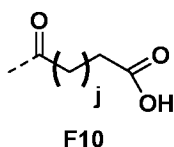
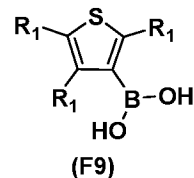
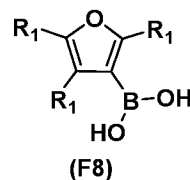
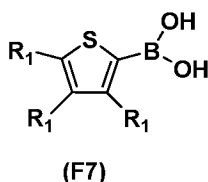
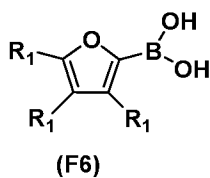
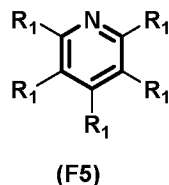
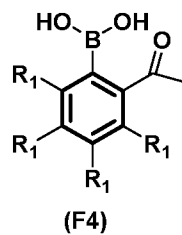
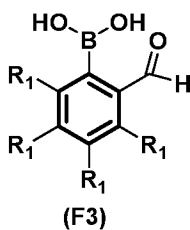
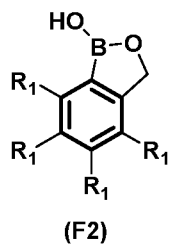
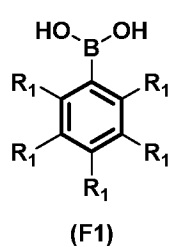
(FF24)

X представляет собой ковалентную связь, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с Z в Формуле III;

индекс i представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20;

В₁ и В₂ являются одинаковыми или различными и каждый независимо представляет собой группу, выбранную из Формул F1-F9; и

В₃ представляет собой группу, выбранную из Формул F1-F11;



причем для каждой из Формул F1-F9:

один R₁ представляет собой (C=O)---, S(=O)(=O)---, (CH₂)_m(C=O)--- или (CH₂)_m---, где --- представляет собой ковалентную связь с остальной частью R;

ни один, один или два R₁ каждый независимо представляет собой F, Cl, Br, OH, CH₂-NH₂, NH₂, (C=O)-NH₂, SO₂CH₃, CF₃, NO₂, CH₃, OCH₃, O(CH₂)_mCH₃, —(SO₂)NH CH₃, —(SO₂)NH(CH₂)_mCH₃ или OCF₃;

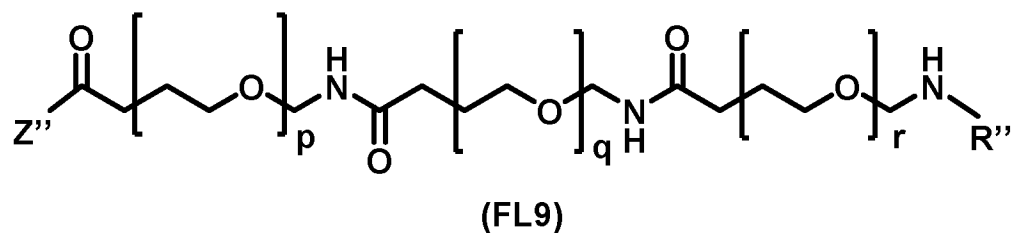
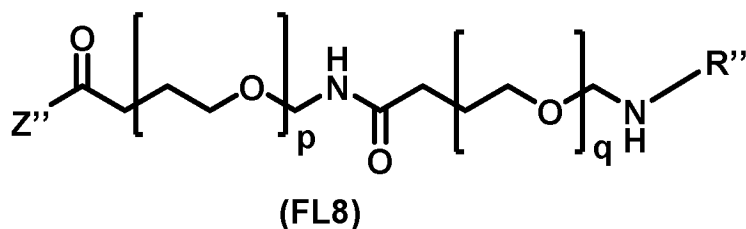
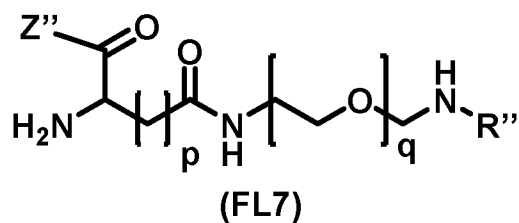
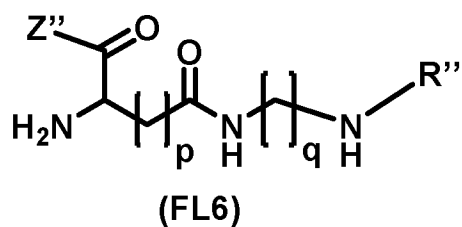
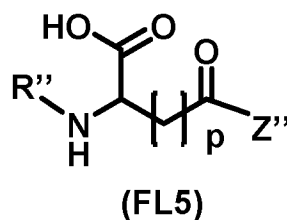
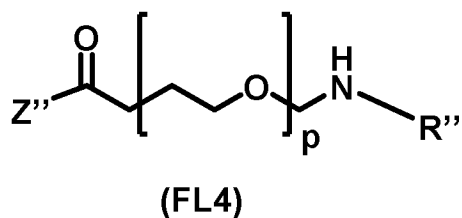
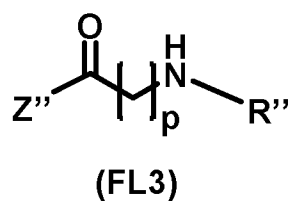
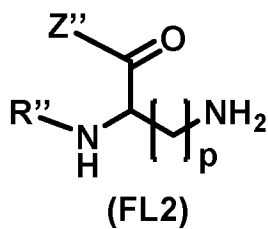
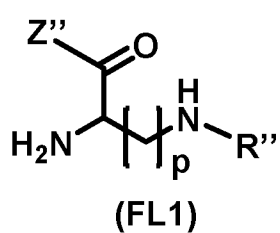
индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 14;

один R₁ в F5 представляет собой B(OH)₂; и

все остальные R₁ представляют собой H, и

в Формуле F10 индекс j представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 13.

4. Соединение по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что указанный необязательный линкер представляет собой L- или D-аминокислоту, имеющую по меньшей мере одну функциональную группу, непосредственно конъюгированную с R, или указанный необязательный линкер выбран из Формул FL1-FL9:



причем в Формулах FL1-FL9:

Z'' представляет собой ковалентную связь с Z;

R'' представляет собой ковалентную связь с R;

5 р представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 5;

q представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 5; и

г представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 5.

5. Соединение по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой лекарственное вещество, которое дополнительно модифицировано как

описано в пп. 1-3, и/или тем, что один или более аминов каждый независимо ацетилирован или алкилирован.

6. Соединение по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, содержащий человеческий инсулин
5 или его аналог, и указанный инсулин содержит А-цепь и В-цепь.

7. Соединение по любому из пп. 1-2, отличающееся тем, что указанное лекарственное вещество содержит полипептидное лекарственное вещество или человеческий пептидный гормон.

8. Соединение по п. 6, отличающееся тем, что указанный инсулин содержит одну
10 или две пептидные последовательности, каждая из которых независимо добавлена к указанной А-цепи и/или В-цепи инсулина, и каждая пептидная последовательность независимо содержит от 1 до 20 смежных остатков.

9. Соединение по п. 6, отличающееся тем, что указанный инсулин содержит от 2 до
10 аминокислот, каждая из которых независимо модифицирована, как описано
15 Формулами I, II или III.

10. Соединение по п. 6, отличающееся тем, что указанный инсулин содержит одну или более модификаций, каждая из которых независимо описана Формулами I, II или III, причем каждая из указанной одной или более модификаций расположена:

(i) на боковой цепи аминокислоты и/или на N-конце полипептида, включающего до
20 20 остатков, присоединенного к N- и/или C-концу указанной А-цепи и/или В-цепи инсулина; и/или

(ii) в пределах 4 остатков от остатков B1, B21, B22, B29, A1, A22 или A3 в указанной А- или В-цепи инсулина; и/или

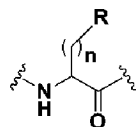
(iii) на боковой цепи аминокислоты и/или на N-конце полипептида,
25 присоединенного или встроенного в указанную А-цепь и/или В-цепь инсулина, причем указанный полипептид содержит последовательность $(X_2)_nX_1(X_2)_m$, где: X_1 представляет собой остаток лизина, в котором боковая цепь указанного остатка лизина модифицирована, как описано Формулами I, II или III; каждый X_2 независимо выбран из группы аминокислот K, P, E, G, N, M, A, R, L, W, S, F, V, C,
30 H, D, I, Y, Q, T или X_1 ; индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 20; и индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 18.

11. Конъюгат, содержащий соединение по любому из пп. 1-2, отличающийся тем, что указанное соединение по любому из пп. 1-2 конъюгировано, либо непосредственно, либо посредством ковалентного линкера, с лекарственным веществом, при условии, что

указанная конъюгация осуществляется не через Z, если Z представляет собой NH₂ в Формуле II.

12. Соединение по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что указанное соединение по любому из пп. 1-3 применяют в качестве промежуточного соединения для изготовления любых соединений по пп. 1-11.

13. Соединение по любому из пп. 5-6, отличающееся тем, что указанное соединение содержит одну или более модификаций, описанных Формулами IV, V или VI, причем для Формулы IV:

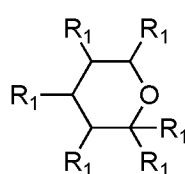


(Формула IV),

и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного лекарственного вещества;

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8; и

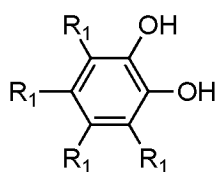
R выбран из группы, состоящей из формул F111, F222, F333, F444 и F555:



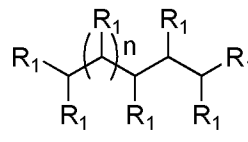
(F111)



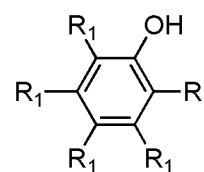
(F222)



(F333)



(F444)



(F555)

причем в Формулах F111, F222, F333, F444 и F555:

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

каждый атом углерода, присоединенный к R¹, независимо имеет (R) или (S) стереохимию;

каждый R₁ независимо выбран из —H, —OR³, —N(R³)₂, —SR³, —OH, —OCH₃, —OR⁵, NHC(O)CH₃, —CH₂R³, —C(O)NHOH, —NHC(O)CH₃, —CH₂OH, —CH₂OR⁵, —NH₂, —CH₂R⁴, —OR⁸, —R⁶, —R⁸ и —R⁷,

каждый R³ независимо выбран из —H, ацетила, фосфата, —R², —SO₂R², —S(O)R², —P(O)(OR²)₂, —C(O)R², —CO₂R² и —C(O)N(R²)₂,

каждый R² независимо выбран из —H, необязательно замещенного C₁₋₆ алифатического кольца, необязательно замещенного фенильного кольца, необязательно замещенного 5-6-членного моноциклического гетероарильного кольца, имеющего 1-4 гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы, 4-7-

членного гетероциклического кольца, имеющего 1-2 гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы, и алкильной или амидной ковалентной связи с R в Формуле IV,

каждый R^4 независимо выбран из $—H$, $—OH$, $—OR^3$, $—N(R^3)_2$, $—OR^5$ и $—SR^3$;

каждый R^5 независимо выбран из моносахарида, дисахарида, трисахарида, пентозы и гексозы,

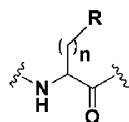
каждый R^6 независимо выбран из $—NCOCH_2—$, $—(OCH_2CH_2)_n—$, $—O—C_{1-9}$ алкиленовой группы и замещенной C_{1-9} алкиленовой группы, в которой одна или более метиленовых групп необязательно замещены $—O—$, $—(CH_2)_n—$, $—OCH_2—$, $—N(R^2)C(O)—$, $—N(R^2)C(O)N(R^2)—$, $—SO_2—$, $—SO_2N(R^2)—$, $—N(R^2)SO_2—$, $—S—$, $—N(R^2)—$, $—C(O)—$, $—OC(O)—$, $—C(O)O—$, $—C(O)N(R^2)—$ или $—N(R^2)SO_2N(R^2)—$, где индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8,

каждый R^7 независимо выбран из $—N(R^2)_2$, $—F$, $—Cl$, $—Br$, $—I$, $—SH$, $—OR^2$, $—SR^2$, $—NH_2$, $—N_3$, $—C\equiv CR^2$, $—CH_2C\equiv CH$, $—C\equiv CH$, $—CO_2R^2$, $—C(O)R^2$, $—OSO_2R^2$, $—N(R^2)_2$, $—OR^2$, $—SR^2$, $—CH_3$, $—CH_2NH_2$, и непосредственной связи с R в Формуле IV,

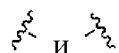
R^8 представляет собой (i) боковую цепь одного из L-серина, D-серина, L-треонина, D-треонина, L-аллотреонина или D-аллотреонина и соответствует R в Формуле IV, где индекс n=1 в Формуле IV, (ii) амидную связь с C-концом лизина, цистеина, 2,3-диаминопропионовой кислоты или (iii) $—CH_2C(CH_2OH)_2CH_2NH_2$, и

структуры F111, F222, F333, F444 и/или F555 необязательно содержат одну или более ацетильных, ацетиленовых, ацетонидных и/или пинаколовых защитных групп;

причем для Формулы V:



(Формула V),



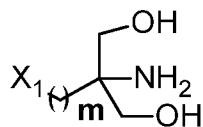
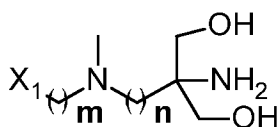
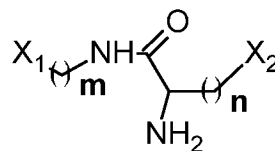
обозначают положения присоединения к остальным частям указанного лекарственного вещества;

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

R представляет собой X-Y,

где X представляет собой ковалентную связь, выбранную из группы, состоящей из триазола, амидной связи, иминной связи или тиоэфирной связи;

Y выбран из группы, состоящей из структур, представленных Формулами F200-F203:

(F₂₀₀)(F₂₀₁)(F₂₀₂)

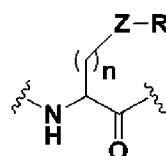
X₁ представляет собой ковалентную связь с X;

X₂ представляет собой SH, OH или NH₂;

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8; и

индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

причем для Формулы VI:



(Формула VI),

и обозначают положения присоединения к остальным частям указанного лекарственного вещества;

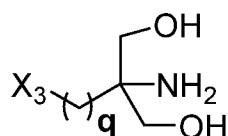
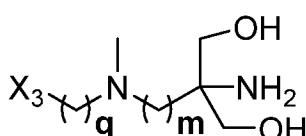
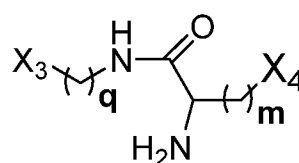
индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8;

Z выбран из группы, состоящей из: аминокислоты, $-(CH_2)_p-$, $-CH_2(OCH_2CH_2)_p-$, $-SCH_2-$, $-S(CH_2)_2-$, $-NH-$, $-NH(CO)-$, $-(CO)NH-$, $-S(CH_2)_kNH-$, $-$ триазол $-(CH_2)_k-NH-$, триазола, амидной связи, иминной связи и тиоэфирной связи;

индекс k представляет собой целое число в диапазоне от 3 до 5;

индекс p представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8; и

R выбран из группы, состоящей из структур, представленных Формулами F203-F205:

(F₂₀₃)(F₂₀₄)(F₂₀₅)

где X_3 представляет собой ковалентную связь с Z ;

X_4 представляет собой SH, OH или NH_2

индекс q представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8; и

индекс m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 8.

5 14. Способ изготовления соединения по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что B_1 и B_2 необязательно сначала конъюгируют с одной из структур, представленных FF1-FF33, а затем полученный конъюгат ковалентно связывают с лекарственным
10 веществом, или необязательно структуры, представленные FF1-FF33, сначала конъюгируют с лекарственным веществом, а затем B_1 и B_2 ковалентно связывают с соответствующими структурами в FF1-FF33.

15 15. Способ введения соединения по любому из пп. 1-13 субъекту-человеку в качестве терапевтического или профилактического агента.

16. Соединение по любому из пп. 1-13, отличающееся тем, что одна или более аминокрупп независимо ацетилированы или алкилированы.

15 17. Соединение по п. 6, отличающееся тем, что указанный инсулин включает две, три или четыре модификации, каждая из которых независимо описана Формулами I, II или III.

18. Соединение по пп. 1-3, отличающееся тем, что указанное лекарственное вещество представляет собой человеческий полипептидный гормон или пептид,
20 содержащий по меньшей мере 10% гомологии с одним, двумя, тремя или четырьмя различными человеческими пептидными гормонами и включающий двойные или тройные агонисты, гибридные синтетические пептиды на основе одного или более человеческих полипептидных гормонов или их аналогов.

19. Соединение по пп. 1-3, в котором указанное лекарственное вещество
25 представляет собой инсулин, и аминокислота в остатке 21 В-цепи представляет собой модифицированную аминокислоту, представленную Формулами I, II или III.

20. Соединение по пп. 1-3, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, и в котором каждый из одного или более остатков, которые
30 находятся в пределах 4 остатков от остатка 22 В-цепи инсулина, независимо представлен Формулами I, II или III, и один или более дополнительных остатков в полипептиде, присоединенном к С- и/или N-концу В- и/или А-цепи, независимо представлены Формулами I, II или III.

21. Соединение по пп. 1-3, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, причем указанные модифицированные аминокислоты либо
35 заменяют аминокислоту в определенном остатке в пептидной последовательности А-

и/или В-цепи, либо указанные модифицированные аминокислоты присоединены к пептидной последовательности А- и/или В-цепи на концах и/или внутри пептидных последовательностей А- и/или В-цепи.

22. Соединение по пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, причем указанная аминокислота в остатке 21 В-цепи представляет собой модифицированную аминокислоту, представленную Формулами IV, V или VI, и указанный остаток на С-конце А-цепи представлен Формулами I, II или III.

23. Соединение по пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, в котором каждый из одного или более остатков, которые находятся в пределах 4 остатков от С-конца А-цепи или которые присоединены к С-концу А-цепи, независимо представлен Формулами I, II или III, и каждый из одного или более остатков, которые находятся в пределах 4 остатков от остатка 22 В-цепи, независимо представлен Формулами IV, V или VI.

24. Соединение по пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, в котором каждый из одного или более остатков, которые находятся в пределах 4 остатков от С-конца А-цепи или которые присоединены к С-концу А-цепи, независимо представлен Формулами IV, V или VI, и каждый из одного или более остатков, которые находятся в пределах 4 остатков от остатка 22 В-цепи, независимо представлен Формулами I, II или III.

25. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, причем две модифицированные аминокислоты введены в В-цепь инсулина в любом положении между С-концевым цистеином В-цепи и С-концом В-цепи, и две дополнительные модифицированные аминокислоты введены в любом месте А-цепи инсулина, в том числе присоединены к одному или обоим концам указанной А-цепи.

26. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, причем один или более остатков, которые находятся (i) в пределах 4 остатков от остатка 21 В-цепи и/или (ii) в пределах 6 остатков N- или С-конца А- и/или В-цепи и/или (iii) в пределах 4 остатков от остатка 13 А-цепи и/или (iv) каждый независимо представлен Формулами I, II, III, IV, V или VI, и один или более остатков, которые находятся в пределах 4 остатков от С-конца А-цепи, независимо представлены Формулами I, II, III, IV, V или VI.

27. Модифицированный инсулин по любому из пп. 1, 2 или 3, в котором две или более аминокислот В-цепи в диапазоне от В1 до В29 заменены природными или неканоническими, или искусственными аминокислотами.

28. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, в котором одна или более аминокислот А- или В-цепи заменены природными или неканоническими аминокислотами.

29. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное
5 вещество представляет собой инсулин, причем указанный инсулин дополнительно конъюгирован, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с полипептидом, включающим до 31 аминокислоты.

30. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное
10 вещество представляет собой инсулин, причем указанный инсулин конъюгирован на N-или С-конце А- или В-цепи с полипептидом, включающим до 31 аминокислоты.

31. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, причем указанный инсулин конъюгирован на N-или С-конце А- или В-цепи с полипептидом, включающим до 31 аминокислоты, и указанный полипептид соединен с указанным инсулином пептидной связью.

15 32. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, причем указанный инсулин дополнительно конъюгирован, либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, с полипептидом, включающим до 31 аминокислоты, и при этом одна или более пар боковых цепей указанного полипептида ковалентно связаны, и согласно определенным вариантам
20 реализации указанная ковалентная связь между боковыми цепями представляет собой связь, выбранную из группы, состоящей из триазольной связи, связи, полученной в результате азид-алкинового циклоприсоединения, дисульфидной связи, тиозфирной связи, оксимной связи, амидной связи, лактамной связи, сложноэфирной связи, олефиновой связи, иминной связи, сложноэфирной связи и тиозфирной связи.

25 33. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, причем по меньшей мере одна первичная или одна вторичная аминогруппа в R в Формуле I ковалентно конъюгирована посредством амидной связи с боковой цепью L- и D-гамма-глутаминовой кислоты, и N-конец указанной
30 глутаминовой кислоты ковалентно конъюгирован посредством амидной связи с незамещенной или монозамещенной алкильной цепью двухосновной кислоты, содержащей от 3 до 16 атомов углерода.

34. Модифицированный инсулин по п. 2, отличающийся тем, что для Формулы FF25 индекс i равен 0.

35 35. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, причем от 1 до 10 аминокислот присоединены к

полипептидной последовательности инсулина, и указанные аминокислоты присоединены на N-конце к остаткам 1 В-цепи инсулина, и при этом указанный остаток, который вставлен на N-конце к остаткам 1, представляет собой модифицированную аминокислоту, описанную Формулами I, II или III.

5 36. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, причем от 1 до 10 аминокислот присоединены к С-концу В-цепи инсулина, и при этом указанный остаток в положении В29 указанного инсулина представляет собой модифицированную аминокислоту, описанную Формулой I.

10 37. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, причем к полипептидной последовательности инсулина присоединено до 6 остатков, и при этом по меньшей мере два из них представляют собой модифицированные аминокислоты, описанные Формулами I-VI.

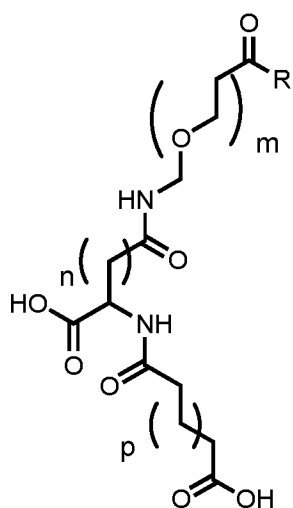
15 38. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, и указанный инсулин модифицирован так, что он имеет 4 или 5 внутримолекулярных дисульфидных связей.

 39. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, и указанный инсулин связан с полипептидом с использованием фермента.

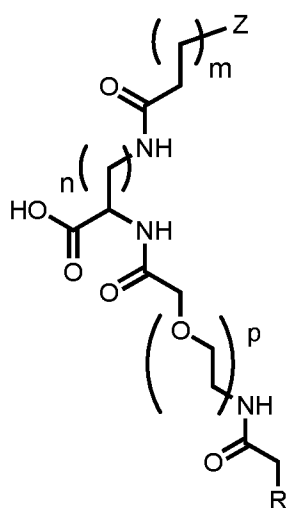
20 40. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, и указанный инсулин связан с неборонированным полипептидом, включающим до 31 аминокислоты, с использованием фермента.

25 41. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, в котором указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, причем указанный инсулин связан с полипептидом, включающим до 31 аминокислоты, и боковые цепи по меньшей мере двух аминокислот в полипептидной последовательности ковалентно связаны вместе или необязательным линкером.

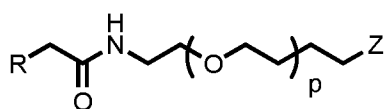
30 42. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, отличающееся тем, что указанное лекарственное вещество представляет собой инсулин, и указанный инсулин ковалентно конъюгирован с использованием амидной связи со структурами, описанными Формулами F411-F416, или структурами, содержащими структуру, в которой F411 дополнительно ковалентно конъюгирован с использованием амидных связей со структурами, описанными Формулами F412-F416,



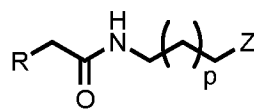
(F411)



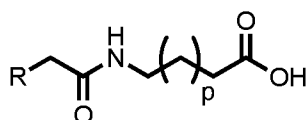
(F412)



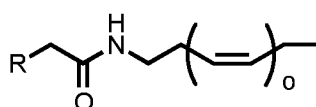
(F413)



(F414)



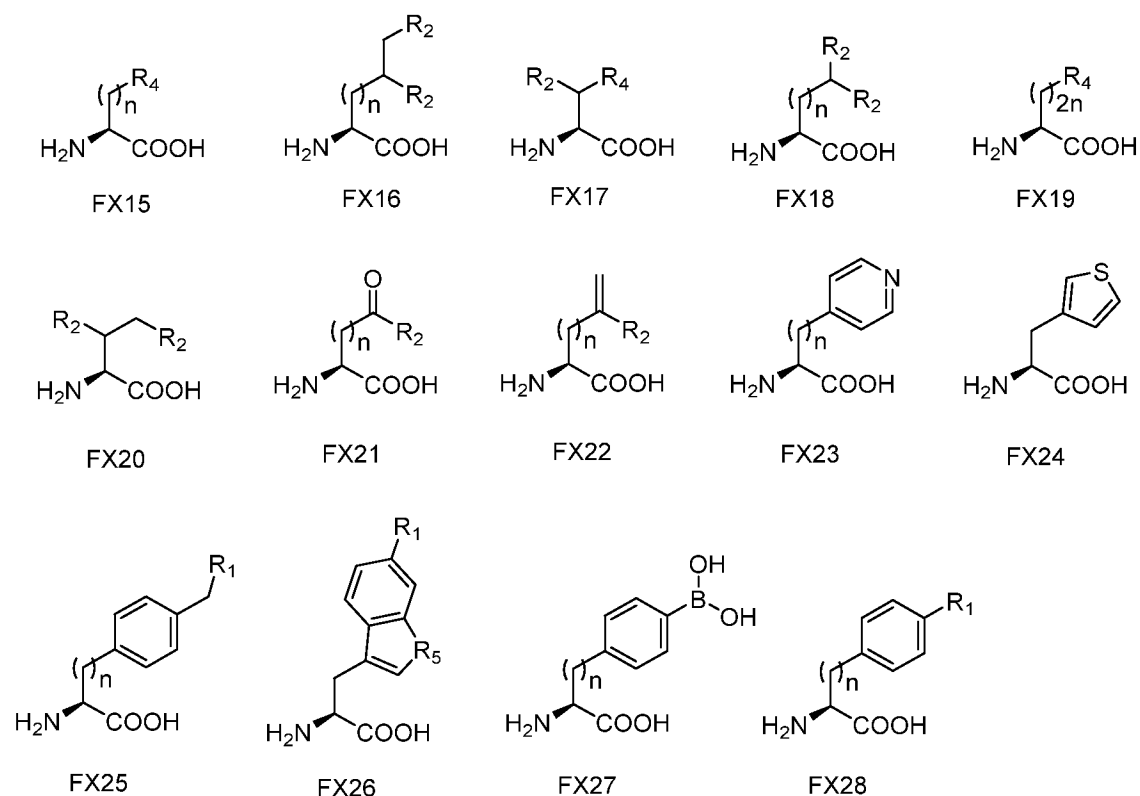
(F415)



(F416)

где R представляет собой первичный или вторичный амин на N-конце указанного модифицированного инсулина или первичный или вторичный амин в боковых цепях подгруппы аминокислот в указанном модифицированном инсулине, и где присоединение к R представляет собой положение присоединения к указанному модифицированному инсулину; индекс n представляет целое число в диапазоне от 1 до 14, индекс m представляет целое число в диапазоне от 1 до 12, индекс o представляет целое число в диапазоне от 1 до 6, индекс p представляет целое число в диапазоне от 1 до 12, Z представляет собой один из $-(C=O)-OH$, $-NH_2$, холестерина, 7-OH холестерина, 7,25-дигидроксихолестерина, холевой кислоты, хенодезоксихолевой кислоты, литохолевой кислоты, дезоксихолевой кислоты, гликохолевой кислоты, гликодезоксихолевой кислоты, гликолитохолевой кислоты, гликохенодезоксихолевой кислоты, α -токоферола, β -токоферола, γ -токоферола, δ -токоферола, α -токотриенола, β -токотриенола, γ -токотриенола или δ -токотриенола.

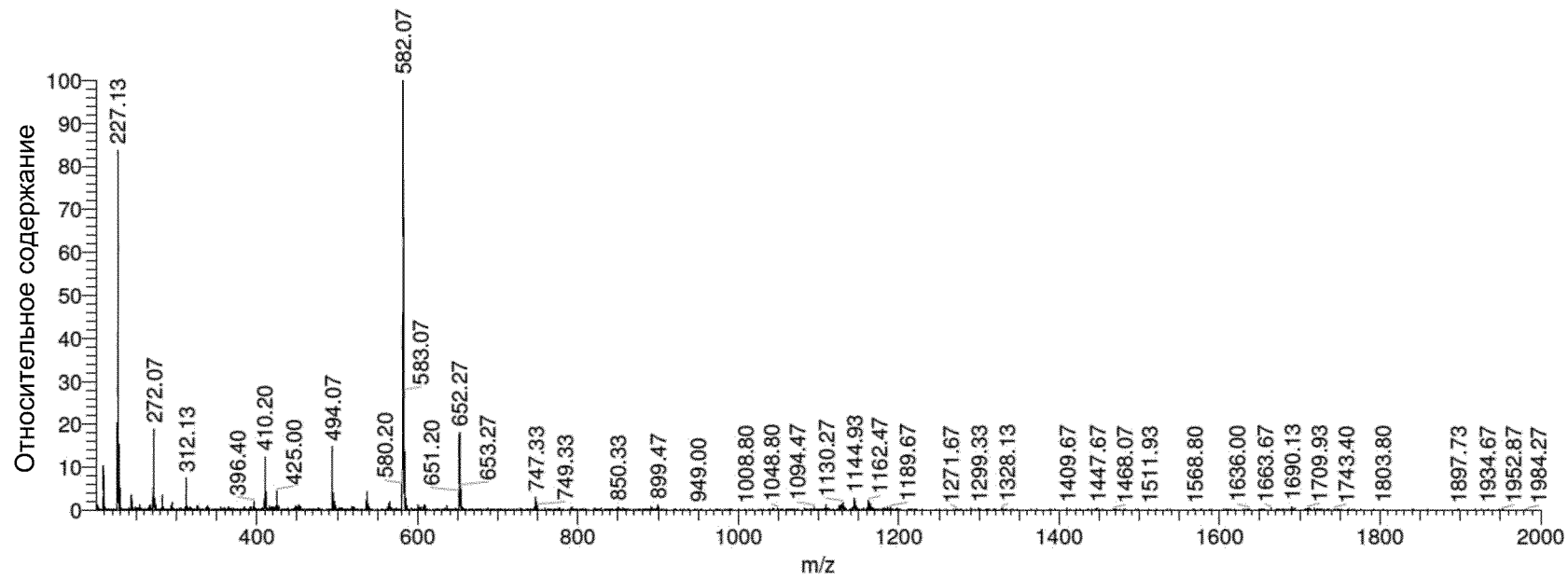
43. Соединение по любому из пп. 1-3 и 13, отличающееся тем, что указанное лекарственное вещество включает одну или более из структур, представленных Формулами FX15-FX28:



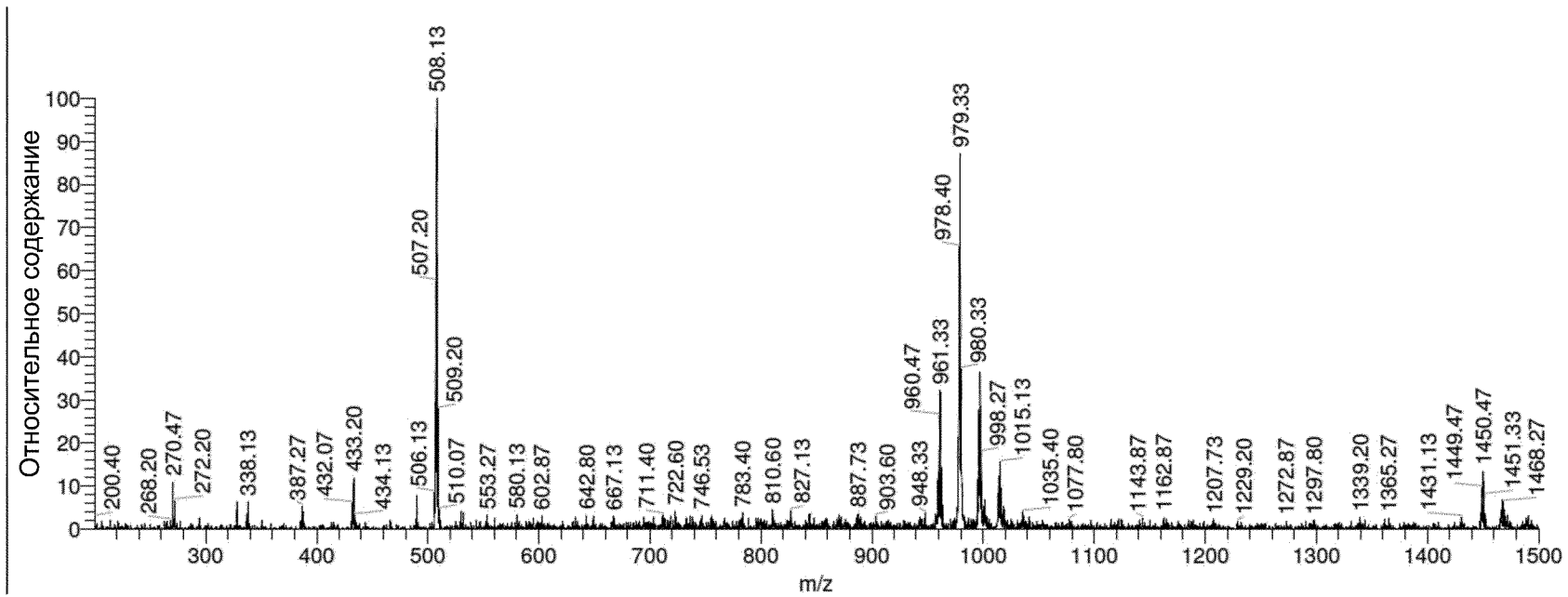
где

каждый R_1 независимо выбран из H, NH_2 , NO_2 , Cl, CF_3 , I, $COCH_3$, CN, $C\equiv CH$, N_3 или Br;

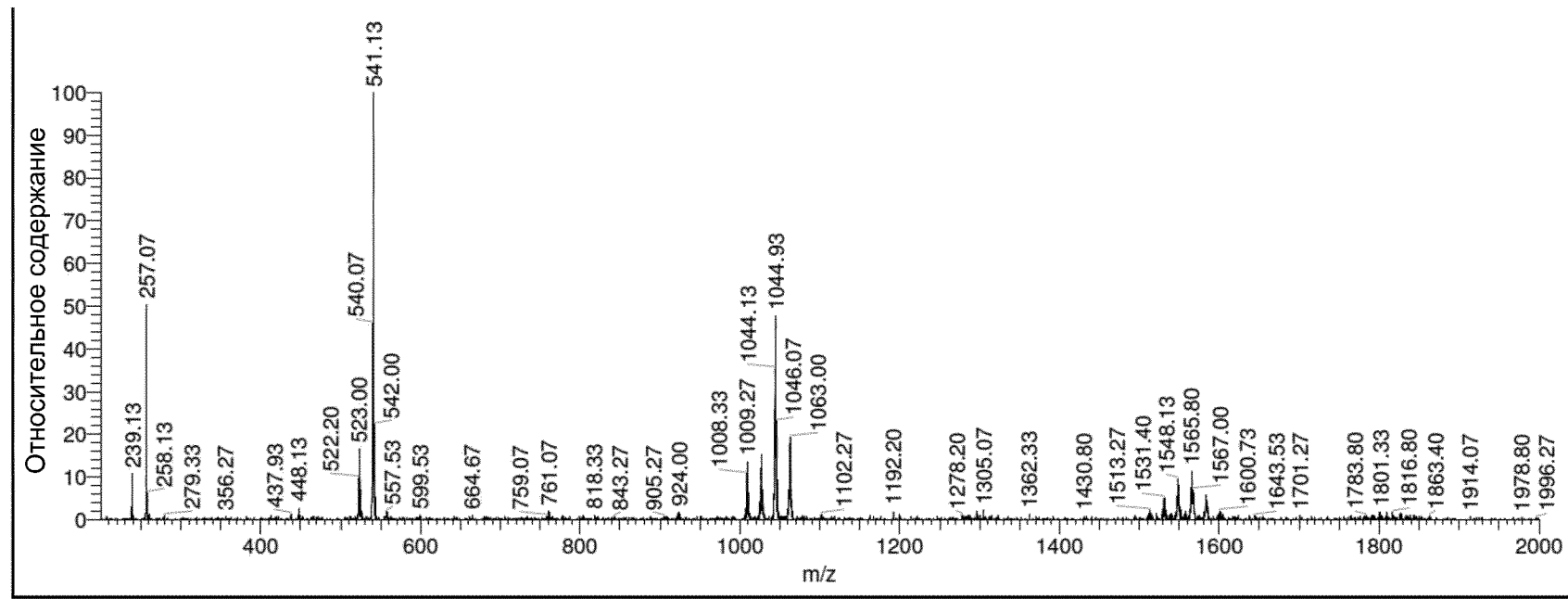
- 5 каждый R_2 независимо выбран из CF_3 , H или CH_3 ;
- каждый R_3 независимо выбран из $C\equiv CH$, H, N_3 или винильной группы;
- каждый R_4 независимо выбран из NH_2 , R_2 или R_3 ;
- каждый R_5 независимо выбран из S или NH; и
- индекс n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4.



