

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292957 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.17

(51) Int. Cl. C12N 11/08 (2020.01)
C12N 11/00 (2006.01)
C08F 20/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.16

(54) ПОЛИМЕРНЫЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА ДЛЯ
БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СОСТАВОВ

(31) 63/011,928; 63/159,306

(32) 2020.04.17; 2021.03.10

(33) US

(86) PCT/US2021/027693

(87) WO 2021/211976 2021.10.21

(88) 2021.11.18

(71) Заявитель:

ЗЕ БОАРД ОФ ТРАСТИИС ОФ ЗЕ
ЛИЛАНД СТАНФОРД ДЖУНИЭР
ЮНЕВЕРСЕТИ (US)

(72) Изобретатель:

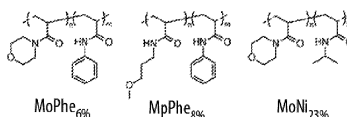
Аппел Эрик А., Майкава Кейтлин,
Мани Джозеф Л. (US)

(74) Представитель:

Суюндуков М.Ж. (KZ)

(57) Сополлимер на основе полиакриламида уменьшает или предотвращает агрегацию биологических молекул, включая белки, пептиды и нуклеиновые кислоты, а также носителей на основе липидов, таких как липосомы, липидные наночастицы, полимеросомы и мицеллы, в водных препаратах на гидрофобных поверхностях, тем самым повышая термическую стабильность молекул в составе. Способы и композиции, включающие сополимер и белок или сополимер и инсулин, можно применять для лечения патологических состояний, включая диабет.

Амфифильные вспомогательные вещества AC/DC



Водорастворимый носитель
 Гидрофобный допант

A1

202292957

202292957

A1

ПОЛИМЕРНЫЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА ДЛЯ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СОСТАВОВ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка претендует на приоритет по отношению к заявке США с серийным номером 63/011 928, поданной 17 апреля 2020 г., и заявке США с серийным номером 63/159 306, поданной 10 марта 2021 г., которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

ПРАВА ПРАВИТЕЛЬСТВА

Данное изобретение было выполнено при правительственной поддержке по гранту DK119254, присужденному Национальными институтами здравоохранения (NIH). Правительство имеет определенные права на данное изобретение.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к амфифильным вспомогательным веществам на основе полиакриламидного сополимера, которые можно применять для уменьшения или предотвращения агрегации биологических молекул, таких как белки и пептиды, и носителям на основе липидов в водных составах на гидрофобных поверхностях, тем самым повышая термическую стабильность молекул в указанном составе. Данное изобретение также относится к составам мономерного инсулина и совместным составам инсулина и других белков. Составы, содержащие сополимерное вспомогательное вещество, проявляют повышенную стабильность по сравнению с существующим инсулином, характеризующимся быстрым действием во время приема пищи.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Более 40 миллионов пациентов во всем мире живут с диабетом и полагаются на заместительную терапию инсулином посредством ежедневных подкожных инъекций инсулина или инсулиновых инфузионных помп. Организм этих пациентов не может вырабатывать достаточное количество инсулина, необходимого для стимулирования захвата глюкозы клетками для основных метаболических функций, и поэтому они должны вводить рассчитанные дозы инсулина для контроля гликемических отклонений. К сожалению, фармакокинетика современных составов инсулина не имитирует эндогенную секрецию инсулина, которая может достигать пиковой концентрации через 30 минут у человека, не страдающего диабетом. Даже современные «быстродействующие» аналоги инсулина, предназначенные для болюсов во время приема пищи, демонстрируют отсроченное начало действия через 20–30 минут, пик действия через 60–90 минут и

общую продолжительность действия 3–4 часа. Эта кинетика является результатом смешанных состояний ассоциации молекул инсулина в составе. Коммерческие составы инсулина обычно содержат смесь гексамеров, димеров и мономеров инсулина. В то время как мономеры быстро всасываются в кровоток после инъекции, димеры и гексамеры всасываются медленнее из-за их размера и должны диссоциировать на мономеры, чтобы стать активными (Фиг. 1). Кроме того, увеличенная продолжительность действия инсулина может затруднить контроль постпрандиальных гликемических отклонений и увеличить риск гипогликемии, поскольку инсулин может оставаться в кровотоке даже после того, как нагрузка глюкозой, связанная с приемом пищи, проходит.

Поэтому необходим состав инсулина, который быстро всасывается из подкожного пространства, чтобы более точно имитировать эндогенную постпрандиальную секрецию инсулина, для лучшего контроля уровня глюкозы в крови во время приема пищи. Состав мономерного инсулина обеспечивает как более быстрое начало, так и более короткую продолжительность действия, тем самым снижая риск постпрандиальной гипогликемии за счет устранения подкожного депо гексамеров инсулина (Фиг. 1А и Фиг. 1В). Однако мономерный инсулин нестабилен в составе и быстро агрегирует в амилоидные фибриллы, которые одновременно являются неактивными и иммуногенными. В данное время цинковые и фенольные консерванты обычно применяются в качестве вспомогательных веществ в составах инсулина, поскольку их способность содействовать образованию гексамера инсулина позволяет им функционировать в качестве стабилизирующих агентов. Крайне важно разработать новый класс вспомогательных веществ, способных повышать стабильность инсулина в мономерном состоянии, чтобы создать жизнеспособную форму инсулина сверхбыстрого действия.

Агрегация инсулина обычно инициируется на гидрофобных поверхностях, таких как граница раздела воздух-жидкость, где мономеры подвергаются частичному разворачиванию при адсорбции и могут вызывать образование амилоидных фибрилл (Фиг. 1С). Мономерное состояние наиболее подвержено агрегации, потому что за агрегацию ответственны гидрофобные фрагменты, обычно защищенные в димерных и гексамерных состояниях ассоциации. Современные безцинковые способы стабилизации мономерного инсулина основаны на защите гидрофобных взаимодействий путем ковалентного или нековалентного присоединения гидрофильных полимеров, таких как поли(этиленгликолевые) (PEG) или трегалозогликолевые полимеры, непосредственно к инсулину. Хотя эти способы оказались эффективными для стабилизации инсулина в составе, они приводят к увеличению времени циркуляции *in vivo*, что является нежелательным для состава инсулина сверхбыстрого действия. Кроме того, в то время как

поли(этиленгликолевые) полимеры традиционно применялись для доставки лекарственных средств благодаря их растворимости в воде и биосовместимости, недавно возникшие опасения по поводу иммуногенности начинают ограничивать их применение.

Альтернативный подход к стабилизации инсулина использует склонность амфифильных полимеров занимать границу раздела, предотвращая взаимодействие инсулина с границей раздела (Фиг. 1С). Поллоксамеры являются примером полимерных поверхностно-активных веществ, которые применялись для повышения стабильности коммерческих составов инсулина (INSUMAN® U400, Sanofi-Aventis). Тем не менее, эти поллоксамерные вспомогательные вещества занимают ограниченное химическое пространство, проявляют склонность к образованию микроструктур, таких как мицеллы, в растворе и восприимчивы к переходу в гели при высоких концентрациях, и как таковая, стабильная сверхбыстрая мономерная форма инсулина все еще не разработана.

Инсулин применяется для лечения диабета уже почти 100 лет, однако существующие препараты инсулина быстрого действия не обладают достаточно быстрой фармакокинетикой для поддержания жесткого гликемического контроля в периоды быстрых колебаний уровня глюкозы, например, во время приема пищи. Диссоциация гексамера инсулина, первичное состояние ассоциации инсулина в составах быстрого действия, является этапом, ограничивающим скорость, который приводит к отсроченному началу и увеличению продолжительности действия. Состав из мономеров инсулина более точно имитирует эндогенную постпрандиальную секрецию инсулина, но при применении известных стратегий приготовления мономерный инсулин нестабилен в растворе и быстро агрегирует в амилоидные фибриллы.

У пациентов с определенными типами диабета отсутствует достаточная масса бета-клеток поджелудочной железы и/или их функция для продукции как эндогенного инсулина, так и амилина. У людей, не страдающих диабетом, инсулин и амилин действуют синергетически, контролируя постпрандиальную глюкозу; амилин задерживает опорожнение желудка и подавляет действие глюкагона, в то время как инсулин способствует поглощению глюкозы клетками. Проведенные исследования продемонстрировали, что двойная заместительная гормональная терапия инсулином и амилином приводит к улучшению исходов гликемии у пациентов с диабетом, включая снижение HbA1c на 0,3% по сравнению с лечением только инсулином. Однако лечение диабета 1 типа за последние 100 лет в основном было сосредоточено на заместительной терапии инсулином. Хотя существует коммерчески доступный аналог амилина (прамлинтид), к 2012 году приняли его только 1,5% пациентов, которым была бы полезна заместительная терапия амилином. В первую очередь это связано с трудностями при

составлении препарата, которые приводят к необходимости обременительной отдельной инъекции амилаина в дополнение к инсулину во время еды.

Амилин очень нестабилен и быстро агрегирует с образованием неактивных и иммуногенных амилоидных фибрилл. Прамлинтид, аналог амилаина, имеет три аминокислотные модификации для снижения его склонности к агрегации в амилоидные фибриллы, что увеличивает срок его хранения, но его состав имеет $pH=4$, что делает его несовместимым с препаратами инсулина (обычно $pH\sim 7$). Кроме того, при типовом клиническом введении инсулин и прамлинтид имеют несопоставимую фармакокинетику, в отличие от эндогенной совместной секреции двух гормонов бета-клетками в соответствии с одними и теми же суточными профилями. Разница в кинетике абсорбции при экзогенной доставке является результатом различных состояний ассоциации инсулина и прамлинтида в составе (Фиг. 15А). Прамлинтид существует только в виде мономера, в то время как составы инсулина содержат смесь гексамеров, димеров и мономеров. Сочетание состояний ассоциации инсулина приводит к замедлению всасывания и увеличению продолжительности действия инсулина.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении предлагаются сополимерные вспомогательные вещества на основе полиакриламида, которые содержат водорастворимый мономер-носитель с реакционноспособным акриламидным фрагментом и функциональный мономер-допант с реакционноспособным акриламидным фрагментом. Было обнаружено, что сополимеры уменьшают или предотвращают агрегацию биологических молекул и носителей на основе липидов в водных составах на гидрофобных границах раздела. Таким образом, биологические молекулы и носители на основе липидов в составах, содержащих сополимеры на основе полиакриламида, проявляют повышенную устойчивость, такую как повышенная термическая стабильность, по сравнению с теми же составами, которые не содержат сополимеров на основе полиакриламида. Соплимеры на основе полиакриламида можно применять с любой биологической молекулой или носителем на основе липидов, которые подвержены агрегации в водной среде, включая, помимо прочего, белки, такие как антитела и их фрагменты, цитокины, хемокины, гормоны, вакцины, антигены, раковые антигены, адъюванты и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры на основе полиакриламида снижают или предотвращают агрегацию белка, подверженного агрегации в водной среде. Соплимеры на основе полиакриламида также

можно применять с носителями на основе липидов, которые подвержены агрегации в водной среде, включая, помимо прочего, липосомы, липидные наночастицы, полимеросомы и мицеллы, для предотвращения или уменьшения агрегации.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой инсулин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида применяется при разработке состава инсулина лизпро со сверхбыстрой абсорбцией (UFAL), который остается стабильным в стрессовых условиях выдерживания в течение 25 ± 1 часов по сравнению с 5 ± 2 часами для коммерческих быстродействующих препаратов инсулина лизпро (HUMALOG®). В модели диабета с дефицитом инсулина на свиньях, UFAL проявлял пик действия через 9 ± 4 минуты, в то время как коммерческий HUMALOG® проявлял пик действия через 25 ± 10 минут. Эта сверхбыстрая кинетика делает UFAL многообещающим кандидатом, направленным на улучшение контроля уровня глюкозы и снижения бремени болезни у пациентов с диабетом.

В соответствии с типовыми вариантами осуществления данного изобретения сополимерные вспомогательные вещества на основе полиакриламида позволяют получить стабильный состав сверхбыстродействующего мономерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эти вспомогательные вещества представляют собой синтетические сополимеры, состоящие из водорастворимого мономера-носителя, выбранного для улучшения растворимости полимера, и функциональной мономера-допанта, который дает возможность скринировать широкий химический диапазон, неисследованный в существующих поверхностно-активных вспомогательных веществах. Предполагается, что мономер-допант способствует взаимодействию полимера с границей раздела, уменьшая взаимодействие «инсулин-инсулин» на границе раздела и, таким образом, улучшает стабильность инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применяют прецизионный высокопроизводительный синтез с использованием обратной полимеризации с переносом дополнительной фрагментации (RAFT) для создания библиотеки из более чем 100 сополимеров на основе полиакриламида. В данном изобретении продемонстрировано, что сополимеры на основе полиакриламида позволяют получить стабильный состав мономерного инсулина лизпро и что этот состав инсулина лизпро со сверхбыстрой абсорбцией (UFAL) демонстрирует фармакокинетику, которая в 2 раза быстрее, чем у коммерческих быстродействующих составов инсулина в модели диабета с дефицитом инсулина на свиньях.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры на основе полиакриламида обеспечивают стабильный совместный состав мономерного инсулина лизпро и прамлинтида с синхронизированной сверхбыстрой фармакокинетикой инсулина-прамлинтида, что приводит к лучшему гликемическому контролю при имитации приема пищи. Этот совместный состав имеет потенциал для улучшения контроля уровня глюкозы и снижения бремени болезни у пациентов в клинической практике, применяя его там, где в противном случае применяли бы быстродействующий инсулин. Описанные в данном документе сополимерные вспомогательные вещества также могут применяться в более широком смысле для улучшения термической стабильности белковых составов, включая составы инсулина, в качестве простых «добавочных» вспомогательных веществ без изменения их биологической активности, фармакокинетики или фармакодинамики. Например, сополимерные вспомогательные вещества, описанные в данном документе, можно применять в качестве добавочного вспомогательного вещества в сочетании с другими подходами к приготовлению состава, предназначенными для изменения или модуляции фармакокинетики белкового состава.

Также в данном изобретении предлагается сополимер на основе полиакриламида, содержащий водорастворимый мономер-носитель, содержащий реакционноспособную акриламидную группу; и функциональный мономер-допант, содержащий реакционноспособный акриламидный фрагмент; при этом массовый процент водорастворимого мономера-носителя составляет от около 70 мас. % до около 98 мас. %; массовый процент функционального мономера-допанта составляет от около 2 мас. % до около 30 мас. %; средняя молекулярная масса (M_n) сополимера на основе полиакриламида составляет от около 1000 г/моль до около 30000 г/моль; и степень полимеризации составляет от около 10 до около 250.

Как описано в данном документе, для создания большой библиотеки сополимерных вспомогательных веществ на основе полиакриламида были реализованы высокопроизводительные методы контролируемой радикальной полимеризации. Неограничивающие примеры сополимеров на основе полиакриламида согласно данному изобретению включают сополимер на основе полиакриламида, включающий водорастворимый мономер-носитель, выбранный из группы, состоящей из *N*-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), *N,N*-диметилакриламида (DMA), *N*-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM); и функциональный мономер-допант, выбранный из группы, состоящей из *N*-[трис(гидроксиметил)-метил]акриламида (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой

кислоты (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмоний хлорида (TMA), *N*-изопропилакриламида (NIP), *N-трет*-бутилакриламида (TBA) и *N*-фенилакриламида (PHE).

В данном изобретении предлагается композиция, содержащая от около 0,005 мас. % до около 0,2 мас. % сополимера на основе полиакриламида, содержащего от около 70% до около 95% по массе мономера-носителя MORPH; и от около 5% до около 30% по массе мономера-допанта NIP; а также около 100 Ед/мл инсулина или его аналога.

В данном изобретении также предлагается композиция, содержащая от около 0,005 мас. % до около 0,2 мас. % сополимера на основе полиакриламида, содержащего от около 70% до около 95% по массе мономера-носителя MORPH; и от около 5 % до около 30% по массе мономера-допанта NIP; около 100 Ед/мл инсулина или его аналога; а также от около 0,01 мг/мл до около 0,1 мг/мл прамлинтида.

В данном изобретении также предлагается способ лечения диабета у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению.

В данном изобретении также предлагается способ контроля уровня глюкозы в крови у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению.

В данном изобретении также предлагается способ повышения стабильности состава, содержащего биологическую молекулу, включающий добавление к составу от около 0,005 мас. % до около 5 мас. % сополимера на основе полиакриламида по данному изобретению.

В данном изобретении также предлагается способ повышения стабильности белкового состава, включающий добавление к белковому составу от около 0,005 мас. % до около 5 мас. % сополимера на основе полиакриламида по данному изобретению.

В данном изобретении также предлагается способ повышения стабильности состава, содержащего носитель на основе липида, включающий добавление к составу от около 0,005 мас. % до около 5 мас. % сополимера на основе полиакриламида по данному изобретению.

В данном изобретении также предлагается способ снижения скорости агрегации биологической молекулы в водной композиции, включающий добавление к составу от около 0,005 мас. % до около 5 мас. % сополимера на основе полиакриламида по данному изобретению.

В данном изобретении также предлагается способ снижения скорости агрегации белка в водной композиции, включающий добавление к белковому составу от около 0,005 мас. % до около 5 мас. % сополимера на основе полиакриламида по данному изобретению.

В данном изобретении также предлагается способ снижения скорости агрегации носителя на основе липида в водной композиции, включающий добавление к составу от около 0,005 мас. % до около 5 мас. % сополимера на основе полиакриламида по данному изобретению.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 проиллюстрирована схема кинетики абсорбции различных состояний ассоциации инсулина. Фиг. 1А: Коммерческие формы инсулина «быстрого действия» содержат смесь гексамеров, димеров и мономеров инсулина. Активной является только мономерная форма инсулина, поэтому скорость диссоциации гексамера до мономера ограничивает терапевтическое действие. Препарат сверхбыстрого инсулина должен содержать в основном мономеры инсулина и не содержать гексамеров инсулина для быстрой абсорбции инсулина после подкожного введения. На Фиг. 1В проиллюстрирована смесь гексамеров, димеров и мономеров инсулина в коммерческих составах инсулина быстрого действия, что приводит к увеличению продолжительности действия инсулина при подкожном введении. Мономеры инсулина всасываются примерно через 5-10 минут, димеры – через 20-30 минут, а гексамеры могут всасываться в течение 1-2 часов, что соответственно приводит к пролонгированному действию инсулина. Главным образом состав мономеров инсулина может сократить время до начала действия и привести к более короткой продолжительности действия инсулина для лучшего контроля уровня глюкозы в крови во время еды. На Фиг. 1С проиллюстрирован безгексамерный состав инсулина сверхбыстрого действия, который столкнется с проблемами стабильности из-за склонности мономеров инсулина к агрегации в амилоидные фибриллы. На границе раздела «воздух-вода» (показано слева) развертывание молекул инсулина и обнажение гидрофобных доменов во время взаимодействия «инсулин-инсулин» способствует образованию амилоидных волокон. Стабилизирующие полимерные вспомогательные вещества притягиваются к границе раздела «воздух-жидкость» (показано справа), препятствуя развертыванию молекул инсулина и межфазной нуклеации инсулинового амилоидоза.