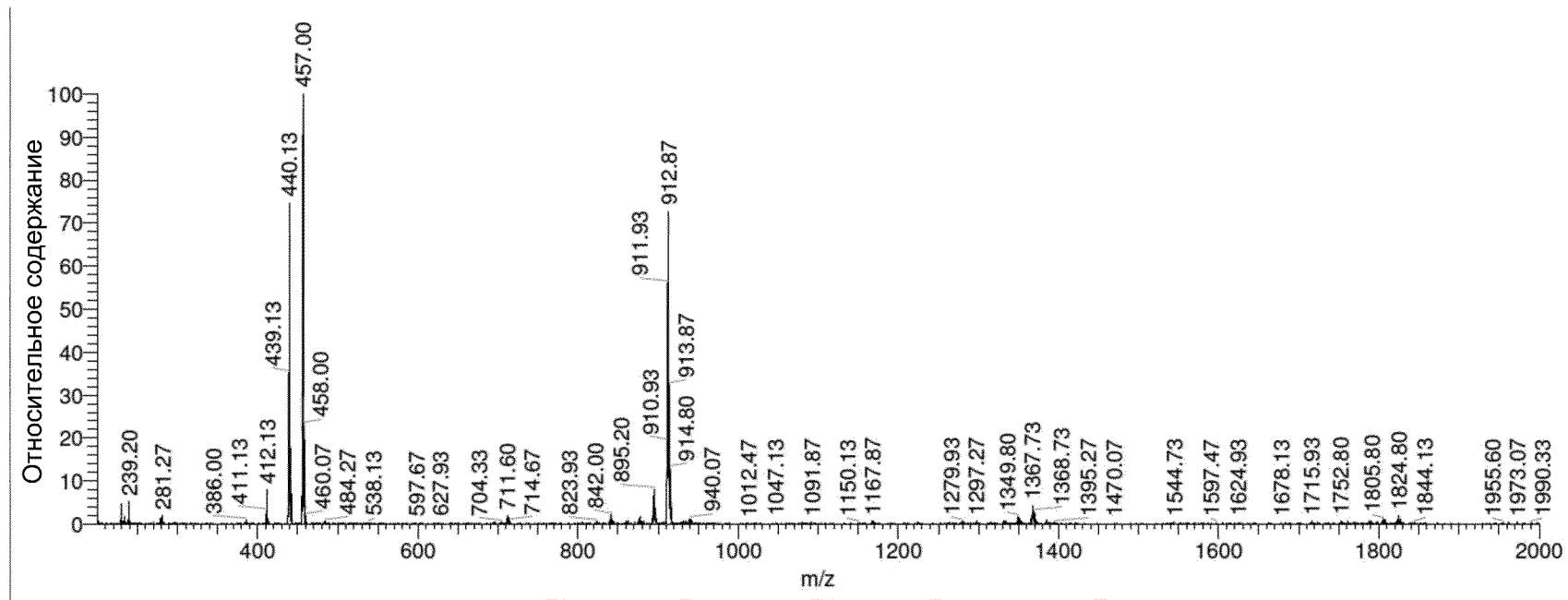
ФИГ. 1



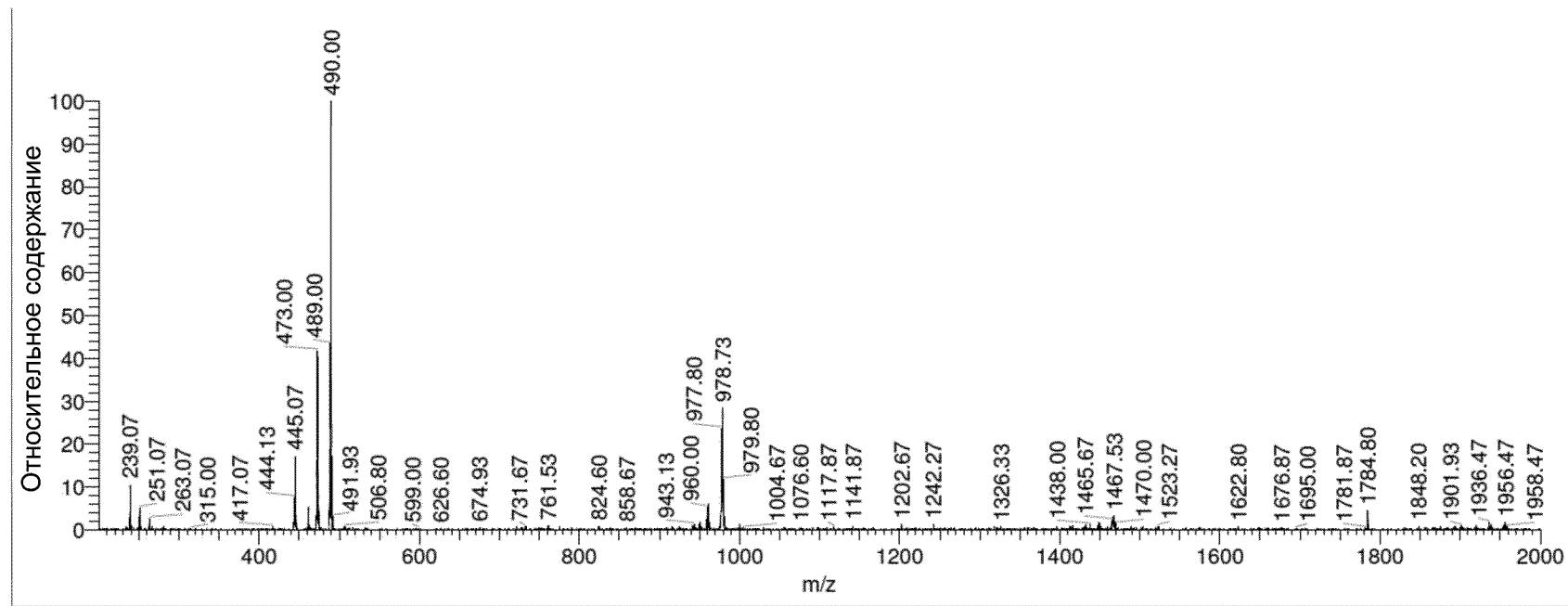
ФИГ. 2



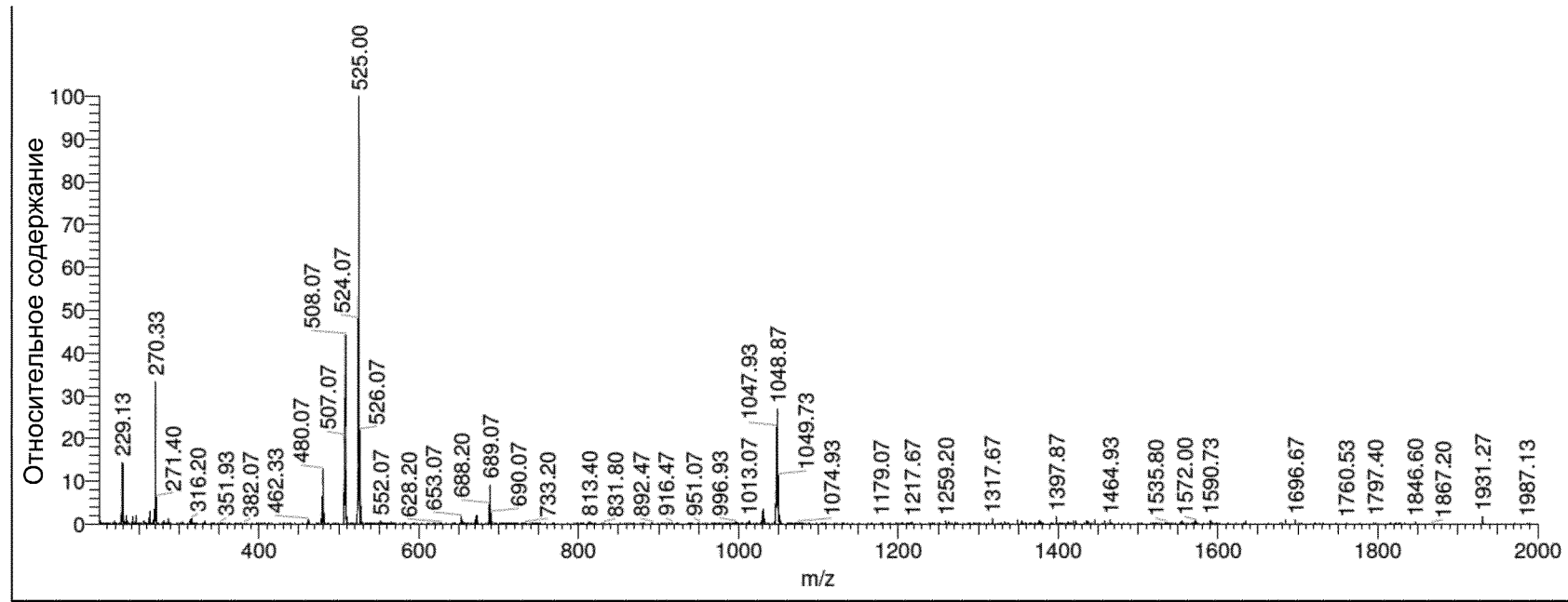
ФИГ. 3



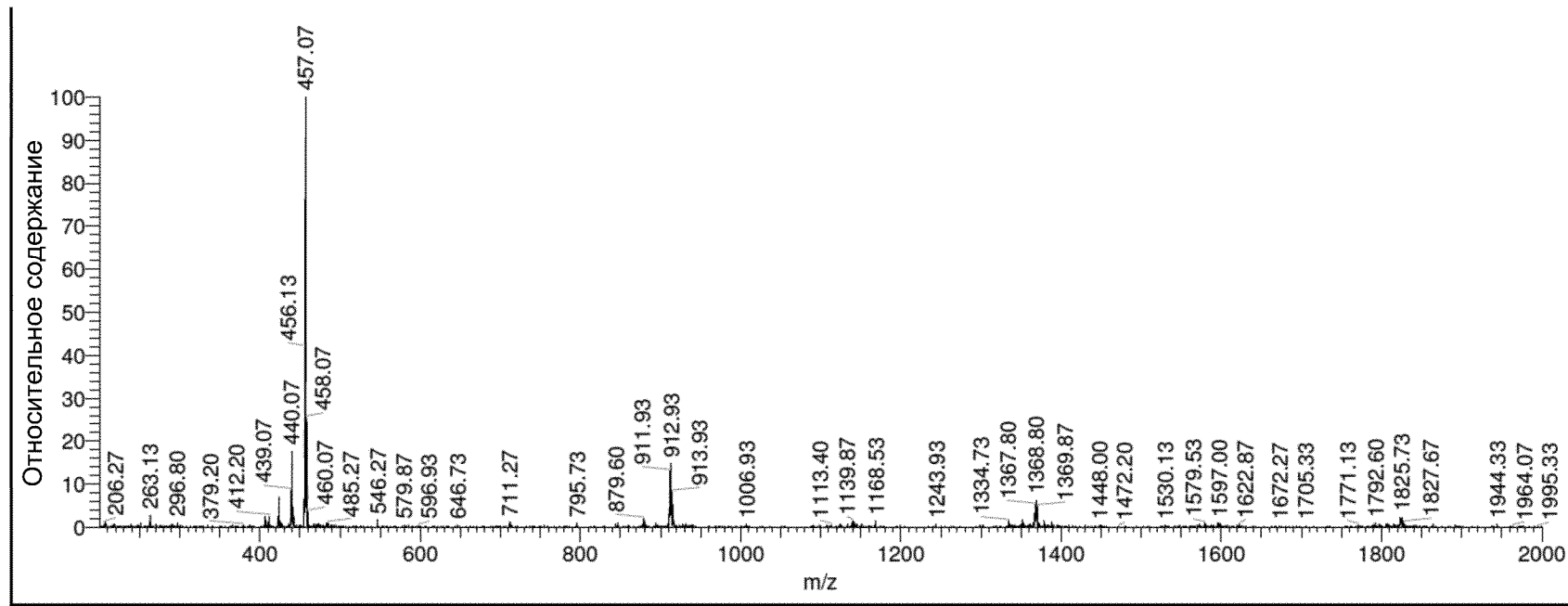
ФИГ. 4



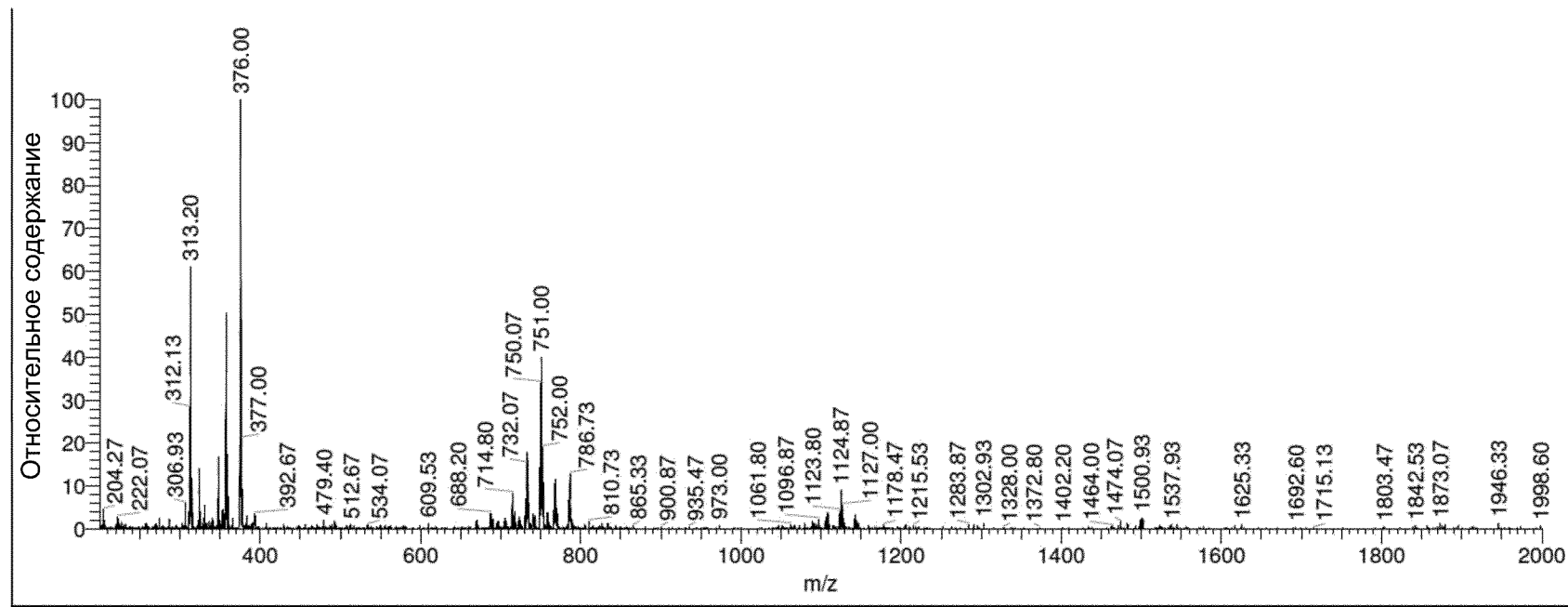
ФИГ. 5



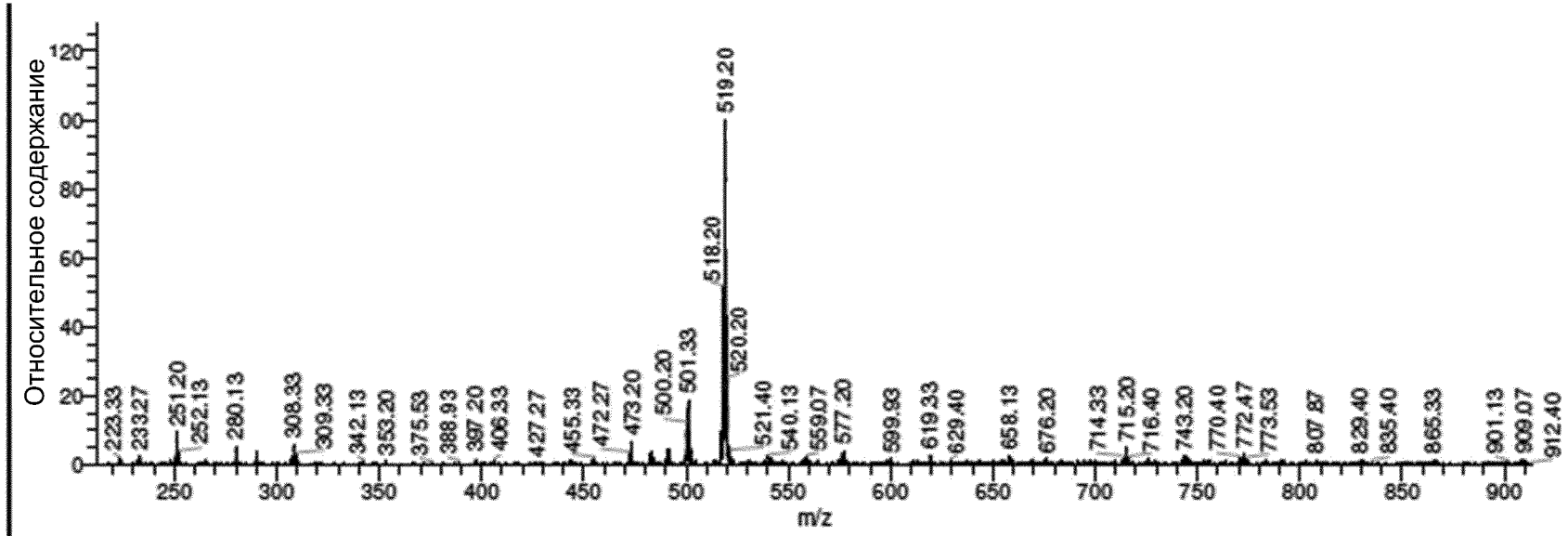