На Фиг. 2 проиллюстрирована схема дизайна библиотеки полимерных вспомогательных веществ. Библиотека статистических сополимеров акриламида с целевой степенью полимеризации (DP) 50 была синтезирована путем контролируемой

сополимеризации с помощью RAFT. Комбинации сополимеров состоят из одного мономера-носителя: акрилоилморфолина (MORPH), метоксипропилакриламида (MPAM), диметилакриламида (DMA), гидроксиэтилакриламида (HEAM) или акриламида (AM). Каждый сополимер также содержит один мономер-допант: трис(гидроксиметил)метилакриламид (TRI), акриламидометилпропансульфоновую кислоту (AMP), акриламидопропилтриметиламмоний хлорид (ТМА), *n*-изопропилакриламид (NIP), третбутилакриламид (ТВА) или фенилакриламид (PHE). Каждая комбинация «носитель-допант» повторялась при низкой, средней и высокой загрузках допанта: NIP при 6,7, 13,3 и 20 мас. %, TRI при 5, 10 и 15 мас. % и AMP, ТМА, ТВА, PHE при 3,3, 6,7 и 10 мас. %.

На Фиг. 3 проиллюстрирована ^1H ЯМР спектроскопия и кривые SEC для валидации измерения SEC, мас. %. Продемонстрирована ^1H ЯМР спектроскопия синтезированных сополимеров с MORPH в качестве носителя и PHE в качестве допанта. Комбинация MORPH-PHE_{6,7%} получала недостаточное добавленное количество MORPH из-за высокой вязкости мономера, что приводило к более высокому, чем ожидалось, содержанию PHE в конечном сополимере. Экспериментальная загрузка была подтверждена кривыми SEC, представленными на вставке, где было определено, что MORPH-PHE_{6,7%} имеет более низкую молекулярную массу, чем MORPH-PHE_{3,3%} и MORPH-PHE_{10%}. Это уменьшение молекулярной массы используется для определения экспериментальных загрузок MORPH и PHE в конечных сополимерах. DRI относится к дифференциальному показателю преломления, измеренному с помощью SEC.

На Фиг. 4 проиллюстрированы SEC кривые полимеров из синтеза первоначальной библиотеки сополимеров. Слева направо мономеры-носители: акриламид (AM), *N,N*-диметилакриламид (DMA), *N*-гидроксиэтилакриламид (HEAM), 4-акрилоилморфолин (MORPH) и *N*-(3-метоксипропил)акриламид (MPAM). Сополимеры на основе AM измеряли на водной SEC, тогда как другие измеряли на DMF SEC. Верхний ряд изображает наложения всех синтезированных сополимеров. Каждый последующий ряд демонстрирует загрузку функционального допанта для сополимеров. Три сополимеризации для каждой пары «носитель-допант» представляют собой низкую загрузку, среднюю загрузку и высокую загрузку. Функциональные допанты (аббревиатура: низкая, средняя и высокая загрузка) являются следующими: *N*-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид (TRI; 5, 10, 15 мас. %), раствор (3-акриламидопропил)триметиламмония хлорида (ТМА; 3,3, 6,7, 10 мас. %), 2-акриламидо-2-метилпропансульфо́кислота (AMP; 3,3, 6,7, 10 мас. %), *N*-изопропилакриламид (NIP; 6,7,

13,3, 20 мас. %), *N-трет*-бутилакриламид (ТВА; 3,3, 6,7, 10 мас. %), и *N*-фенилакриламид (PHE; 3,3, 6,7, 10 мас. %).

ФИГ. 5A-5G иллюстрируют скрининг стабильности рекомбинантного инсулина с библиотекой полимерных вспомогательных веществ. Время до агрегации рекомбинантного инсулина (100 ЕД/мл), приготовленного с гомополимерами-носителями (0,1 мас. %) или контрольным Плуронином L-61 (Pluronic L-61) (0,1 мас. %), состав которого аналогичен Полоксамеру 171 (Poloxamer 171), используемому в коммерческих инсулиновых препаратах, продемонстрировано на Фиг. 5A. Также продемонстрировано время до агрегации рекомбинантного инсулина (100 ЕД/мл), приготовленного с полимерами носитель-допант (0,1 мас. %), с носителями DMA (Фиг. 5B), AM (Фиг. 5C), HEAM (Фиг. 5D), MPAM (Фиг. 5E) и MORPH (Фиг. 5F). Допанты и целевые массовые проценты указаны на оси x. Фиг. 5G представляет собой тепловую карту наиболее эффективных вспомогательных веществ для каждой комбинации носитель-допант (наибольшее время до агрегации). Черные квадраты с точками обозначают верхние комбинации носитель-допант, которые были выбраны для дальнейшего скрининга. Эти анализы оценивают агрегацию белков в составе с течением времени при стрессовом выдерживании (непрерывное перемешивание при 37 °C путем отслеживания изменений абсорбции при 540 нм. Приведенные данные представляют собой среднее время до агрегации ($n = 3$; среднее значение $\pm$ s.d.), где агрегация определяется как увеличение абсорбции на 10%.

На Фиг. 6 продемонстрированы водные профили SEC элюции для коммерческих составов HUMALOG® и UFAL. Эти кривые иллюстрируют преимущественно мономерное состояние ассоциации инсулина UFAL с более длительным временем элюирования, коррелирующим с более низкой эффективной молекулярной массой.

На Фиг. 7A-7D продемонстрированы SEC кривые сополимеров со второго скрининга с целью DP 50. На Фиг. 7A продемонстрирован MPAM, сополимеризованный с PHE. На Фиг. 7B продемонстрирован MPAM, сополимеризованный с NIP. На Фиг. 7C продемонстрирован MORPH, сополимеризованный с PHE. На Фиг. 7D продемонстрирован MORPH, сополимеризованный с NIP.

На Фиг. 8A-8D проиллюстрирован стабилизированный состав инсулина лизпро со сверхбыстрой абсорбцией (UFAL) с применением сополимерных вспомогательных веществ на основе полиакриламида. На Фиг. 8A продемонстрированы состояния ассоциации инсулина в HUMALOG® (вверху) и UFAL (внизу), определенные с помощью MALS. Фиг. 8B представляет собой скрининг стабильности UFAL с библиотекой полимерных вспомогательных веществ. Продemonстрировано время до агрегации UFAL

(100 ЕД/мл), приготовленного с полимерными вспомогательными веществами из второго скрининга (0,01 мас. %). Сополимерные вспомогательные вещества на основе полиакриламида, состоящие из полимеров-носителей MPAM и MORPH с различным массовым процентным содержанием допантов PHE (вверху) или NIP (внизу). На Фиг. 8C проиллюстрированы репрезентативные кривые абсорбции, демонстрирующие стабильность UFAL при составлении с MORPH-NIP_{23%} по сравнению с контролями UFAL без полимерного вспомогательного вещества и HUMALOG®. Эти анализы оценивают агрегацию белков в составе с течением времени при стрессовом выдерживании (т.е. непрерывное перемешивание при 37 °C) путем отслеживания изменений коэффициента пропускания при 540 нм. Приведенные данные представляют собой среднее время до агрегации (n = 3; среднее значение $\pm$ s.d.), где агрегация определяется как увеличение абсорбции на 10%. На Фиг. 8D продемонстрирована диффузионно-упорядоченная ЯМР-спектроскопия (DOSY) UFAL с полимерным вспомогательным веществом MORPH-NIP_{23%}. DOSY дает представление о состоянии ассоциации инсулина и скорости диффузии инсулина и полимера в составе. Характеристики диффузии демонстрируют, что лизпро и MORPH-NIP_{23%} диффундируют с разной скоростью и не связаны, что позволяет предположить, что нарушение межфазных взаимодействий является основным фактором наблюдаемых стабилизирующих эффектов.

Фиг. 9А-9В иллюстрируют биологическую активность составов HUMALOG®, UFAL, выдержанного HUMALOG® (встряхивание в течение 12 часов при 37 °C) и выдержанного UFAL (встряхивание в течение 12 часов при 37 °C) *in vitro* и *in vivo*. (ФИГ. 9А) Активность *in vitro* тестировали путем анализа фосфорилирования Ser473 на АКТ. Представленные данные являются средним значением $\pm$ s.e.m. для n=3 экспериментальных репликатов. Результаты наносили на график как отношение [pАКТ]/[АКТ] для каждого образца (n = 3 клеточных репликата), а регрессию EC₅₀ [log(агонист) относительно ответа (три параметра)] получали с помощью GraphPad Prism 8. (ФИГ. 9В) Биоактивность *in vivo* оценивали на самцах крыс Sprague Dawley с диабетом. Крысам, голодавшим от 4 до 6 часов, делали подкожную инъекцию инсулина (1,5 ЕД/кг) и измеряли уровень глюкозы с помощью портативного глюкометра каждые 30 минут в течение 4 часов. 16 крыс случайным образом разделяли на две группы: (i) HUMALOG® (n=8) и (ii) UFAL (n=8). В каждой группе каждая крыса получала как свежие, так и выдержанные составы в отдельные дни. Порядок, в котором давали составы, был случайным. Предполагается, что потеря активности выдержанного HUMALOG®, наблюдаемая при анализе уровня глюкозы в крови, но не при анализе АКТ, является результатом обратимой агрегации инсулина. Когда этот выдержанный состав

подвергается значительному разведению для анализа АКТ *in vitro*, эти агрегаты диссоциируют в активный инсулин, тогда как минимального разведения, необходимого для точного дозирования у крыс, недостаточно для того, чтобы произошла эта диссоциация, и агрегаты инсулина приводят к наблюдаемой потере активности. Представленные данные являются средним значением $\pm$ s.e.m.

Фиг. 10А-10М иллюстрируют фармакокинетику и фармакодинамику мономерного инсулина у свиней с диабетом. Самкам свиней с диабетом подкожно вводили препараты, включающие (i) коммерчески доступный HUMALOG® или (ii) UFAL, составленный с полимером. Свиньям вводили инсулин в соответствии с их индивидуальной чувствительностью к инсулину, чтобы снизить уровень глюкозы на около 200 мг/дл. Фиг. 10А: Измерение уровня глюкозы в крови у свиней после подкожного введения инсулина. Фиг. 10В: Фармакокинетика инсулина лизпро в мЕд/л после подкожного введения. Фиг. 10С: Общая экспозиция, представленная площадью под кривой за 210 минут. Фиг. 10D-10I: Процент экспозиции в различные моменты времени (AUC_t/AUC_{210}). Фиг. 10J: Фармакокинетику для каждой свиньи индивидуально нормализовали до пиковых концентраций, а нормализованные значения усредняли по концентрации лизпро для каждой группы лечения. Фиг. 10К: Время достижения 50% пиковой концентрации лизпро (начало). Фиг. 10L: Время достижения пиковой концентрации лизпро. Фиг. 10М: Время деплетирования лизпро до 50% пиковой концентрации. Фиг. 10А, 10В и 10J: Планки погрешностей указывают среднее значение $\pm$ s.d при $n=5$ для всех групп. Фиг. 10D-10I: Планки погрешностей указывают среднее значение $\pm$ s.e.m. при $n=5$ для всех групп. Для учета множественных сравнений моментов времени индивидуальной экспозиции и значимости применяли апостериорный критерий Бонферрони, а также была скорректирована альфа (альфа = 0,008). (Фиг. 10С, 10К-10М). Планки погрешностей указывают среднее значение $\pm$ s.e.m. при $n=5$ для всех групп (альфа = 0,05). Статистическую значимость определяли с помощью смешанной модели повторных измерений с ограниченной максимальной вероятностью (REML).

Фиг. 11А-11В иллюстрируют уровень глюкозы крови при введении мономерного инсулина у свиней с диабетом. Самкам свиней с диабетом подкожно вводили препараты, включающие (i) коммерчески доступный HUMALOG® или (ii) UFAL, составленный с полимером. Фиг. 11А: Схема места подкожной инъекции за передней лапой свиньи. Свиньи имеют плотную кожу и подкожную клетчатку, очень похожие на человеческие, что делает их наиболее подходящей доклинической моделью для изучения фармакокинетики биофармацевтических препаратов после подкожного введения. Свиньи достаточно велики для точного введения инсулина с применением стандартных

концентраций (100 ЕД/мл), с гарантией того, что наблюдаемая фармакокинетика не будет искажена эффектами разбавления. Фиг. 11В: Свиньям вводили инсулин в соответствии с их индивидуальной чувствительностью к инсулину, чтобы снизить концентрацию глюкозы в крови на около 200 мг/дл. Измерение уровня глюкозы в крови у свиней после подкожного введения инсулина. Планки погрешностей указывают среднее значение $\pm$ s.d при $n=5$ для всех групп.

Фиг. 12А-12Е иллюстрируют фармакокинетическое моделирование UFAL у людей. Фиг. 12А: Модель концентрации инсулина в плазме после инъекции у пациентов-людей была адаптирована из Wong et al. (*J. Diabetes Sci. Technol.* (2008) 2:658–671). Аналоги инсулина быстрого действия вводятся в подкожное пространство (I_{inj}), затем диссоциируют и диффундируют в интерстиций (k_1), где затем всасываются в плазму (k_2) и в конечном итоге выводятся (k_3). Фиг. 12В: Нормализованные фармакокинетические данные для HUMALOG® и UFAL у свиней с диабетом, смоделированные с помощью метода наименьших квадратов для определения k_1 , k_2 и k_3 у свиней (Фиг. 14 и Таблица 6). Фиг. 12С: Клинические фармакокинетические данные HUMALOG® для человека в сравнении с смоделированной кинетикой аналога инсулина быстрого действия (RAI) (с использованием известных параметров человека, Таблица 6) и прогнозируемой кинетикой UFAL у человека. Фармакокинетика UFAL для человека была спрогнозирована путем подбора фармакокинетических данных свиней для HUMALOG® и UFAL. Затем была построена фармакокинетика UFAL человека с использованием расчетного k_1 с известными параметрами k_2 и k_3 . Фиг. 12D: Прогнозирование моделью кинетики RAI и UFAL по сравнению с кинетикой HUMALOG® в опубликованных клинических исследованиях, время до 50% пикового подъема (слева), время до пика (в центре) и продолжительность времени действия до 50% пикового спада (справа). Фиг. 12Е: Сравнение прогнозируемого моделью времени достижения пика UFAL у людей по сравнению с клиническими данными коммерческих препаратов инсулина быстрого действия для людей (см., например: Heise et al., *Diabetes Obes. Metab.* (2017) 19:208–215; Andersen et al., *Diabetes Obes. Metab.* (2018) 20:2627–2632; Rave et al., *Diabetes Care* (2006) 29:1812–1817).

Фиг. 13 иллюстрирует AUMC/AUC для UFAL и HUMALOG® у свиней с диабетом. Самкам свиней с диабетом подкожно вводили препараты, включающие (i) коммерчески доступный HUMALOG® или (ii) UFAL, составленный с полимером. Свиньям вводили инсулин в соответствии с их индивидуальной чувствительностью к инсулину, чтобы снизить концентрацию глюкозы в крови на около 200 мг/дл. Для подкожного введения площадь под кривой момента (AUMC), деленная на площадь под кривой (AUC), равна среднему времени пребывания (MRT) + среднее время абсорбции (MAT). $AUMC/AUC =$

MRT + MAT. Планки погрешностей указывают среднее значение $\pm$ s.e.m. при $n=5$ для всех групп (альфа = 0,05). Статистическую значимость определяли с помощью смешанной модели повторных измерений с ограниченной максимальной вероятностью (REML).

Фиг. 14А-14С иллюстрируют фармакокинетические результаты подбора модели в сравнении с экспериментальными данными фармакокинетики для HUMALOG® и UFAL у свиней с диабетом. Фиг. 14А: Время до 50% пикового подъема. Фиг. 14В: Время до пика. Фиг. 14С: Время до 50% пикового спада. Звездочки обозначают прогнозируемые фармакокинетические моменты времени по модели. Точки данных такие же, как и на Фиг. 10К-10М.

Фиг. 15А-15F иллюстрируют кинетику и стабильность состава. Фиг. 15А: Существующая двойная гормональная замена инсулина и прамлинтида требует двух отдельных инъекций во время еды. Эта дополнительная инъекция не только обременительна, но и существует кинетическое несоответствие между инсулином и прамлинтидом при экзогенной доставке по сравнению с эндогенной совместной секрецией бета-клетками. Это происходит из-за смешанных состояний ассоциации инсулина, присутствующих в составах инсулина быстрого действия, где мономеры и димеры быстро всасываются, но медленная диссоциация гексамера инсулина вызывает увеличение продолжительности действия. Фиг. 15В: Совместный состав мономерного инсулина и прамлинтида для введения в одной инъекции уменьшит бремя болезни у пациента и будет иметь лучшее фармакокинетическое наложение, более точно имитирующее эндогенную секрецию здоровой поджелудочной железы. Фиг. 15С: Для стабилизации совместного состава инсулин-прамлинтид можно применять амфифильные акриламидные сополимерные вспомогательные вещества. Эти вспомогательные вещества преимущественно адсорбируются на границе раздела «воздух-вода», вытесняя инсулин и/или прамлинтид и предотвращая нуклеацию агрегационных явлений, которые инициируют формирование амилоидных фибрилл. Фиг. 15D: Компоненты совместного состава. Фиг. 15Е: Состояния ассоциации инсулина в HUMALOG® (вверху); адаптировано из 57, по сравнению с лизпро без цинка с феноксизтанолом (0,85 мас. %) и глицерином (2,6 мас. %) (внизу). Фиг. 15F: Стабильность состава в тесте на стрессовое выдерживание (непрерывное перемешивание, 37 °C) (i) HUMALOG®, (ii) HUMALOG® + прамлинтид (1:6 прамлинтид:лизпро), (iii) не содержащий цинка лизпро (100 ЕД/мл) лизпро, 0,85 мас. % феноксизтанола, 2,6 мас. % глицерина, 0,1 мг/мл $\text{MoNi}_{23\%}$), (iv) совместный состав (100 ед/мл лизпро, 1:6 прамлинтид:лизпро, 0,85 мас. % феноксизтанола, 2,6 мас. % глицерина, 0,1 мг/мл $\text{MoNi}_{23\%}$). Изменение коэффициента пропускания показано по сравнению с

исходным коэффициентом пропускания. Агрегация определяется как изменение коэффициента пропускания $>10\%$.