ФИГ. 6



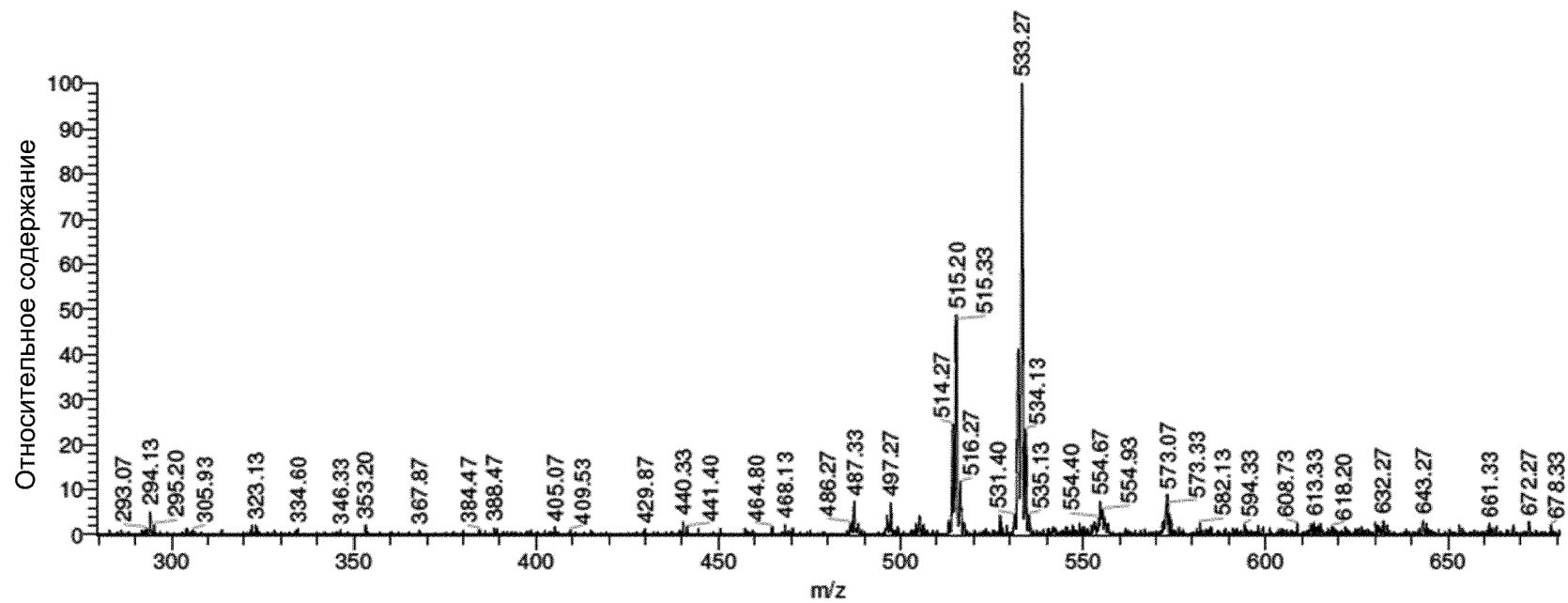
ФИГ. 7



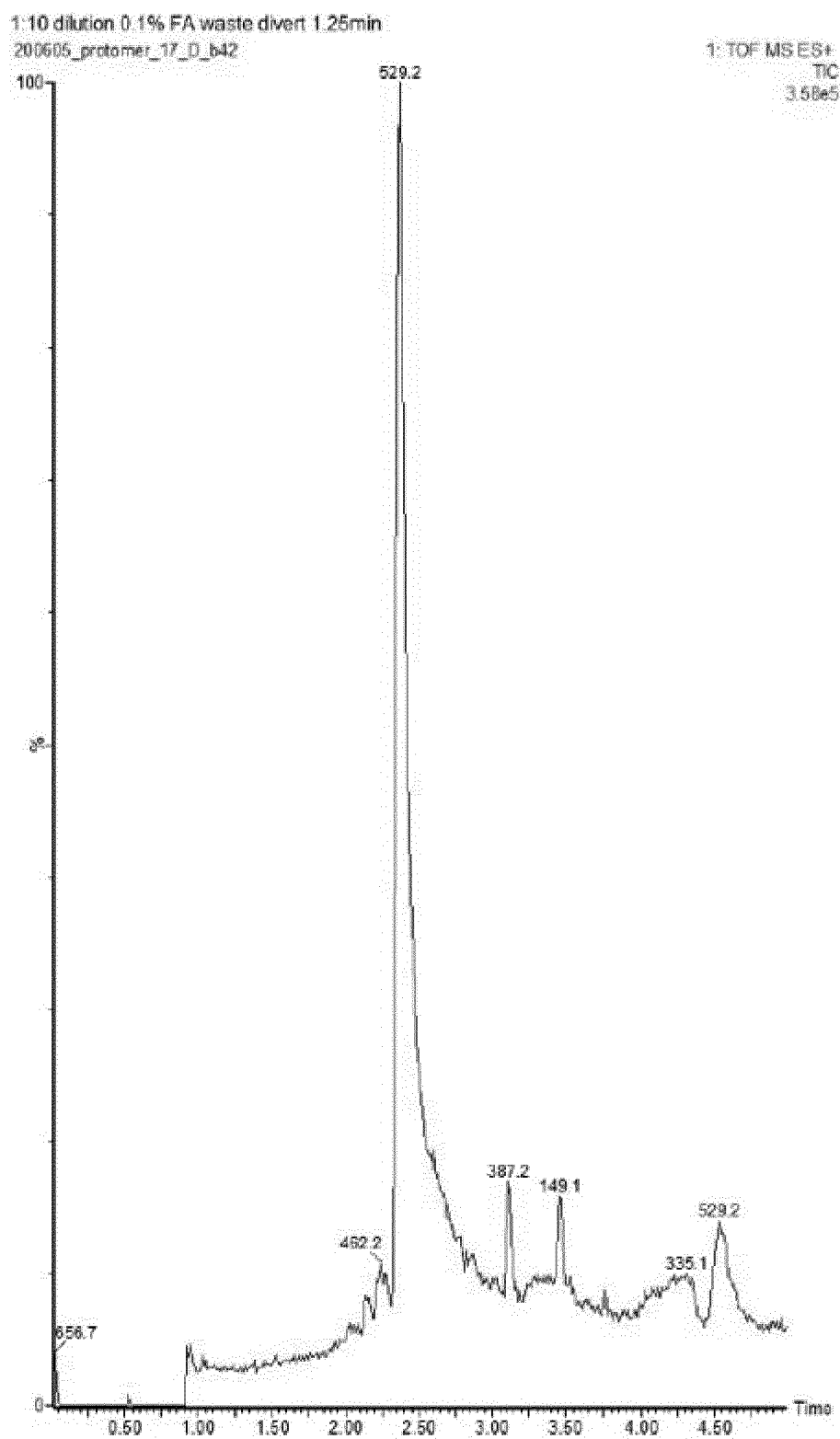
ФИГ. 8



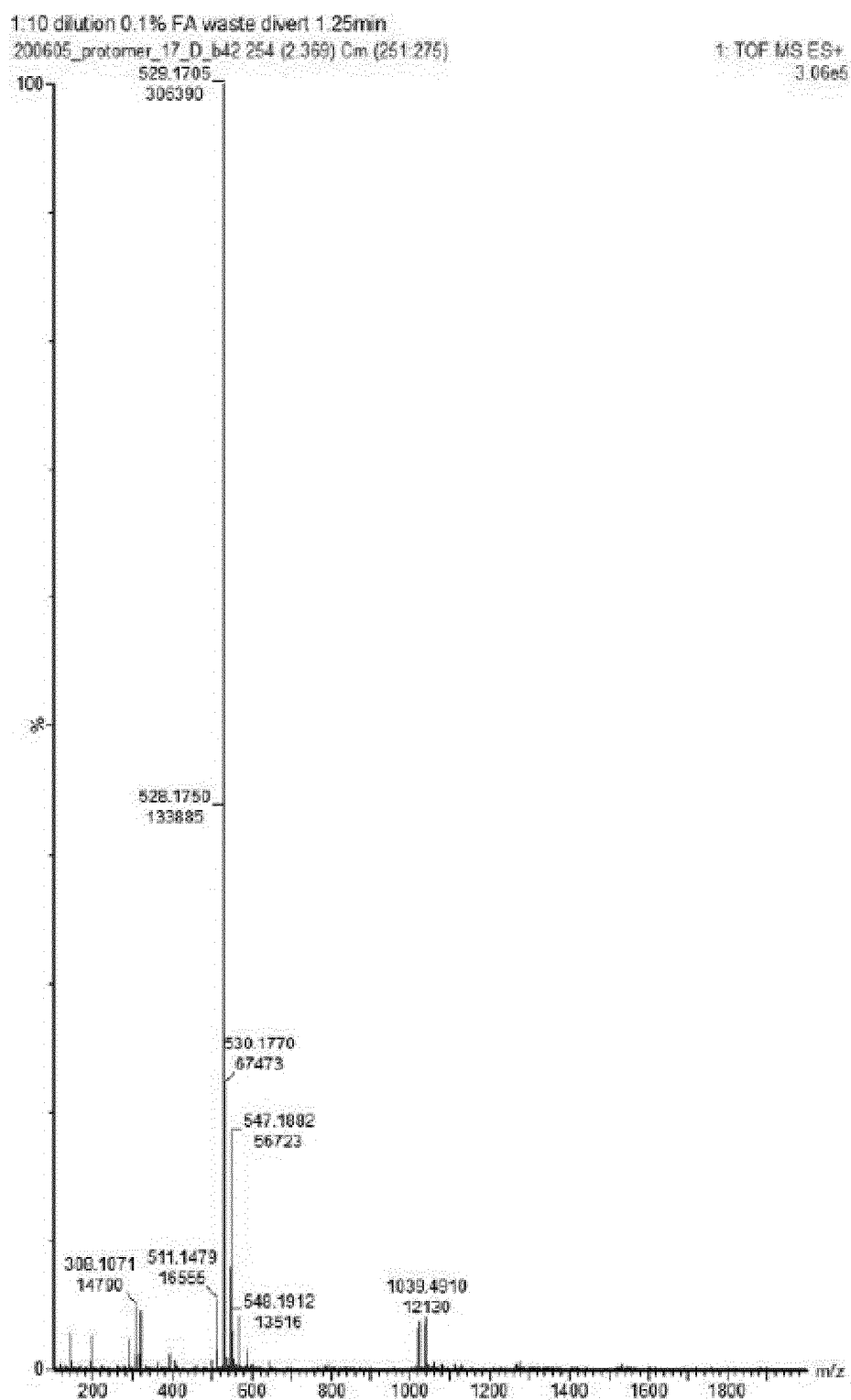
ФИГ. 9



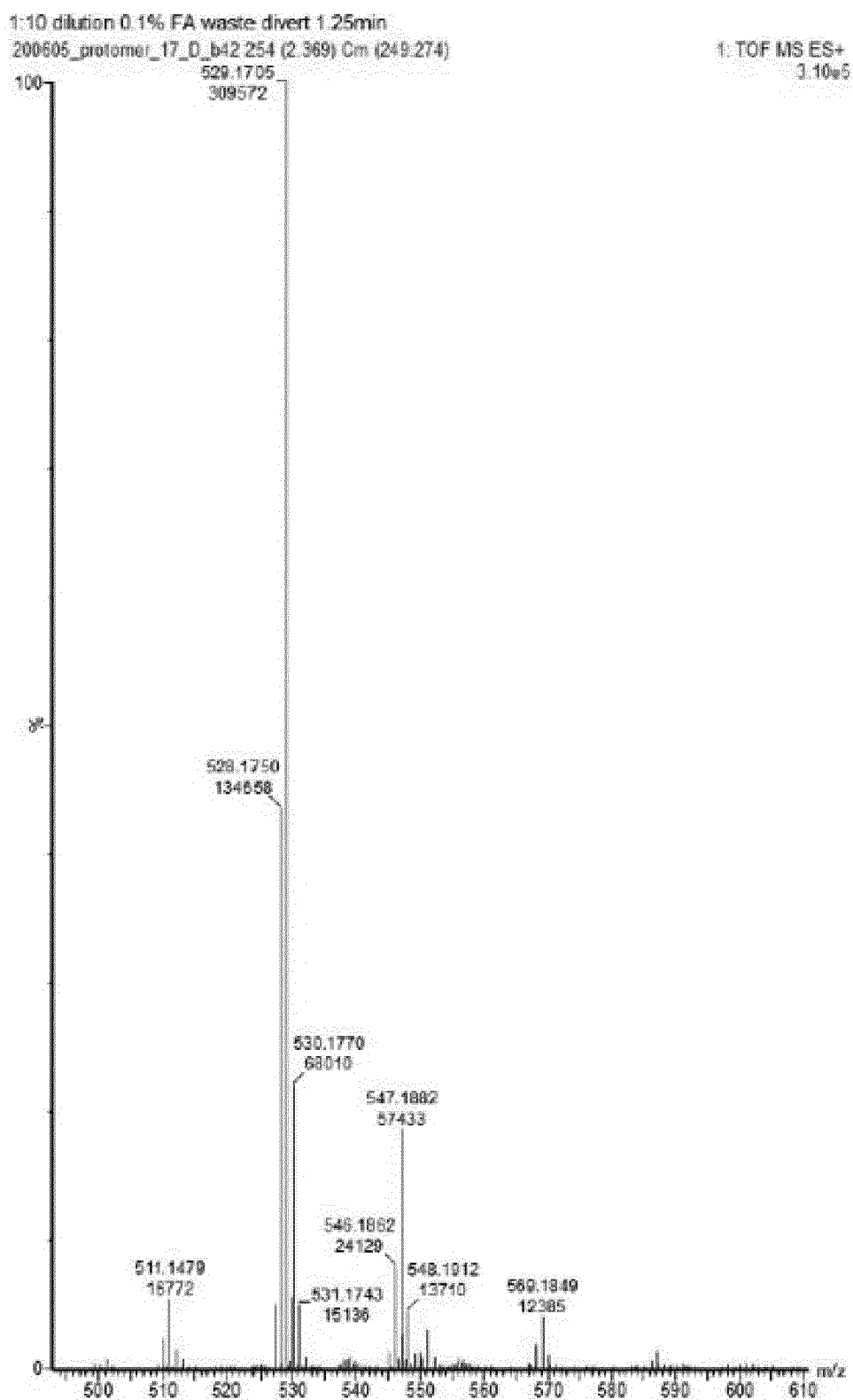
ФИГ. 10



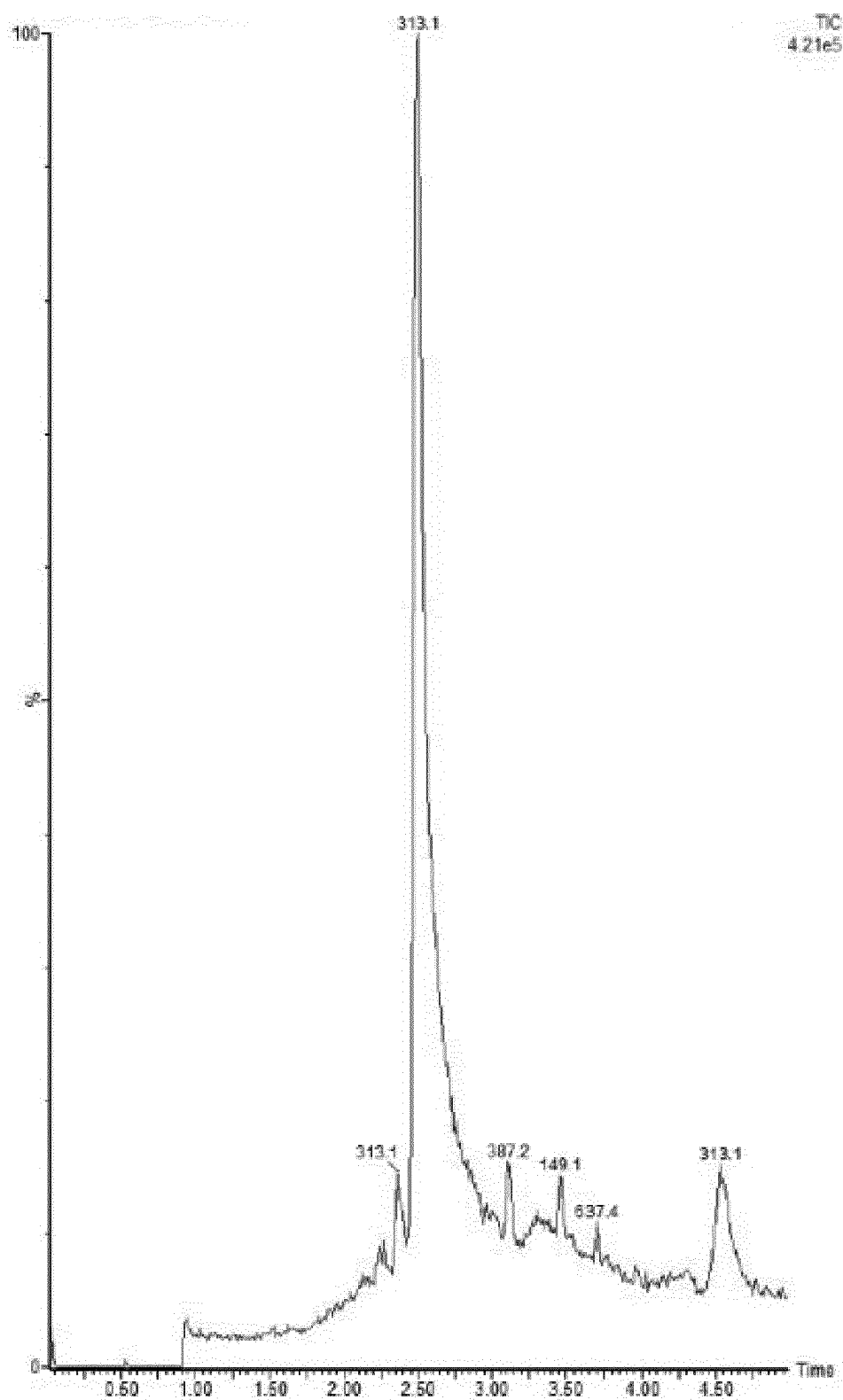
ФИГ. 11А



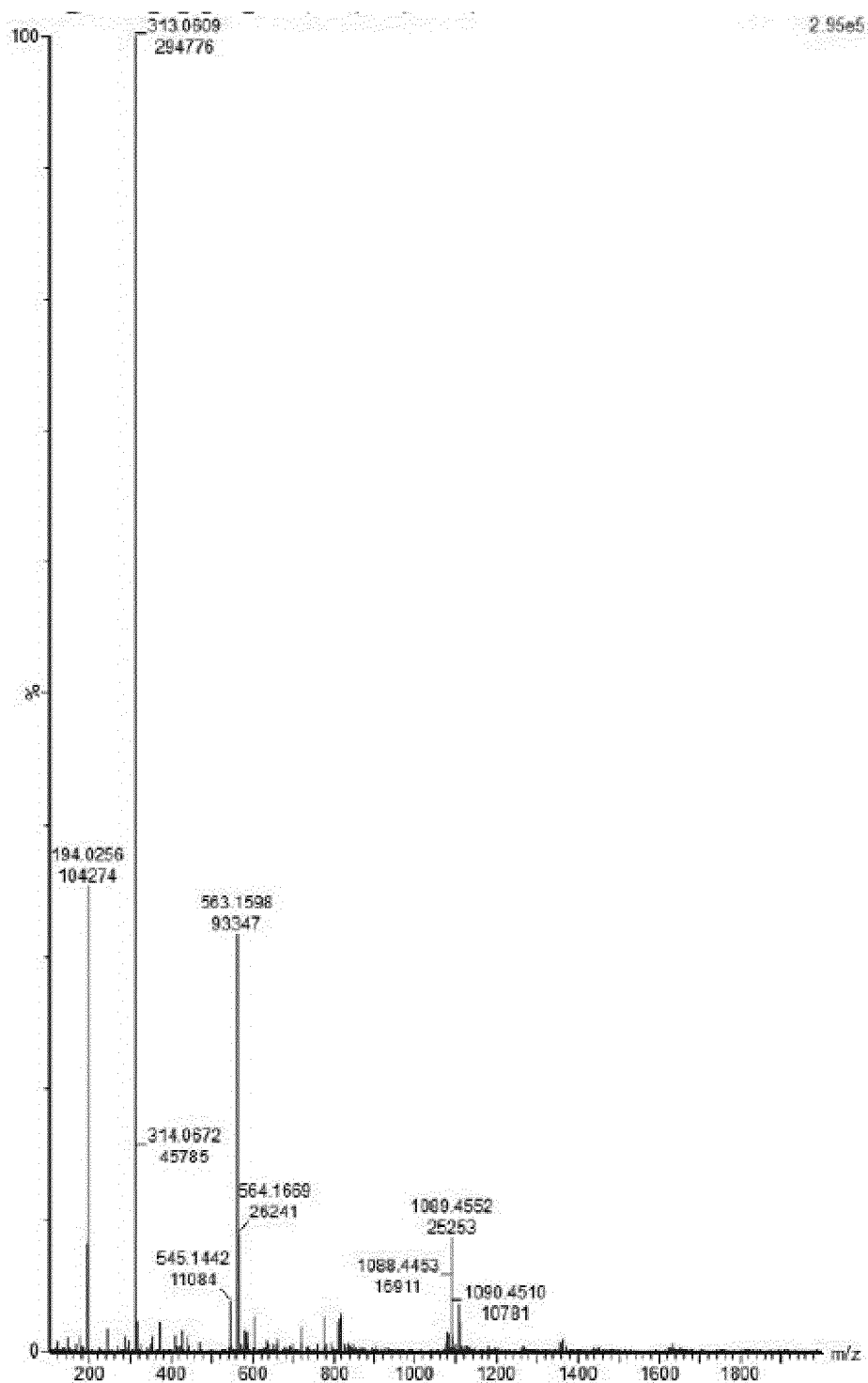
ФИГ. 11В



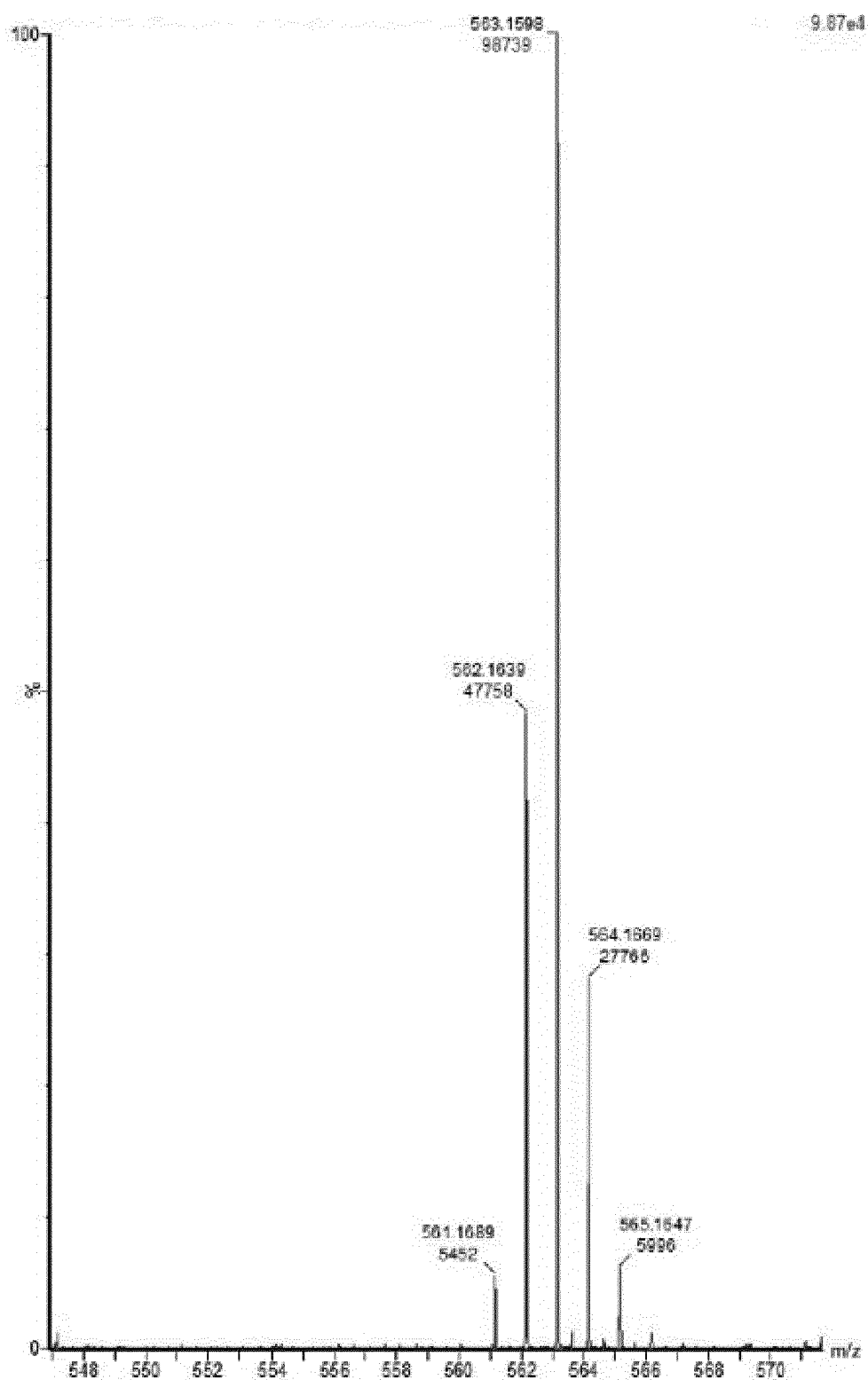
ФИГ. 11С



ФИГ. 12А

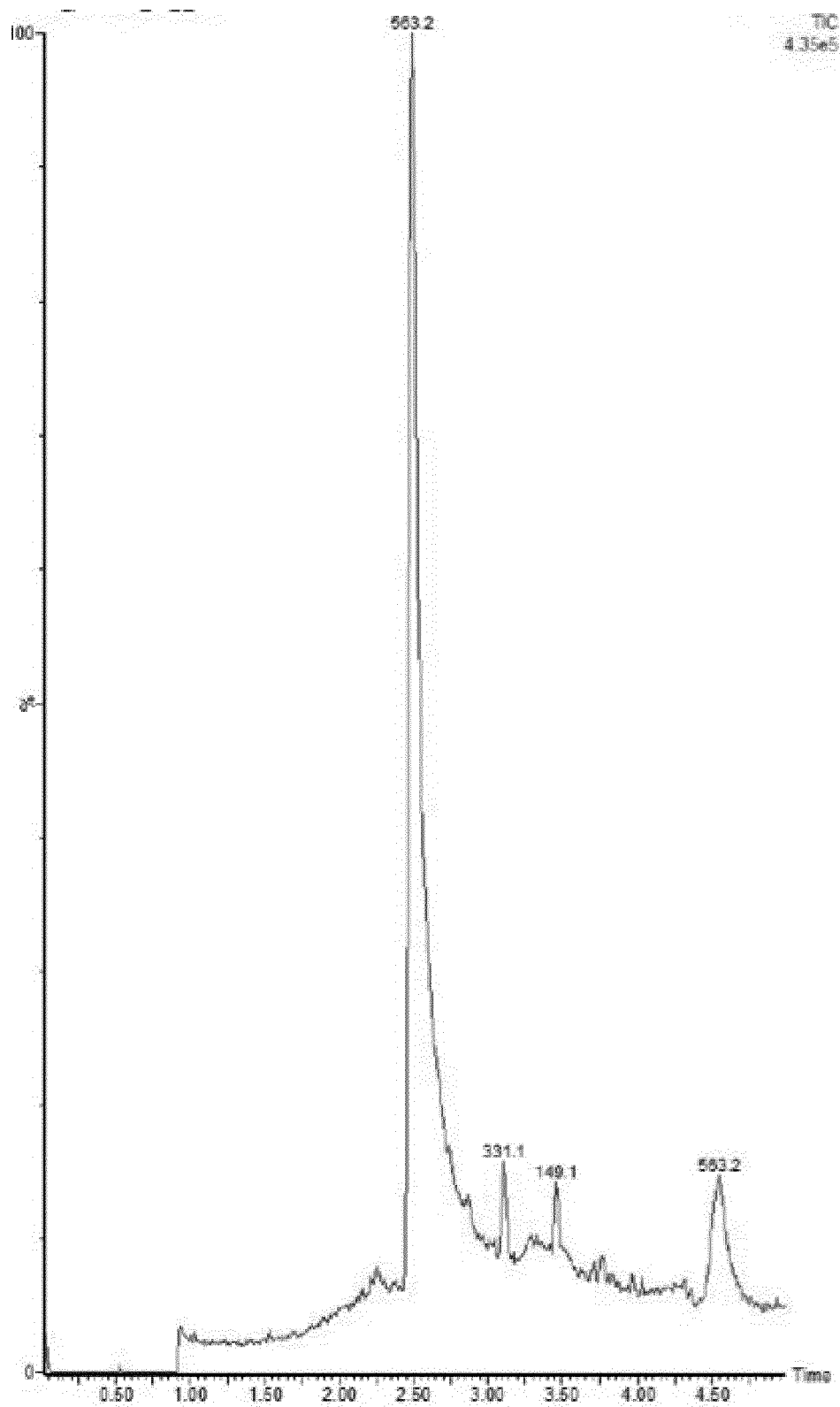


ФИГ. 12В

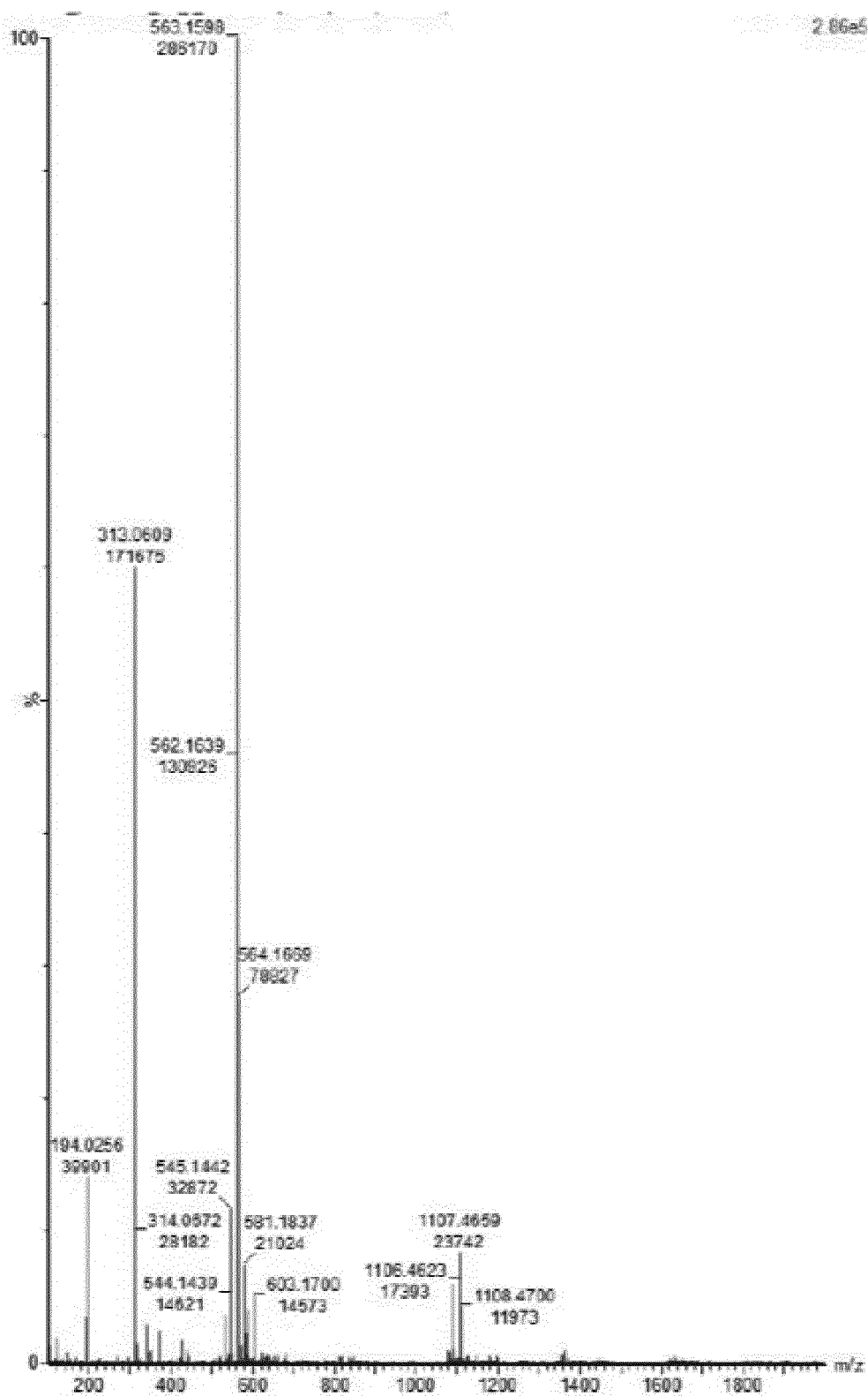


ФИГ. 12С

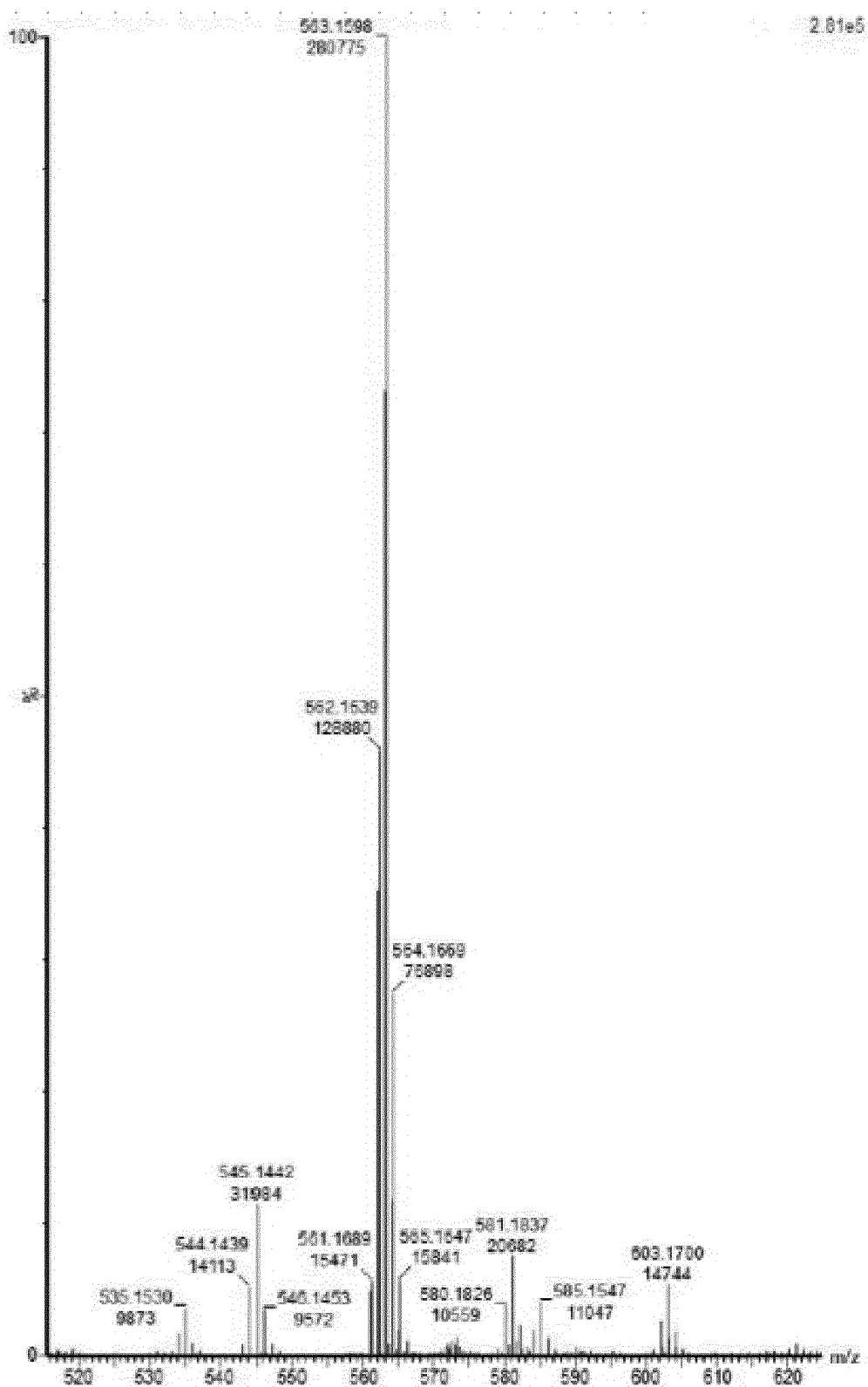
17/35