Фиг. 16 иллюстрирует профили SEC-MALS элюирования распределения состояний агрегации инсулина лизпро с усредненной по числу молекулярной массой и усредненной по весу молекулярной массой, используемые для расчета процента состояний ассоциации инсулина.

Фиг. 17 иллюстрирует исходные значения пропускания для HUMALOG[®] + прамлинтид и совместного состава (100 Ед/мл лизпро, 1:6 прамлинтид:лизпро, 0,85 мас. % феноксиэтанола, 2,6 мас. % глицерина, 0,1 мг/мл MoNi₂₃%). Исходные значения пропускания для (i) контрольной группы HUMALOG[®] + прамлинтид и (ii) совместного состава в анализе на стабильность (Фиг. 15F) показаны как изменение пропускания (среднее исходное значение пропускания HUMALOG[®]) - исходное значение пропускания состава. Снижение исходного значения пропускания, наблюдаемое для образцов HUMALOG[®] + прамлинтид перед проведением теста на стрессовое выдерживание, указывает на плохую растворимость при смешивании этих двух составов. Для сравнения, исходное пропускание совместного состава является оптически ясным для глаз и мало отличается от исходного пропускания HUMALOG[®].

Фиг. 18A-18D иллюстрируют фармакокинетику и фармакодинамику у крыс с диабетом. Самцы крыс с диабетом (n=11) получали натошак подкожно (i) HUMALOG[®], (ii) отдельные инъекции HUMALOG[®] и прамлинтида, или (iii) совместный состав инсулин-прамлинтид. За введением инсулина немедленно следовал пероральный прием раствора глюкозы (1 г/кг). Каждая крыса получала все виды лечения. Изменение уровня глюкозы в крови по сравнению с исходным уровнем после лечения показано на Фиг. 18A. Фиг. 18B-18C демонстрируют фармакокинетику инсулина лизпро (Фиг. 18B) или прамлинтид (Фиг. 18C).

Фиг. 19A-19M иллюстрируют начало и продолжительность действия у крыс с диабетом. Самцы крыс с диабетом (n=11) получали натошак подкожно (i) HUMALOG[®], (ii) отдельные инъекции HUMALOG[®] и прамлинтида, или (iii) совместный состав инсулин-прамлинтид. За введением инсулина немедленно следовал пероральный прием раствора глюкозы (1 г/кг). Каждая крыса получала все виды лечения. Фармакокинетику для каждой крысы индивидуально нормализовали до пиковых уровней в сыворотке крови, и нормализованные значения усредняли для инсулина лизпро (Фиг. 19A) или прамлинтида (Фиг. 19J). Начало экспозиции определяется как время до 50% пикового подъема для инсулина лизпро (Фиг. 19B) или прамлинтида (Фиг. 19K). Пик экспозиции для инсулина лизпро (Фиг. 19C) или прамлинтида (Фиг. 19L). Начало экспозиции определяется как

время до 50% пикового подъема для инсулина лизпро (Фиг. 19D) или прамлинтида (Фиг. 19M). Доля экспозиции лизпро как отношение AUC_t/AUC_{120} на Фиг. 19E, $t=6$; Фиг. 19F, $t=15$; Фиг. 19G, $t=30$; Фиг. 19H, $t=45$; Фиг. 19I, $t=60$. Статистическую значимость определяли с помощью смешанной модели повторных измерений с ограниченным максимальным правдоподобием. Для учета множественных сравнений применяли апостериорный критерий Тьюки HSD (Фиг. 19b-19I, 19K, 19M). Для учета множественных сравнений моментов времени индивидуальной экспозиции и значимости применяли апостериорный критерий Бонферрони, а также была скорректирована альфа ($\alpha = 0,01$) (Фиг. 19E-19I).

Фиг. 20A-20C иллюстрируют площадь под кривой и коэффициент экспозиции для лизпро. Общая экспозиция лизпро как площадь под фармакокинетической кривой (Фиг. 20A). Доля экспозиции лизпро как соотношение AUC_t/AUC_{120} на Фиг. 20B, $t=3$; Фиг. 20C, $t=9$. Статистическую значимость определяли с помощью смешанной модели повторных измерений с ограниченным максимальным правдоподобием. Для учета множественных сравнений применяли апостериорный критерий Тьюки HSD (Фиг. 20B-20C).

Фиг. 21A-21G иллюстрируют площадь под кривой и коэффициент экспозиции для прамлинтида. Общая экспозиция прамлинтида как площадь под фармакокинетической кривой (Фиг. 21A). Доля экспозиции прамлинтида как соотношение AUC_t/AUC_{120} на Фиг. 20B, $t=6$; Фиг. 20C, $t=9$; Фиг. 20D, $t=15$; Фиг. 20E, $t=30$; Фиг. 20F, $t=45$; Фиг. 20G, $t=60$. Статистическую значимость определяли с помощью смешанной модели повторных измерений с ограниченным максимальным правдоподобием.

Фиг. 22A-22C иллюстрируют фармакокинетическое перекрытие составов. Средние нормализованные концентрации в сыворотке (для каждой крысы, $n=11$ /группа) инсулина и прамлинтида при введении в виде двух отдельных инъекций и при совместном введении в виде совместного состава приведены на Фиг. 22A и 22B, соответственно. Перекрытие между двумя кривыми определяли как общее время, проведенное выше 0,5 для кривых инсулина и прамлинтида (ширина на половине высоты пика), показанное как отношение времени перекрытия к общей ширине обоих пиков ($\text{перекрытие} \div (\text{лизпро} + \text{прамлинтид} - \text{перекрытие})$) (Фиг. 22C). Статистическую значимость определяли с помощью смешанной модели повторных измерений с ограниченным максимальным правдоподобием.

Фиг. 23A-23C иллюстрируют опорожнение желудка у крыс с диабетом. Самцы крыс с диабетом получали натошак подкожно (i) HUMALOG[®], (ii) отдельные инъекции HUMALOG[®] и прамлинтида, или (iii) совместный состав инсулин-прамлинтид. Фиг. 23A демонстрирует эксперимент с опорожнением желудка, в котором сразу же после введения

инсулина (2 ЕД/кг) вводили через зонд суспензию ацетаминофена (100 мг/кг). Каждая крыса (n=11) получала все виды лечения. Концентрация ацетаминофена в сыворотке продемонстрирована на Фиг. 23В. Время до пиковой экспозиции концентрации ацетаминофена в сыворотке продемонстрировано на Фиг. 23С. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SE. Статистическую значимость определяли с помощью смешанной модели повторных измерений с ограниченным максимальным правдоподобием. Для учета множественных сравнений применяли апостериорный критерий Тьюки HSD.

Фиг. 24А-24D иллюстрируют моделирование времени приема пищи с глюкозой. Самцы крыс с диабетом получали натошак подкожно (i) HUMALOG[®], (ii) отдельные инъекции HUMALOG[®] и прамлинтида, или (iii) совместный состав инсулин-прамлинтид. Фиг. 24А демонстрирует пероральную провокацию глюкозой, при которой введение инсулина (0,75 ЕД/кг) сразу же сопровождалось пероральным введением через желудочный зонд раствора глюкозы (2 г/кг). Каждая крыса (n=10) получала все виды лечения. Изменение уровня глюкозы в крови после введения продемонстрировано на Фиг. 24В. Максимальное изменение уровня глюкозы выше исходного уровня продемонстрировано на Фиг. 24С. Максимальное изменение уровня глюкозы ниже исходного уровня продемонстрировано на Фиг. 24D. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SE. Статистическую значимость определяли с помощью смешанной модели повторных измерений с ограниченным максимальным правдоподобием. Для учета множественных сравнений применяли апостериорный критерий Тьюки HSD.

Фиг. 25А-25С иллюстрируют межвидовую фармакокинетику HUMALOG[®] и HUMULIN[®]. Нормализованная фармакокинетика коммерческого HUMALOG[®] и обычного человеческого инсулина (например, HUMULIN[®] R), вводимых крысам и людям, продемонстрирована на Фиг. 25А. Время до пиковой экспозиции для каждого состава продемонстрировано на Фиг. 25В, а продолжительность действия для каждого состава продемонстрирована на Фиг. 25С. Различия во времени начала и времени достижения пика у крыс между быстродействующими и обычными составами инсулина минимальны и их трудно обнаружить. Однако у людей эти небольшие различия превращаются в отчетливые различия в показателях времени начала и времени пика. Это позволяет предположить, что наблюдаемая тенденция к более быстрому действию инсулина в совместных составах по данной заявке по сравнению с препаратом HUMALOG[®] может привести к существенным различиям у людей. Продолжительность действия определяется на Фигуре как ширина пика на 25% высоты пика (время 25% спада – время 25% подъема). Данные препарата HUMALOG[®], касающиеся крыс, взяты из этого

исследования, а данные обычного человеческого инсулина, касающиеся крыс, адаптированы из предыдущей работы. Данные препарата HUMALOG[®], касающиеся человека, взяты из трех внешних исследований и адаптированы из презентации в предыдущей работе. Данные обычного человеческого инсулина взяты из трех внешних исследований (Pettis et al., *Diabetes Technol. Ther.* (2011) 13:443–450; Andersen et al., *Diabetes Obes. Metab.* (2018) 20:2627–2632; Plank et al., *Diabetes Care* (2002) 25:2053–2057; Linnebjerg et al., *Clin. Pharmacokinet.* (2020) 59:1589-1599).