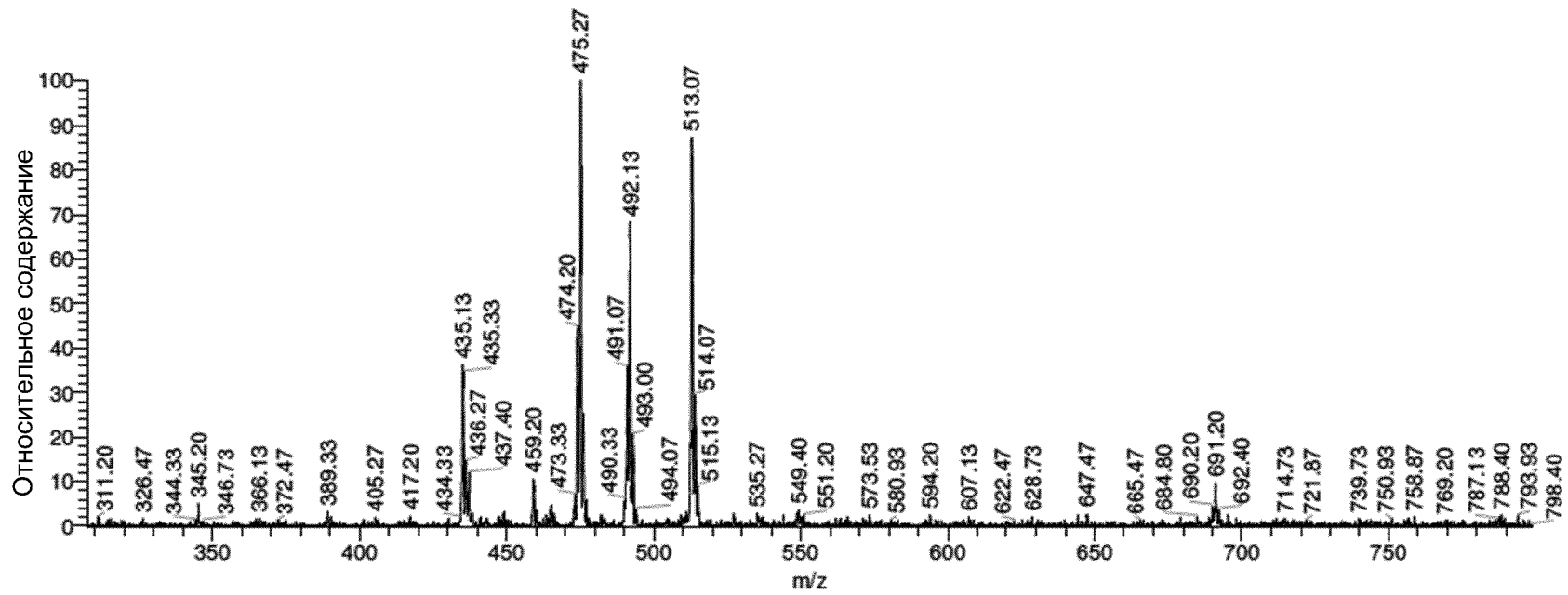
ФИГ. 13А



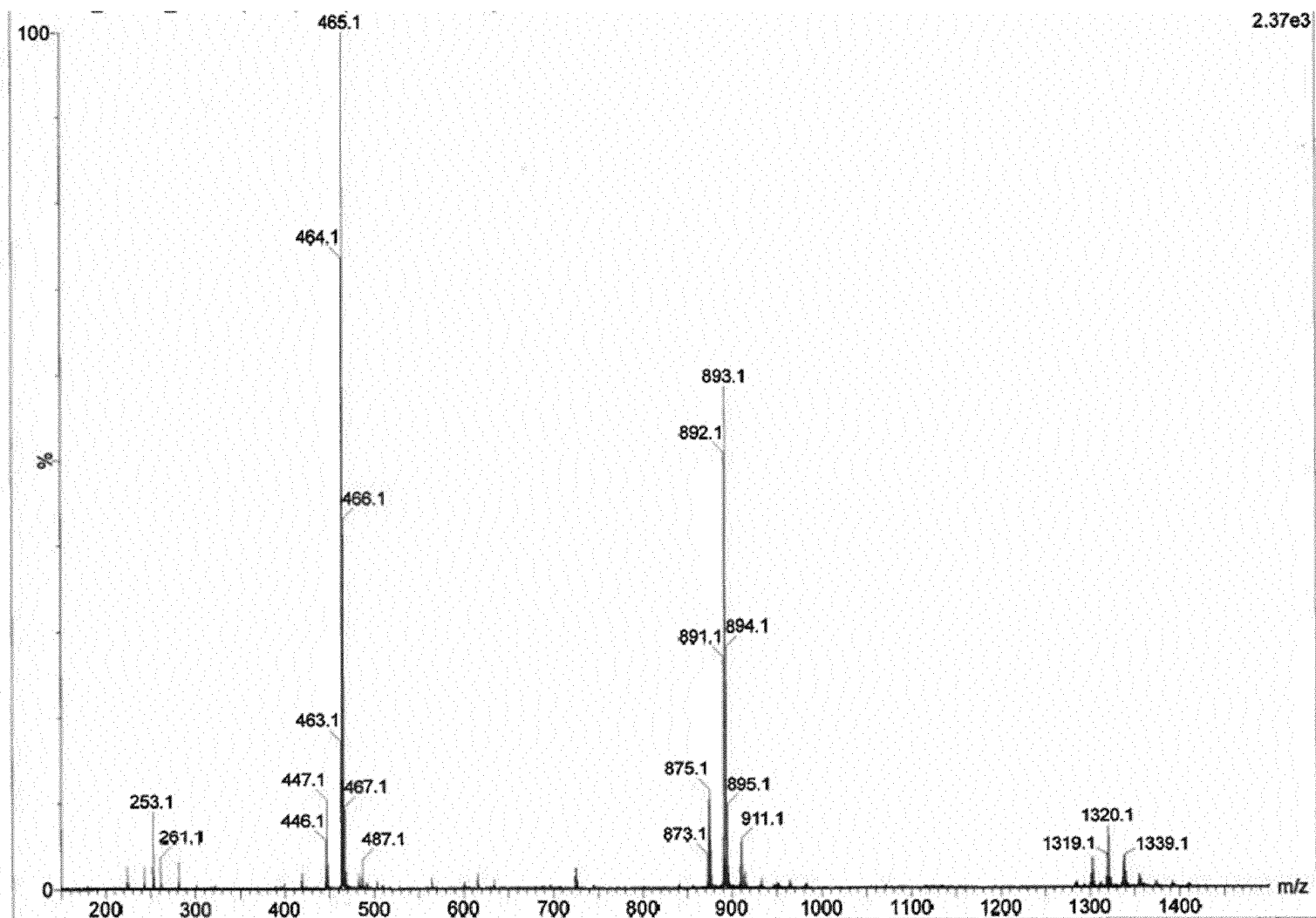
ФИГ. 13В



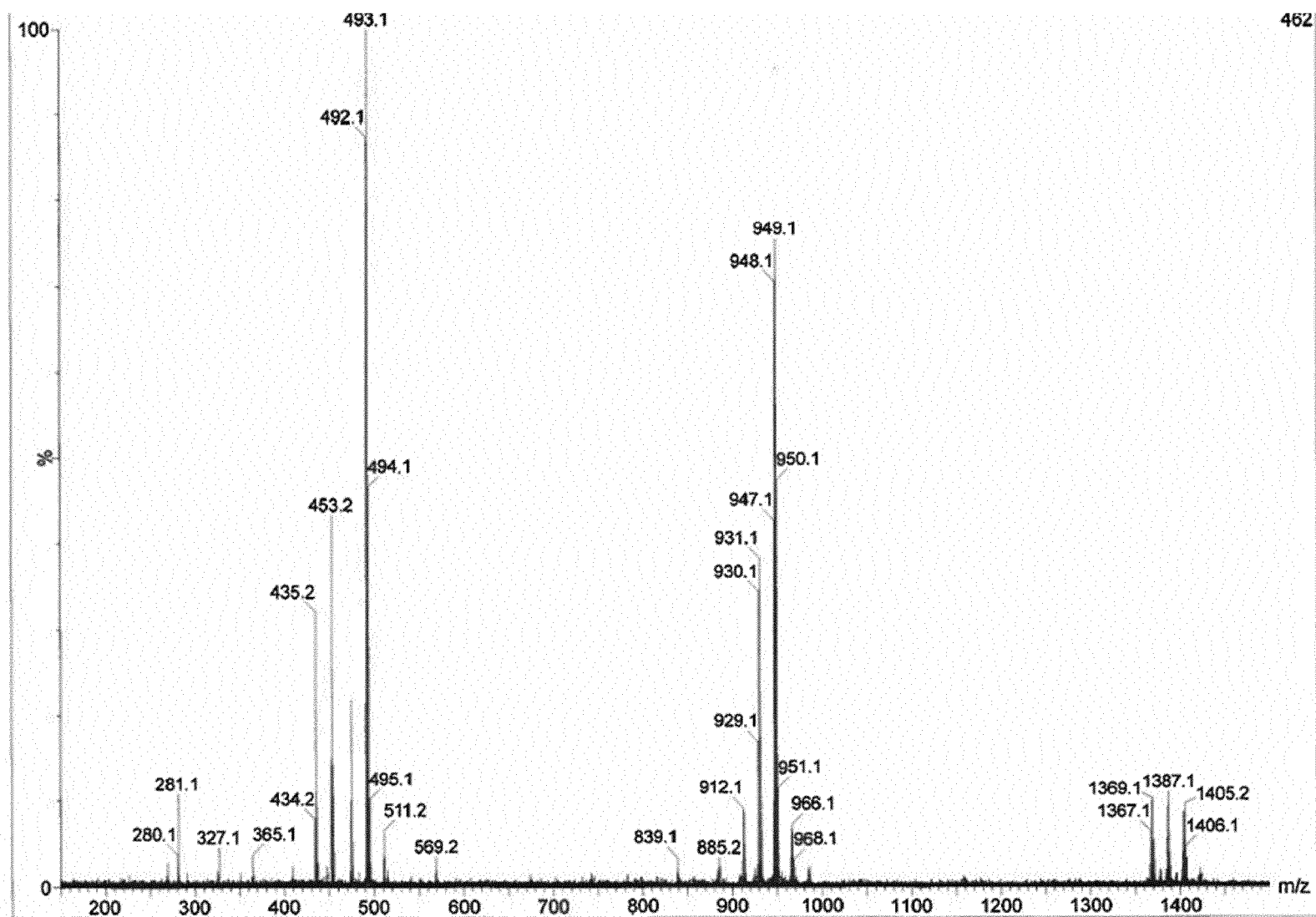
ФИГ. 13С



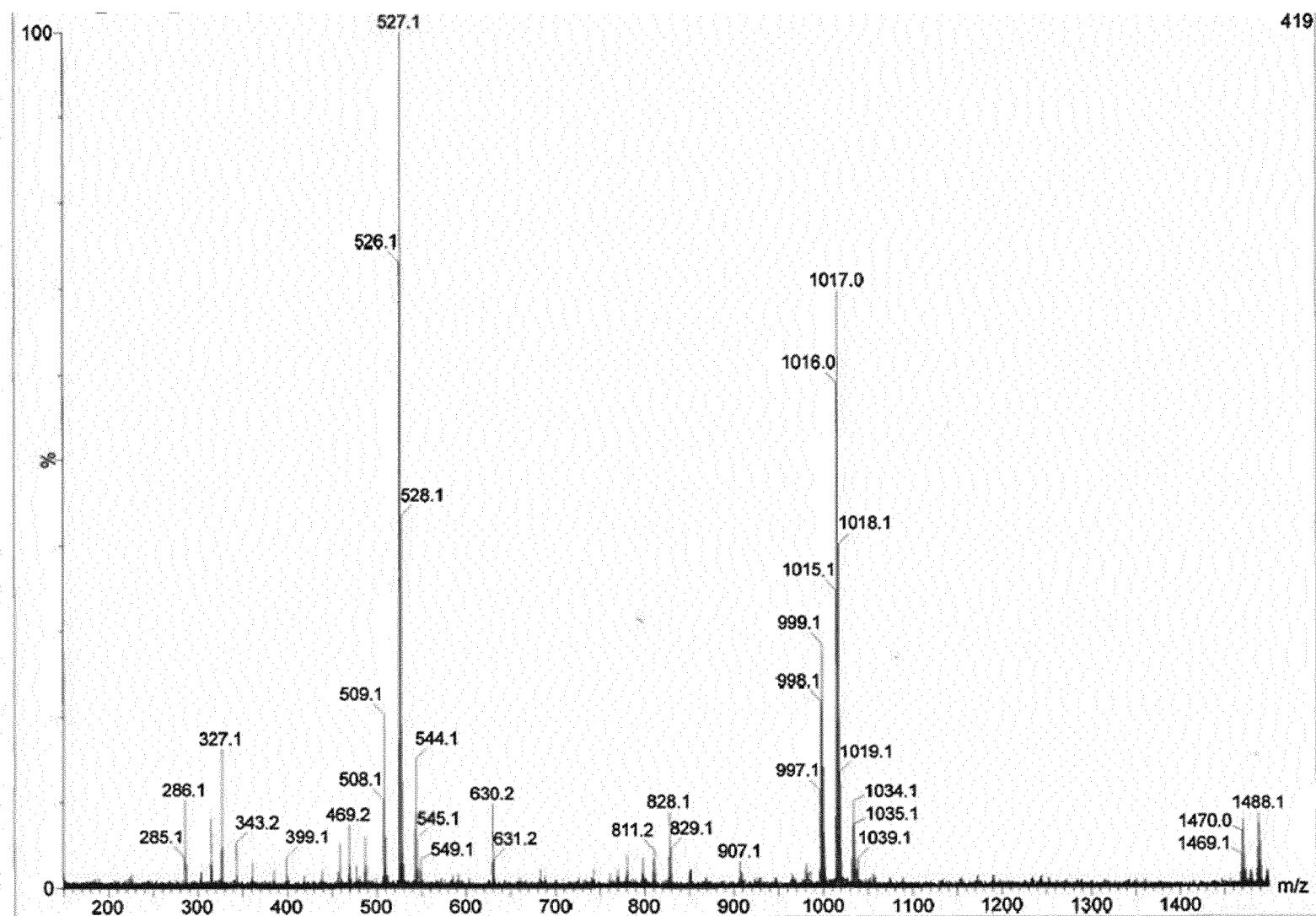
ФИГ. 14



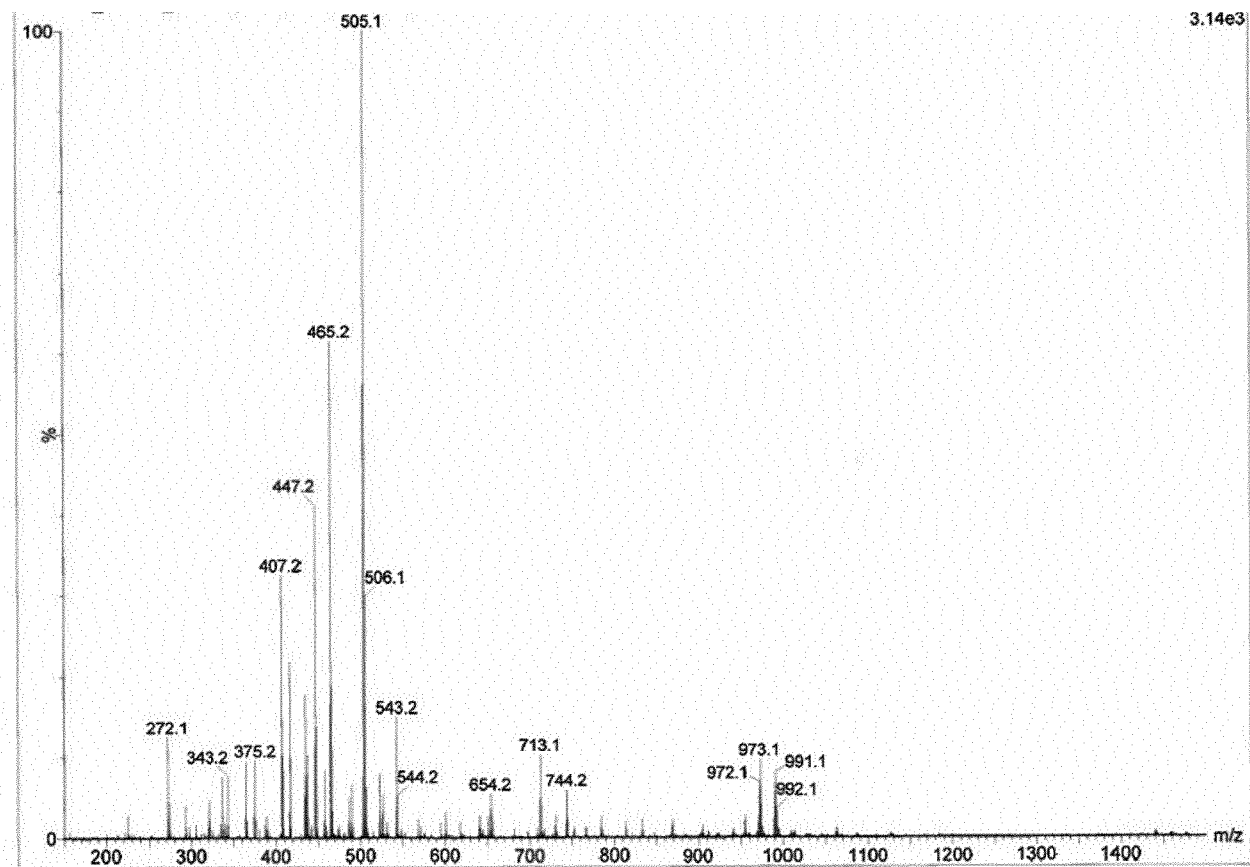
ФИГ. 15



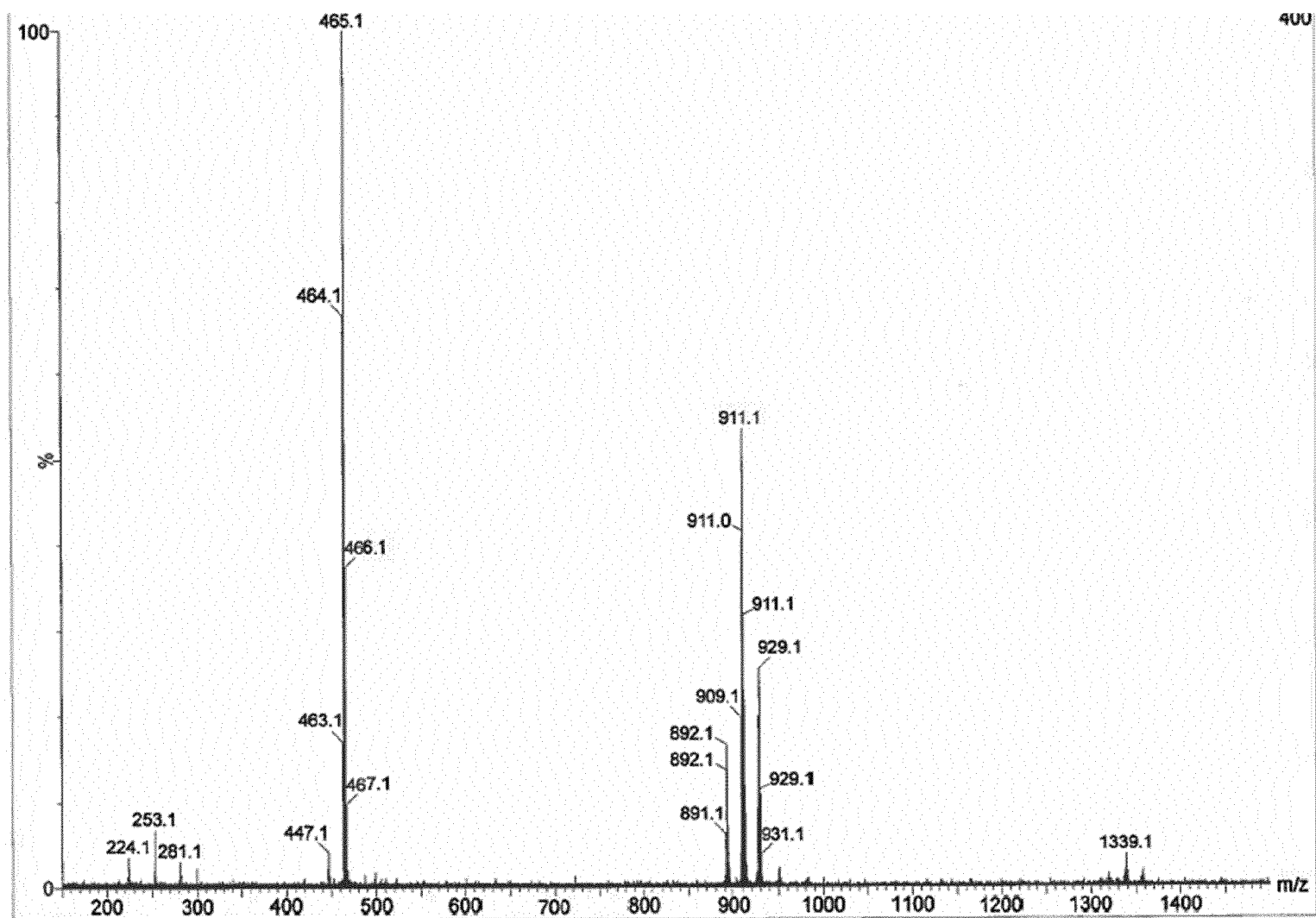