Фиг. 26А-26С иллюстрируют межвидовую фармакокинетику HUMALOG[®] и составов мономерного лизпро. Фиг. 26А демонстрирует нормализованную фармакокинетику коммерческого препарата HUMALOG[®], введенного крысам, свиньям и людям (слева), время достижения пика (в центре) и продолжительность действия (справа). Фиг. 26В демонстрирует нормализованную фармакокинетику мономерного инсулина, введенного крысам, свиньям и людям (слева), время достижения пика (в центре) и продолжительность действия (справа). HUMALOG[®] демонстрирует увеличение времени до начала действия и увеличение продолжительности действия по мере перехода к видам с более сложной структурой подкожной клетчатки (крысы < свиньи < люди). Напротив, мономерный лизпро имеет очень сходное начало и продолжительность действия у крыс и свиней. Поскольку разница между крысами и свиньями для этого состава минимальна, вполне вероятно, что разница между свиньями и людьми будет небольшой. Кроме того, авторы наблюдали, что прамлинтид, который существует только в виде мономера, имеет очень схожую кинетику у свиней и людей. Фиг. 26С демонстрирует нормализованную фармакокинетику коммерческих составов для человека (слева), время до пиковой экспозиции для каждого состава (в центре) и продолжительность действия для каждого состава (справа). Даже со сдвигом в сторону более быстрого достижения пика при применении инсулинов быстрого действия нового поколения, таких как Fiasp и Lyumjev, не было аналогичного увеличения сокращения продолжительности действия. Продолжительность действия определяется на Фигуре как ширина пика на 25% высоты пика (время 25% спада – время 25% подъема). Данные, касающиеся крыс, взяты из исследования, описанного в Примере 3 (мономерный лизпро крысам доставляли как часть совместного состава). Данные, касающиеся свиней, были адаптированы из предыдущей работы. Данные HUMALOG[®], касающиеся человека, взяты из четырех внешних исследований (Pettis et al., *Diabetes Technol. Ther.* (2011) 13:443–450; Andersen et al., *Diabetes Obes. Metab.* (2018) 20:2627–2632; Plank et al., *Diabetes Care* (2002) 25:2053–2057; Linnebjerg et al., *Clin. Pharmacokinet.* (2020) 59:1589-1599). Прогнозированный мономерный лизпро у людей был адаптирован на основе фармакокинетического

моделирования предыдущей работы на свиньях. Для Фиг. 26С, данные адаптированы из клинических исследований на людях для (i) обычного человеческого инсулина (Rave et al., *Diabetes Care* (2006) 29:1812–1817; Lindholm et al., *Diabetes Care* (1999) 22:801–805; Heinemann et al., *Diabetic Medicine* (1996) 13:625–629), (ii) NOVOLOG® (Novo Nordisk) (Fath et al., *Pediatr. Diabetes* (2017) 18:903–910; Heise et al., *Clin. Pharmacokinet.* (2017) 56:551–559), (iii) Fiasp (Novo Nordisk) (Fath et al., *Pediatr. Diabetes* (2017) 18:903–910; Heise et al., *Clin. Pharmacokinet.* (2017) 56:551–559), (iv) HUMALOG® (Eli Lilly) (Pettis et al., *Diabetes Technol. Ther.* (2011) 13:443–450; Andersen et al., *Diabetes Obes. Metab.* (2018) 20:2627–2632; Plank et al., *Diabetes Care* (2002) 25:2053–2057; Linnebjerg et al., *Clin. Pharmacokinet.* (2020) 59:1589–1599), и (v) Lyumjev (Eli Lilly) (Linnebjerg et al., *Clin. Pharmacokinet.* (2020) 59:1589–1599; Shiramoto et al., *J. Diabetes Invest.* (2020) 11:672–680). Прогнозированный мономерный лизпро у людей был адаптирован на основе фармакокинетического моделирования предыдущей работы на свиньях (Mann et al., *Sci. Transl. Med.* (2020) 12:eaba6676).

Фиг. 27А-27С иллюстрируют фармакокинетику различных составов инсулина у человека и показывают нормализованную фармакокинетику прамлинтида, вводимого крысам, свиньям и людям (Фиг. 27А), время до пика (Фиг. 27В) и продолжительность действия (Фиг. 27С). Сохранение кинетики сверхбыстрой абсорбции от крыс к свиньям и схожая кинетика прамлинтида у свиней и людей подтверждает прогнозируемую моделью кинетику для мономерного лизпро у людей. Продолжительность действия определяется на Фигуре как ширина пика на 25% высоты пика (время 25% спада – время 25% подъема). Данные, касающиеся крыс, взяты из исследования, описанного в Примере 3. Данные, касающиеся свиней, адаптированы из предыдущей работы (Maikawa et al., *Nat. Biomed. Eng.* (2020) 4:507–517). Данные о прамлинтиде, касающиеся человека, адаптированы из двух внешних исследований (Kolterman et al., *Diabetologia* (1996) 39:492–499); Riddle et al., *Diabetes Obes. Metab.* (2015) 17:904–907).

Фиг. 28А-28D иллюстрируют схему холодовой цепи и механизма агрегации инсулина. Чтобы сохранить целостность, коммерческие составы инсулина в данное время должны транспортироваться и храниться в рефрижераторных контейнерах в течение нескольких недель для распространения по всему миру (Фиг. 28А). Фиг. 28В иллюстрирует механизм агрегации коммерческих составов инсулина. Гексамер инсулина находится в равновесии с мономерами в составе. Эти мономеры взаимодействуют на границе раздела, где экспозиция гидрофобных доменов во время взаимодействия «инсулин-инсулин» зарождает образование амилоидных волокон. Фиг. 28С демонстрирует химическую структуру примера сополимерного вспомогательного

вещества на основе полиакриламида, поли(акрилоилморфолин_{77%}-co-N-изопропилакриламид_{23%}) (MoNi_{23%}). Сополимерные вспомогательные вещества на основе полиакриламида представляют собой амфифильные сополимеры, которые адсорбируются на границе раздела, уменьшая взаимодействия «инсулин-инсулин» и задерживая образование инсулинового амилоидоза (Фиг. 28D).

Фиг. 29А-29С иллюстрируют экспериментальное понимание механизма стабилизации сополимерного вспомогательного вещества на основе полиакриламида. Фиг. 29А представляет собой иллюстрацию предлагаемого механизма стабилизации. В коммерческом HUMULIN® мономеры на границе раздела имеют ассоциативные взаимодействия (вверху). Взятый отдельно, MoNi_{23%} занимает границу раздела без наличия инсулина (посередине). В комбинации с составами HUMULIN®, MoNi_{23%} нарушает поверхностные взаимодействия «инсулин-инсулин», обеспечивая механизм ингибирования агрегации (внизу). Фиг. 29В демонстрирует измерения поверхностного натяжения HUMULIN®, MoNi_{23%} (0,01 мас. %), составленного с вспомогательными веществами состава, и HUMULIN®, составленного с MoNi_{23%} (0,01 мас. %) (n=2). Фиг. 29С демонстрирует измерения межфазной реологии препарата HUMULIN®. Измерения для HUMULIN®, составленного с MoNi_{23%} (0,01 мас. %), снизились ниже разрешения прибора, что указывает на отсутствие агрегации белка на границе раздела (n=3).

Фиг. 30 иллюстрирует поверхностное натяжение полимерных составов с концентрацией 1 мг/мл (0,1 мас. %). Продемонстрированы результаты измерений поверхностного натяжения HUMULIN® (95 U), MoNi_{23%} (0,1 мас. %) в смеси с глицерином (1,6 мас. %) и метакрезолом (0,25 мас. %) и HUMULIN® (95 U) в смеси с MoNi_{23%} (0,1 мас. %).

Фиг. 31А-31Н иллюстрируют, что состав с сополимерами на основе полиакриламида стабилизирует инсулин. Фиг. 31А: 1 мл коммерческого HUMULIN® или HUMULIN® с добавлением сополимерных вспомогательных веществ на основе полиакриламида (i) MoPhe_{6%}, (ii) MpPhe_{8%}, (iii) MoNi_{23%} аликвотировали в стеклянные флаконы объемом 2 мл и выдерживали при 37 °С с постоянным перемешиванием (150 об/мин) в течение 0, 2, 4 и 6 месяцев. Для контроля HUMULIN® добавляли дополнительные моменты времени: 2 недели и 1 месяц. Все составы имели концентрацию 95 ЕД/мл (разбавленные таким образом, чтобы сополимеры можно было добавлять к коммерческому HUMULIN®). Фиг. 31В демонстрирует анализ показателя пропускания, используемый для оценки агрегации белков в составе с течением времени путем мониторинга изменений показателя пропускания при 540 нм (n=1 на момент времени состава). Фиг. 31С демонстрирует активность in vitro путем анализа фосфорилирования

Ser473 на АКТ после стимуляции HUMULIN[®] или MoNi₂₃% в моменты времени: 0 и 6 месяцев. Концентрации инсулина показаны как Log (нг/мл). Фиг. 31D демонстрирует значения Log(EC₅₀) для каждого состава. Статистическую значимость оценивали с помощью F-критерия дополнительной суммы квадратов, чтобы определить, различается ли Log(EC₅₀) между наборами данных. Наборы данных сравнивали попарно, и для корректировки множественных сравнений применяли апостериорный критерий Бонферрони (альфа = 0,008). Фиг. 31E-31H демонстрируют спектры циркулярного дихроизма в диапазоне 200-260 нм для каждого состава (разбавленного до 0,2 мг/мл в PBS) в каждый момент времени. Для Фиг. 31C продемонстрированные результаты представляют собой среднее значение ± s.e., нанесенное на график как отношение [pАКТ]/[АКТ] для каждого образца (n = 3 клеточных репликата), а регрессию EC₅₀ (log(агонист) относительно ответа (три параметра)) строили с помощью GraphPad Prism 8. Для Фиг. 31D статистическую значимость оценивали с помощью F-критерия дополнительной суммы квадратов, чтобы определить, различается ли Log(EC₅₀) между наборами данных. Наборы данных сравнивали попарно, и для корректировки множественных сравнений применяли апостериорный критерий Бонферрони (альфа = 0,008).

Фиг. 32A-32B иллюстрируют анализы пропускания для составов 5 мг/мл и 1 мг/мл. 1 мл HUMULIN[®] с добавлением сополимерных вспомогательных веществ на основе полиакриламида(i) MoPhe₆%, (ii) MpPhe₈%, (iii) MoNi₂₃% аликвотировали в стеклянные флаконы объемом 2 мл и выдерживали при 37 °C с постоянным перемешиванием (150 об/мин) в течение 0, 2, 4 и 6 месяцев. Фиг. 32A демонстрирует 5 мг/мл полимерного вспомогательного вещества в составе (0,5 мас. %), а Фиг. 32B демонстрирует 1 мг/мл полимерного вспомогательного вещества в составе (0,1 мас. %).

Фиг. 33A-33F иллюстрируют активность инсулина после выдерживания у крыс с диабетом. Самцам крыс с диабетом натошак подкожно вводили (1,5 ЕД/кг) каждый из составов инсулина: HUMULIN[®] (Фиг. 33A), HUMULIN[®] с MoPhe₆% (Фиг. 33B), HUMULIN[®] с MpPhe₈% (Фиг. 33C) или HUMULIN[®] с MoNi₂₃% (Фиг. 33D) в каждом моменте времени выдерживания (0, 2, 4, 6 месяцев). Фиг. 33E представляет собой сравнение каждого состава при t=0 месяцев. В этих анализах 32 крысы были случайным образом распределены в одну из четырех групп составов (n=8), и каждая крыса получала одну дозу состава в каждый момент времени выдерживания в случайном порядке. Уровни глюкозы в крови измеряли каждые 30 минут с помощью портативного глюкометра, и наносили на график изменение уровня глюкозы в крови по сравнению с исходными измерениями уровня глюкозы. Максимальное отличие уровня глюкозы от исходного

уровня (Δ глюкозы) также наносили на график для каждого состава в качестве меры активности состава. Фиг. 33F демонстрирует фармакокинетику HUMULIN[®] и HUMULIN[®] с MoNi₂₃% в моменты времени $t=0$ и $t=6$ месяцев. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ s.e. Статистическую значимость между максимальной Δ глюкозы оценивали с помощью смешанной модели повторных измерений REML с крысой в качестве случайного эффекта и временем выдерживания состава в качестве внутрисубъектного фиксированного эффекта. Апостериорный критерий Тьюки HSD применяли для составов HUMULIN[®] с целью определения статистической значимости между моментами времени выдерживания.

Фиг. 34A-34B иллюстрируют кривую уровня глюкозы в крови для HUMULIN[®], включая моменты времени $t=0,5$ и $t=1$ месяц. Самцам крыс с диабетом ($n=8$) натошак подкожно вводили (1,5 ЕД/кг) HUMULIN[®]. Восемь крыс были случайным образом распределены в группу HUMULIN[®]. Каждая крыса получала одну дозу состава в каждый момент времени выдерживания в случайном порядке. Уровни глюкозы в крови измеряли каждые 30 минут с помощью портативного глюкометра, и наносили на график изменение уровня глюкозы в крови по сравнению с исходными измерениями уровня глюкозы. Статистическую значимость между максимальной Δ глюкозы оценивали с помощью смешанной модели повторных измерений REML с крысой в качестве случайного эффекта и временем выдерживания состава в качестве внутрисубъектного фиксированного эффекта. Апостериорный критерий Тьюки HSD применяли для составов с целью определения статистической значимости между моментами времени выдерживания. Группы, не соединенные одной буквой, существенно различаются.

Фиг. 35 иллюстрирует площадь под кривой фармакокинетики. Площадь под кривой была рассчитана для фармакокинетических кривых HUMULIN[®], выдержанного HUMULIN[®] ($t=6$), HUMULIN[®] + MoNi₂₃% и выдержанного MoNi₂₃% ($t=6$). Между свежими составами HUMULIN[®] и составами, стабилизированными полимером, каких-либо отличий не наблюдалось. Выдержанный HUMULIN[®] показал меньшую площадь под кривой по сравнению с HUMULIN[®]. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ s.e. Статистическую значимость между AUC оценивали с помощью смешанной модели повторных измерений REML с крысой в качестве случайного эффекта и временем выдерживания состава в качестве внутрисубъектного фиксированного эффекта. Апостериорный критерий Тьюки HSD применяли для составов с целью определения статистической значимости между моментами времени выдерживания.

Фиг. 36A-36E иллюстрируют стрессовое выдерживание в коммерческой упаковке. Фиг. 36A: HUMULIN[®] часто продается в стандартных стеклянных флаконах объемом 10

мл и упакован в картонные коробки. Была протестирована стабилизирующая способность сополимеров на основе полиакриламида в коммерческих упаковках в стрессовых условиях. Флаконы U100 HUMULIN[®] объемом 10 мл разбавляли до 95 ЕД/мл добавлением 50 мкл исходного раствора MoNi₂₃% (до конечной концентрации сополимера 0,01 мас. %) или воды (контроль). Разбавление было необходимо для добавления сополимера в состав. Эти флаконы помещали в их оригинальные коробки, прикрепляли липкой лентой к пластине шейкера (150 об/мин) и помещали в инкубатор при 37 °C (n=1 на состав) или 50 °C (n=1 на состав). Образцы осматривали и визуализировали ежедневно. Фиг. 36B-36C представляют собой анализы пропускания для HUMULIN[®] или HUMULIN[®], содержащего MoNi₂₃%, после выдерживания при 37 °C (Фиг. 36B) и 50 °C (Фиг. 36C). Для каждой кривой пропускания тестировали отдельные образцы (n=1). Продемонстрированы кривые уровня глюкозы в крови (Фиг. 36D) и максимальное изменение уровня глюкозы в крови (Δ глюкозы) у крыс с диабетом натошак для образцов, выдержанных при 50 °C (Фиг. 36E). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ s.e. Статистическую значимость между максимальной Δ глюкозы оценивали с помощью смешанной модели повторных измерений REML с крысой в качестве случайного эффекта и временем выдерживания состава в качестве внутрисубъектного фиксированного эффекта. Апостериорный критерий Тьюки HSD применяли с целью определения статистической значимости между моментами времени выдерживания и группами.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ДАННОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе описываются синтез и характеристики библиотеки сополимеров, содержащих различные водорастворимые акриламидные мономеры и функциональные мономеры-допанты в различных массовых соотношениях, молекулярных массах и степени полимеризации. Сополимеры по данному изобретению эффективны для снижения или предотвращения агрегации биологических молекул (например, белков и пептидов) или носителей на основе липидов в водных составах на гидрофобных поверхностях, особенно молекул, которые подвержены агрегации в водной среде. Белки и другие биологические молекулы часто применяются при лечении самых разных заболеваний и нарушений; однако поддержание стабильности таких составов и предотвращение агрегации молекул является ключевой проблемой, с которой сталкивается биофармацевтическая промышленность. Белки, другие биологические молекулы и носители на основе липидов, включая, помимо прочего, липосомы, мицеллы, полимеросомы и липидные наночастицы, могут агрегировать из-за множества факторов,

включая термический стресс, химическую деградацию или воздействие на поверхности и границы раздела. Нековалентная физическая агрегация опосредована такими силами, как гидрофобное взаимодействие, взаимодействие Ван-дер-Ваальса, водородная связь и электростатические силы. Адсорбция таких молекул на различных поверхностях, особенно на границах раздела «воздух-вода», играет ключевую роль в индукции агрегации. Эти агрегаты могут запускать иммуногенные реакции в организме и приводить к выработке антитерапевтических антител.

Было обнаружено, что сополимеры на основе полиакриламида по данному изобретению уменьшают или предотвращают агрегацию биологических молекул и носителей на основе липидов в водных составах, что приводит к повышенной стабильности. Соплимеры на основе полиакриламида можно применять с любой молекулой, которая подвержена агрегации в водной среде, включая, помимо прочего, белки, такие как антитела и их фрагменты, цитокины, хемокины, гормоны, вакцины, антигены, раковые антигены, адъюванты и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой инсулин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой моноклональное антитело. Моноклональные антитела (mAb) представляют собой терапевтические белки, применяемые при лечении многих заболеваний, но имеют тенденцию к агрегации, что делает их применение серьезной проблемой при разработке составов. mAb спонтанно адсорбируются на границах раздела «воздух-раствор» и испытывают межфазные напряжения, что является одной из основных причин агрегации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой гормон. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой вакцину. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологическая молекула представляет собой нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологическая молекула представляет собой нуклеиновую кислоту, такую как мРНК, ДНК, siРНК и miРНК.

Сополимеры на основе полиакриламида также можно применять с носителями на основе липидов, которые подвержены агрегации в водной среде, включая, помимо прочего, липосомы, липидные наночастицы, полимеросомы и мицеллы, для предотвращения или уменьшения агрегации.