ФИГ. 16



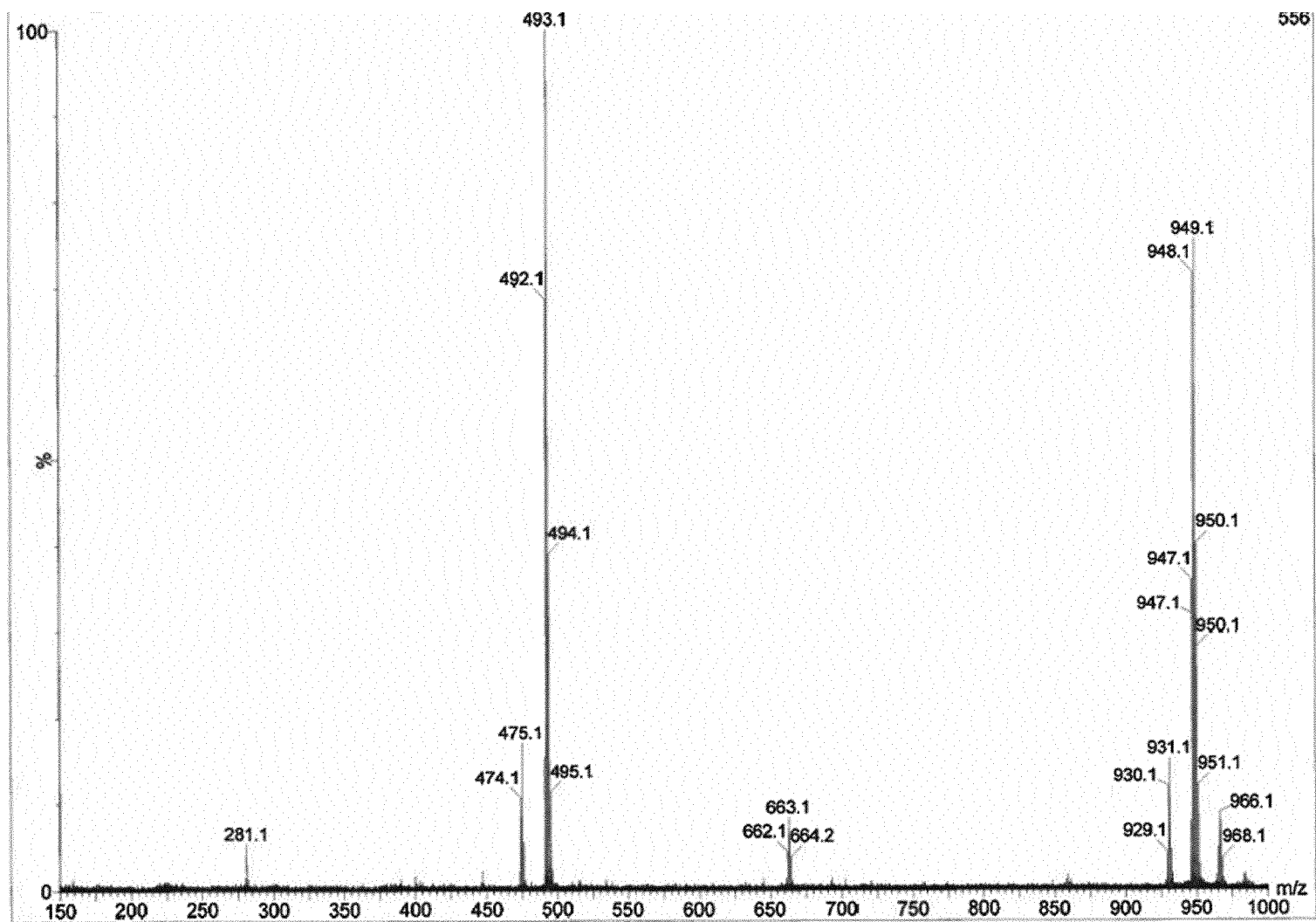
ФИГ. 17



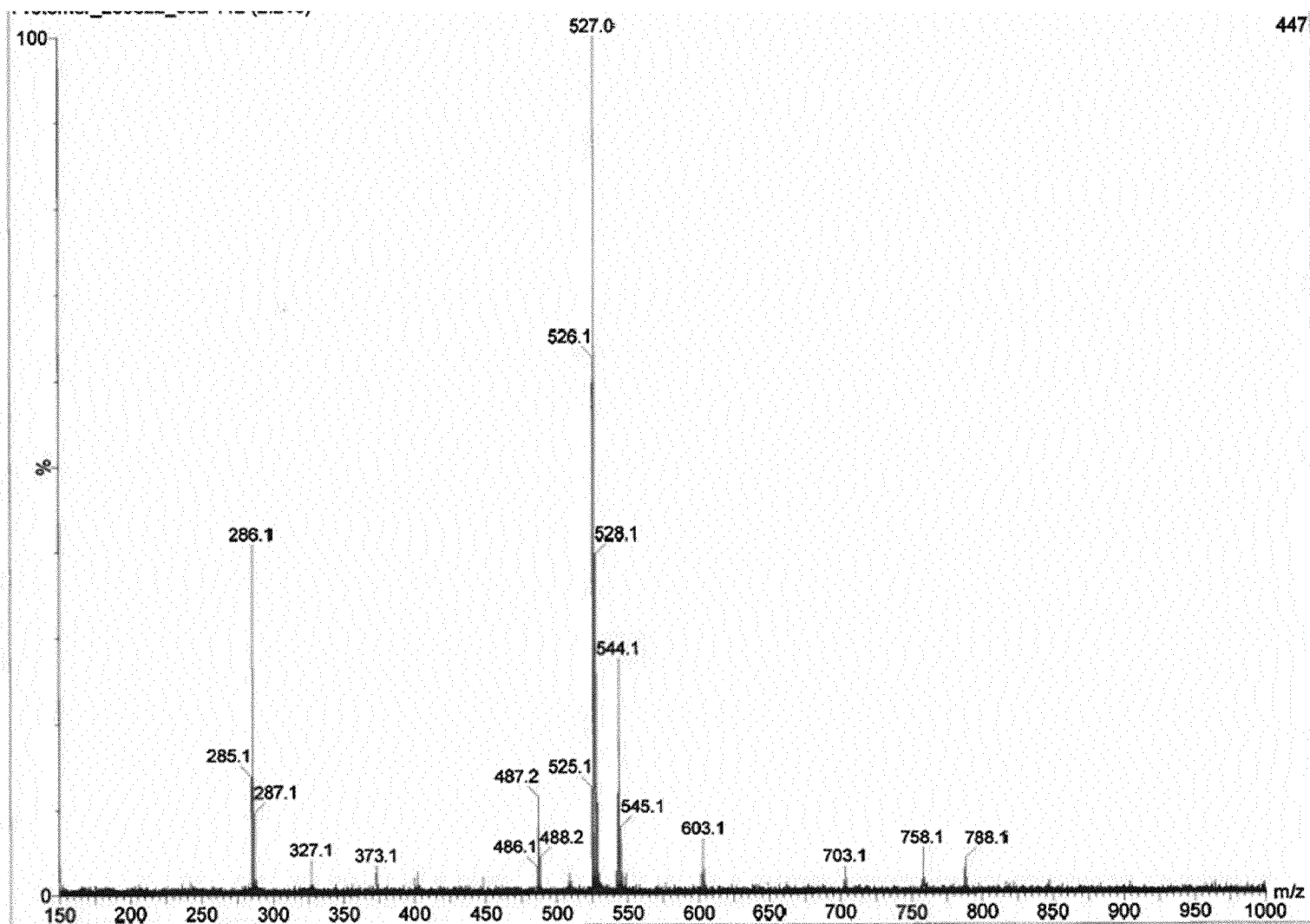
ФИГ. 18



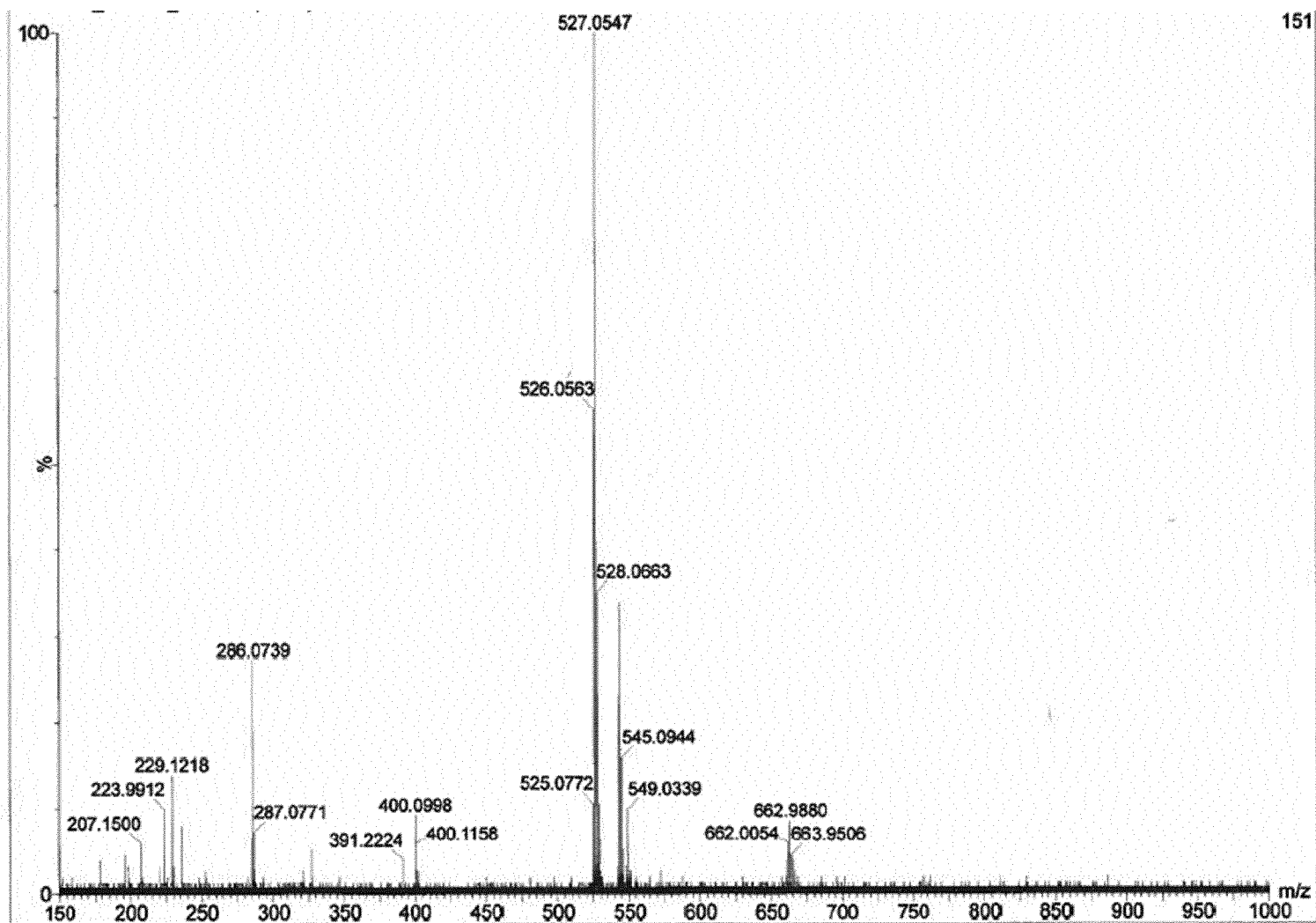
ФИГ. 19



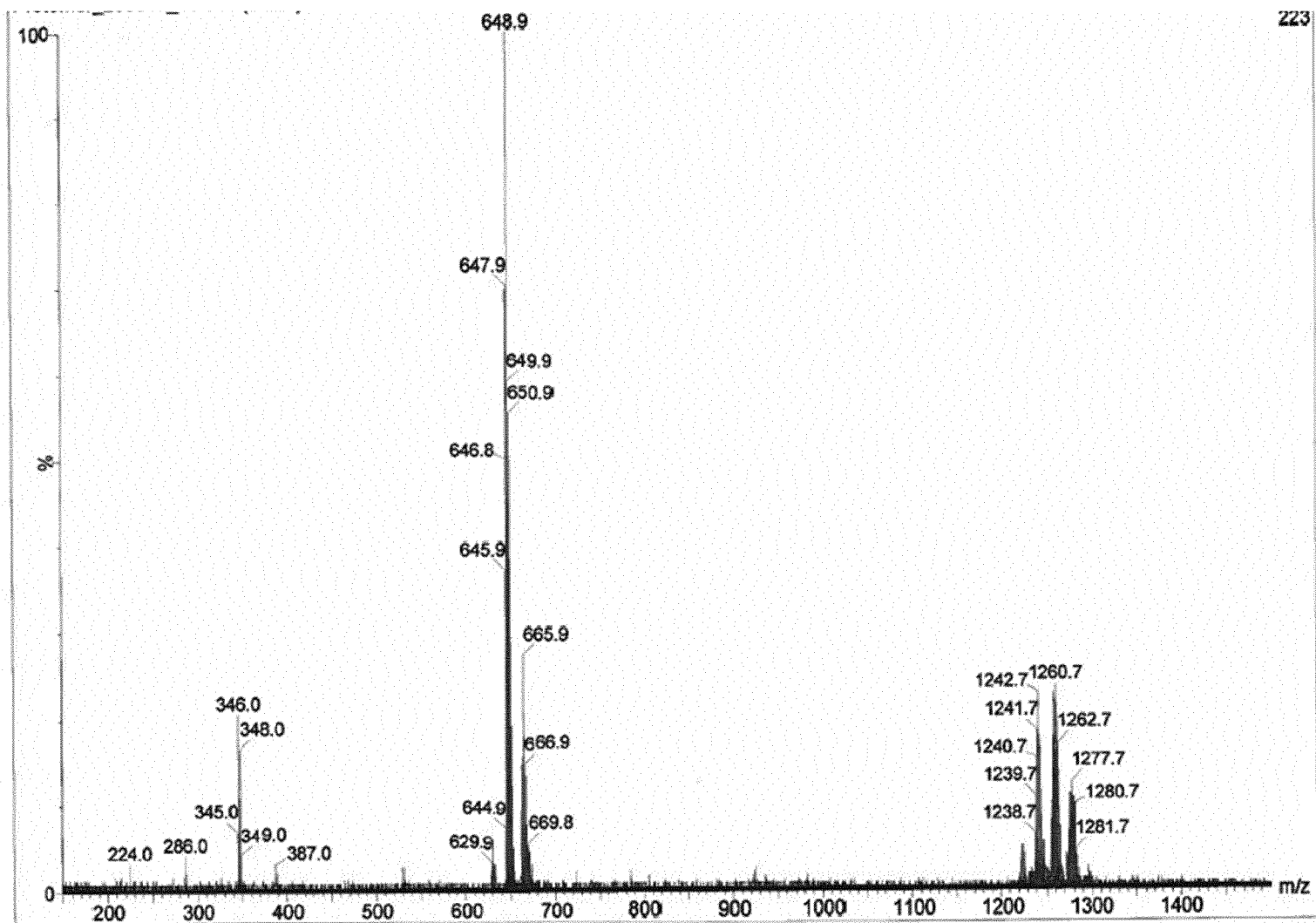
ФИГ. 20



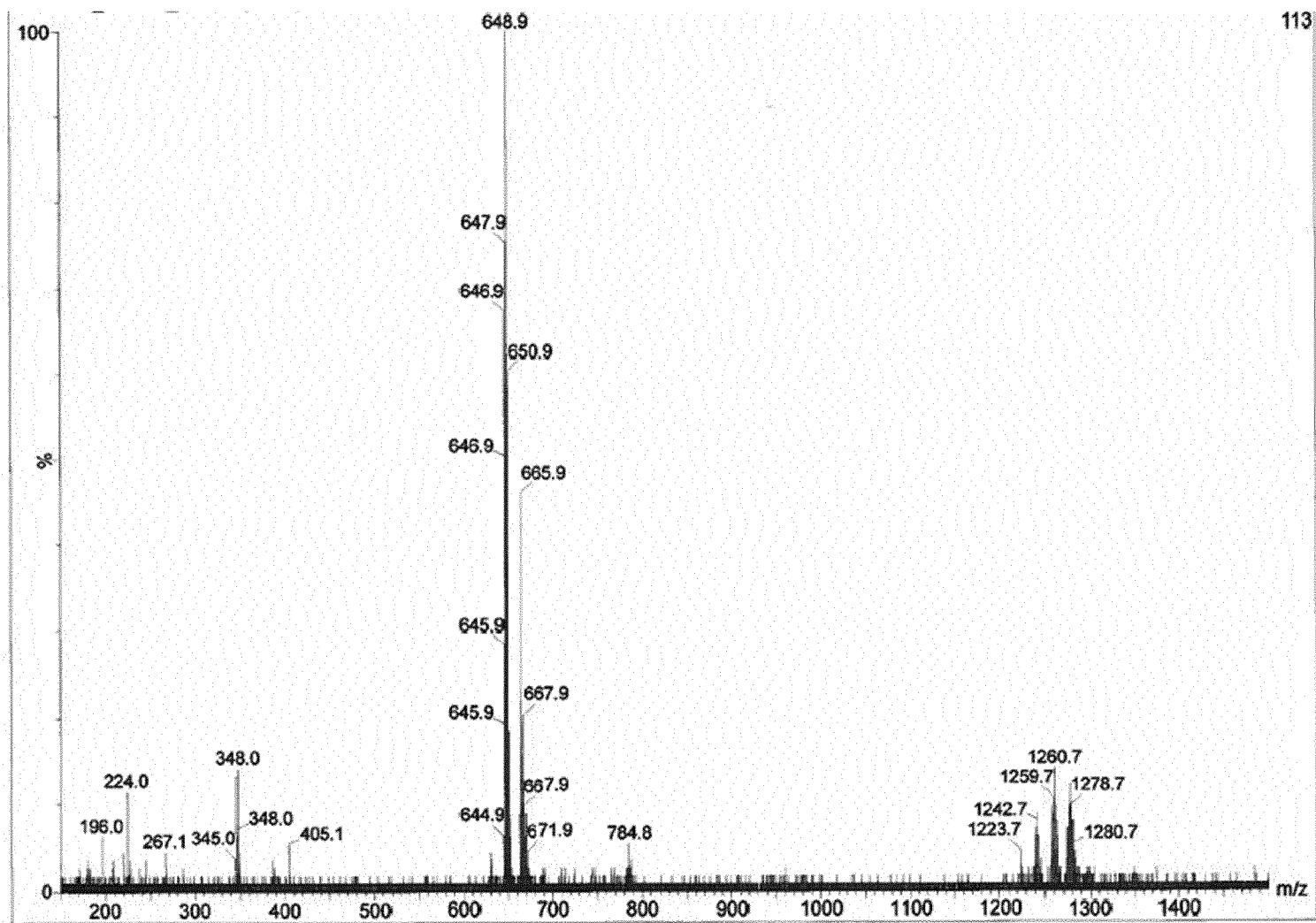
ФИГ. 21



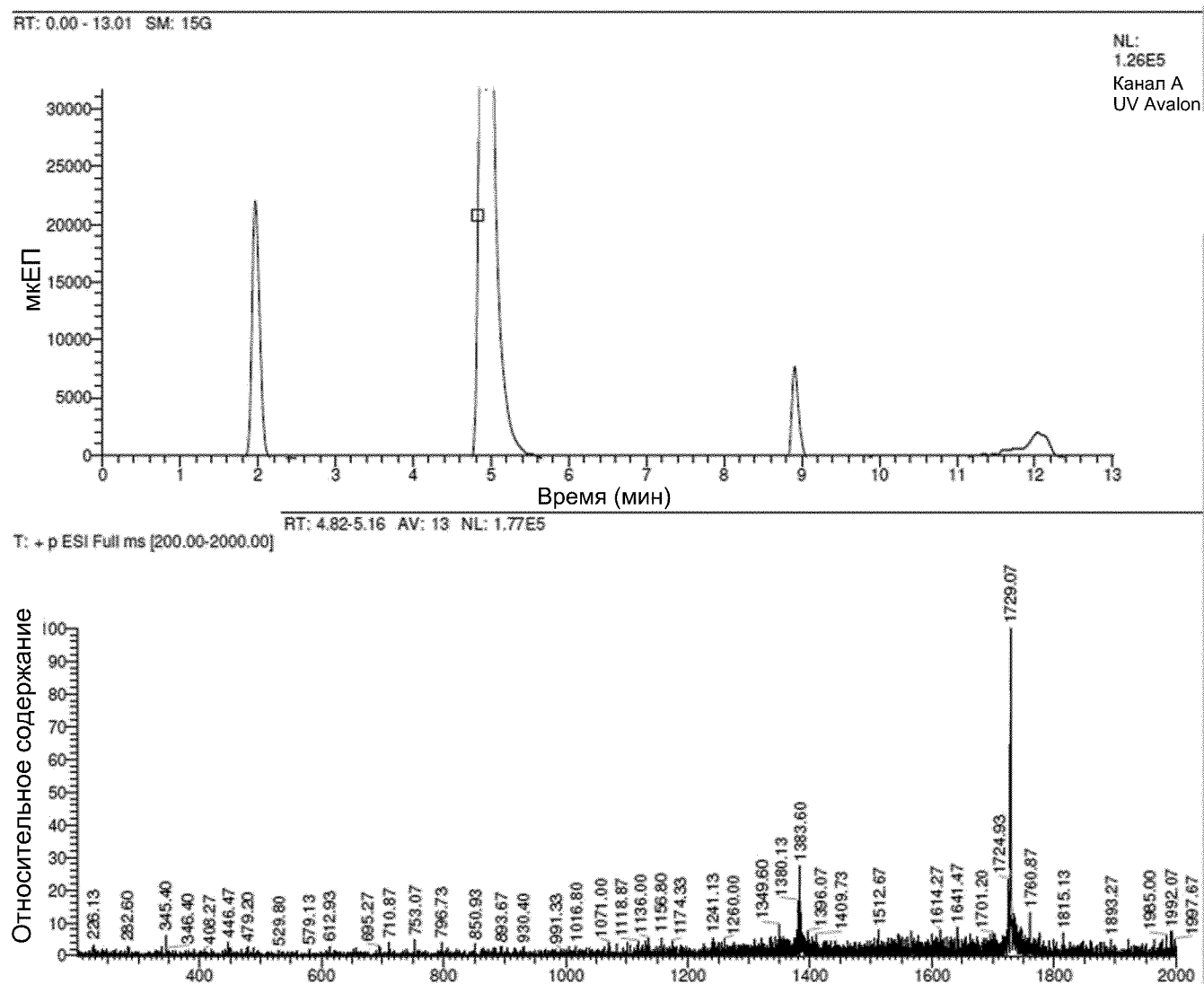
ФИГ. 22



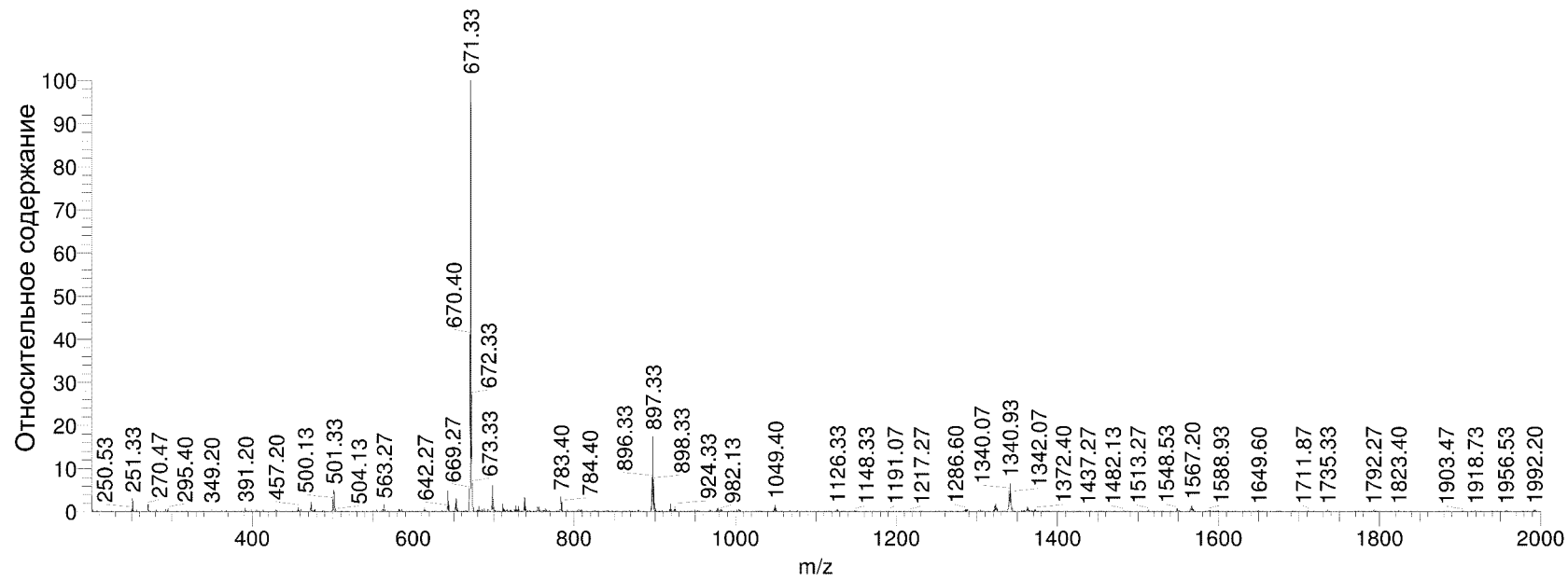
ФИГ. 23



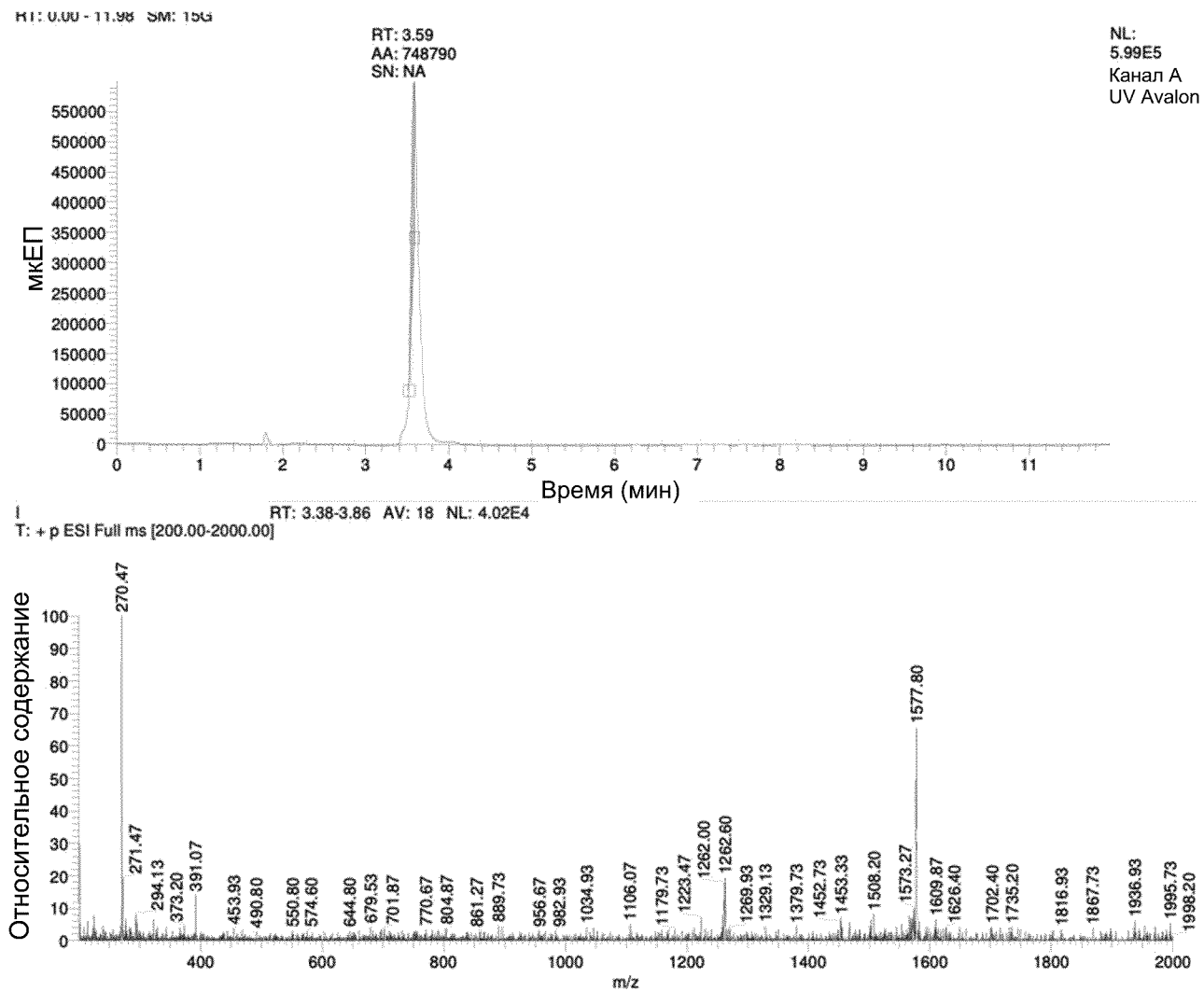
ФИГ. 24



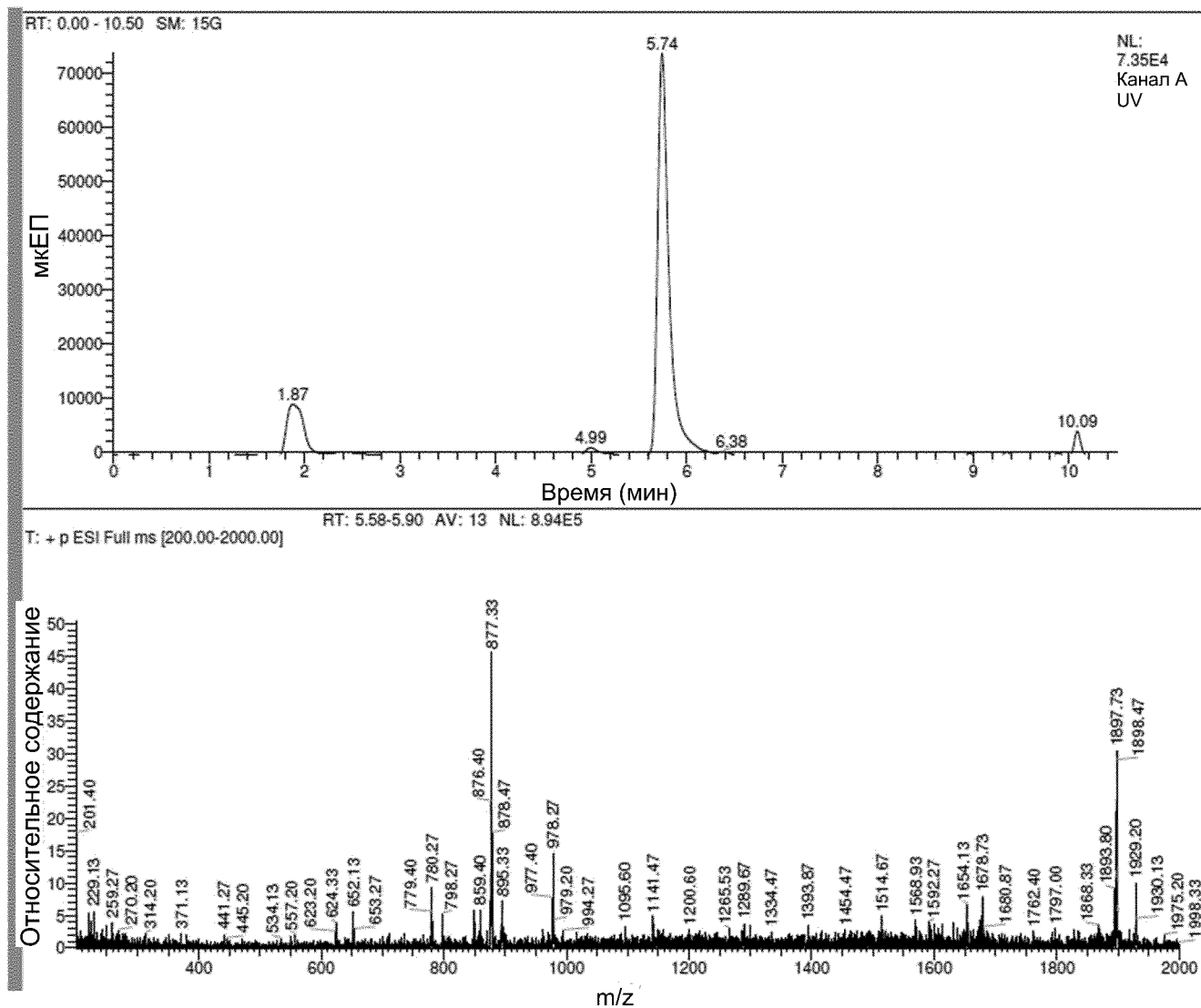
ФИГ. 25



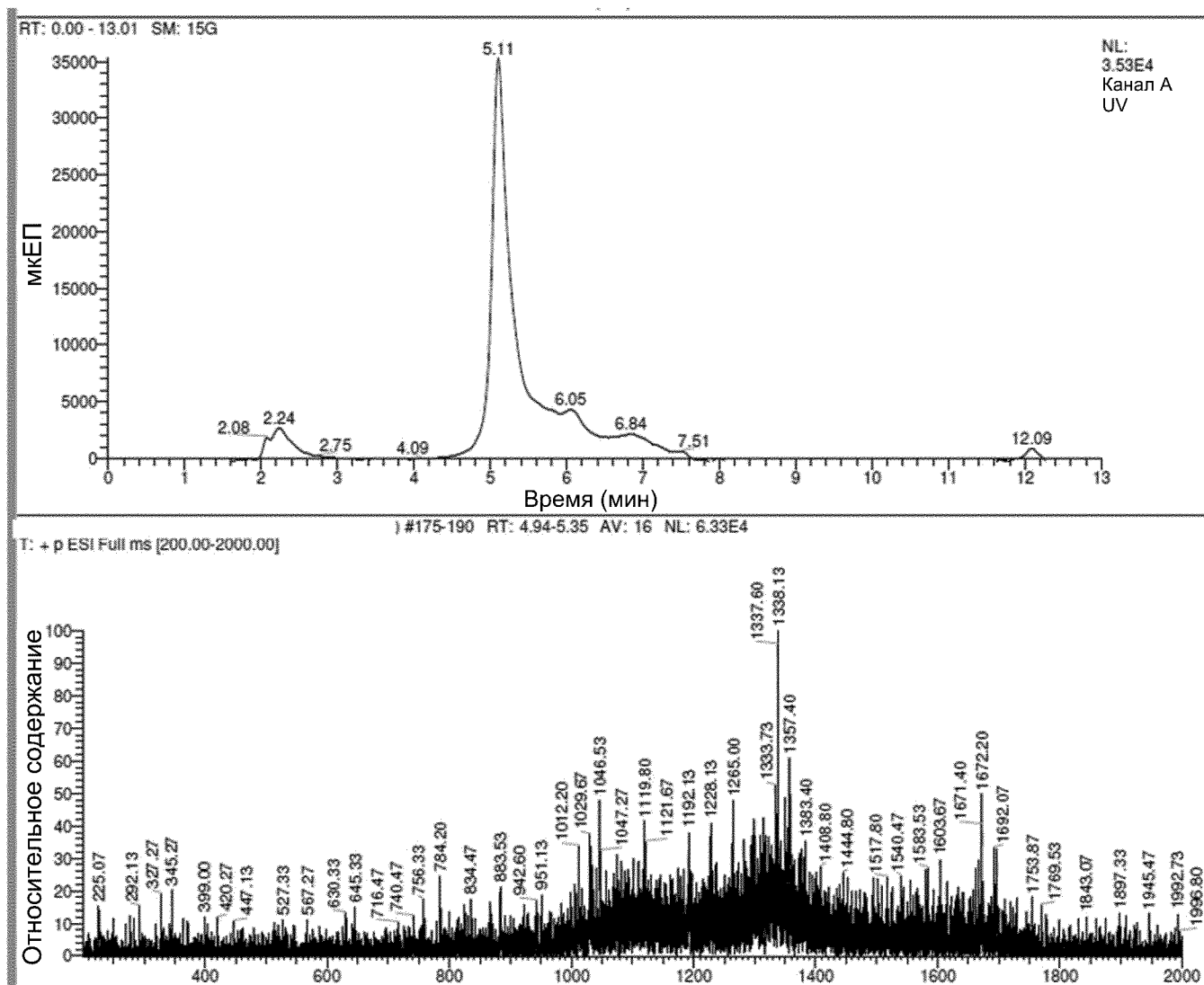
ФИГ. 26А



ФИГ. 26В



ФИГ. 27



ФИГ. 28