Сополимеры на основе полиакриламида по данному изобретению предотвращают агрегацию белков, других биологических молекул и носителей на основе липидов, таких как липосомы, липидные наночастицы, полимеросомы и мицеллы, путем создания инертного барьера на гидрофобной поверхности раздела водного состава для

предотвращения взаимодействия между молекулами, такого как взаимодействие «белок-белок». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гидрофобная граница раздела представляет собой границу раздела «воздух-вода». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гидрофобная граница раздела представляет собой границу раздела «корпус-вода», помимо прочего, границу раздела «стекло-вода», границу раздела «резина-вода», границу раздела «пластик-вода» или границу раздела «металл-вода». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гидрофобная граница раздела представляет собой границу раздела «масло-вода».

Как описано в данном документе, были идентифицированы сополимеры, которые могут действовать как стабилизирующие агенты для составов, содержащих биологические молекулы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный состав представляет собой белковый состав. Соплимеры на основе полиакриламида также могут действовать как стабилизирующие агенты для составов, содержащих носители на основе липидов, которые подвержены агрегации в водной среде, включая, помимо прочего, липосомы, липидные наночастицы, полимеросомы и мицеллы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры идентифицировали с помощью высокопроизводительного скрининга большой библиотеки комбинаторных сополимерных вспомогательных веществ на основе акриламида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эти сополимеры повышают стабильность состава без какого-либо модифицирующего воздействия на молекулы в составе. Например, сополимеры могут повышать стабильность белковой композиции без каких-либо эффектов, модифицирующих белок. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры, содержащие водорастворимый мономер-«носитель» и функциональный мономер-«допант», действуют как стабилизирующие вспомогательные вещества для уменьшения взаимодействия биологической молекулы с границей раздела, такой как граница раздела «воздух-жидкость». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологическая молекула представляет собой белок. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры, содержащие водорастворимый мономер-«носитель» и функциональный мономер-«допант», действуют как стабилизирующие вспомогательные вещества для уменьшения взаимодействия носителя на липидной основе с границей раздела, такой как граница раздела «воздух-жидкость».

Таким образом, в данном изобретении предлагается способ уменьшения агрегации биологической молекулы или носителя на основе липидов, включающий сополимерное вспомогательное вещество на основе полиакриламида, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологическая молекула

представляет собой белок. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок выбирают из антител и их фрагментов, цитокинов, хемокинов, гормонов, вакцинных антигенов, раковых антигенов, адъювантов и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологическая молекула представляет собой нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения носитель на липидной основе представляет собой липосому, мицеллу, полимеросому или липидную наночастицу. Сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению содержит водорастворимый мономер-носитель, содержащий реакционноспособный акриламидный фрагмент, и функциональный мономер-допант, содержащий реакционноспособный акриламидный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер содержит носители MPAM или MORPH с допантами NIP или PHE.

Также предлагаются способы повышения стабильности состава, содержащего биологическую молекулу или носитель на основе липидов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются способы повышения термостабильности состава, содержащего биологическую молекулу или носитель на основе липидов. В других вариантах осуществления данного изобретения предлагаются способы снижения скорости агрегации биологической молекулы или носителя на основе липидов в водной композиции. Указанные способы включают добавление в состав сополимера по данному изобретению.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологическая молекула представляет собой белок. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой инсулин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения проблемы со сниженной активностью инсулина или увеличенным временем циркуляции в кровотоке, обычно ассоциированные с ковалентной модификацией инсулина (например, ПЕГилированием), уменьшаются или устраняются.

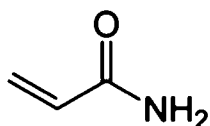
В некоторых вариантах осуществления данного изобретения также предлагаются способы лечения повышенного уровня глюкозы у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение указанному субъекту композиции, содержащей сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению и инсулин. Также предлагаются способы контроля уровня глюкозы в крови у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение указанному субъекту композиции, содержащей сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению и инсулин.

Определения

Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. В этом документе описываются способы и материалы для применения в данной заявке; в некоторых аспектах данного изобретения также применяются другие подходящие способы и материалы, известные в данной области техники. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не имеют ограничительного характера. Все публикации, заявки на патенты, патенты, последовательности, записи в базе данных и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены посредством ссылки. В случае конфликта данное описание, включая определения, является превалирующим. Когда в данном документе используются торговые наименования, то торговое наименование включает состав продукта, непатентованный лекарственный препарат и активный фармацевтический ингредиент (ингредиенты) продукта с торговым наименованием, если иное не указано в контексте.

Термин «полимер» относится к веществу или материалу, состоящему из повторяющихся мономерных субъединиц.

В контексте данного документа термин «акриламидный мономер» относится к разновидности мономера, которая обладает акриламидной функциональной группой.



Термин «акриламидный мономер» включает не только мономерный акриламид, но и производные мономерного акриламида. Примеры акриламидных мономеров включают, помимо прочего, акриламид (AM), N-(3-метоксипропоил)акриламид (MPAM), 4-акрилоилморфолин (MORPH), N,N-диметилакриламид (DMA), N-гидроксиэтилакриламид (HEAM), N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислоту (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмоний хлорид (TMA), N-изопропилакриламид (NIP), N-трет-бутилакриламид (TBA) и N-фенилакриламид (PHE).

Термин «сополимер на основе полиакриламида» относится к полимерам, которые образуются в результате полимеризации двух или большего количества видов мономеров, в которых по меньшей мере один из видов мономеров имеет акриламидную функциональную группу (акриламидный мономер), и мономеры имеют различную структуру. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида образуется в результате полимеризации двух структурно

различных акриламидных мономеров (двух структурно различных мономеров, каждый из которых содержит акриламидную функциональную группу). Полученный сополимер может быть чередующимся сополимером, в котором виды мономеров соединены чередующимся образом; статистический сополимер, в котором виды мономеров связаны друг с другом в полимерной цепи без определенного рисунка; блок-сополимер, в котором полимерные блоки одного вида мономера соединены с полимерными блоками, состоящими из другого вида мономера; и привитой сополимер, в котором основная полимерная цепь состоит из одного вида мономера, а полимерные блоки другого вида мономера присоединены к основной полимерной цепи в качестве боковых ответвлений. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры на основе полиакриламида по данному изобретению образуются в результате полимеризации водорастворимого мономера-носителя и функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры на основе полиакриламида по данному изобретению представляют собой статистические сополимеры.

Как определено в данном документе, термин «водорастворимый мономер-носитель» относится к разновидности акриламидного мономера, которая представляет собой водорастворимую часть сополимера на основе полиакриламида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель является преобладающим веществом в сополимере на основе полиакриламида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель придает сополимеру растворимость в воде. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель в сополимере на основе полиакриламида обеспечивает инертный барьер на границе раздела водного состава для предотвращения взаимодействий «белок-белок». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения граница раздела представляет собой границу раздела «воздух-вода». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения граница раздела представляет собой границу раздела «корпус-вода», помимо прочего, границу раздела «стекло-вода», границу раздела «резина-вода», границу раздела «пластик-вода» или границу раздела «металл-вода». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения граница раздела представляет собой границу раздела «масло-вода». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения граница раздела представляет собой границу раздела между жидкостью и трубкой. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения граница раздела представляет собой границу раздела между жидкостью и катетером. В некоторых вариантах осуществления данного

изобретения граница раздела «корпус-вода» находится в насосной системе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения граница раздела «корпус-вода» находится в системе с замкнутым контуром. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель является неионогенным. Примеры водорастворимых мономеров-носителей включают, помимо прочего, акриламид (AM), N-(3-метоксипропоил)акриламид (MPAM), 4-акрилоилморфолин (MORPH), N,N-диметилакриламид (DMA) и N-гидроксиэтилакриламид (HEAM).

В контексте данного документа термин «функциональный мономер-допант» относится к виду акриламидного мономера, который имеет физико-химические свойства (например, гидрофобность, заряд), отличные от свойств водорастворимого мономера-носителя. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант в сополимере на основе полиакриламида способствует ассоциации полимеров с границей раздела; такие границы раздела могут включать, помимо прочего, взаимодействия на границе раздела «полимер-воздух-вода», взаимодействия «полимер-белок», взаимодействия «полимер-пептид», взаимодействия «полимер-мицелла», взаимодействия «полимер-липосома» и взаимодействия «полимер-липидная наночастица». Функциональный мономер-допант может действовать как стабилизирующий фрагмент для облегчения взаимодействия с биомолекулами, например, белками, пептидами, антителами, конъюгатами «антитело-лекарственное средство», нуклеиновыми кислотами, липидными частицами и их комбинациями (например, для предотвращения агрегации биомолекул). Функциональные мономеры-допанты можно дополнительно разделить на мономеры с водородными связями, ионные, гидрофобные и ароматические мономеры в зависимости от их химического состава. Как правило, функциональные мономеры-допанты сополимеризуют при более низких массовых процентах по сравнению с водорастворимыми мономерами-носителями.

Термин «полимеризация» относится к процессу, в котором молекулы мономера подвергаются химической реакции с образованием полимерных цепей или трехмерных сетей. В данной области техники известны различные типы реакций полимеризации, например, аддитивная полимеризация (цепная реакция), конденсационная полимеризация, полимеризация с раскрытием цикла, свободнорадикальная полимеризация, контролируемая радикальная полимеризация, радикальная полимеризация с переносом атома (ATRP), полимеризация с живым радикалом с переносом одного электрона (SET-LRP), обратимая аддитивно-фрагментарная полимеризация с передачей цепи (RAFT), полимеризация, опосредованная нитроксидом (NMP), и эмульсионная полимеризация. В

некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению получают с помощью RAFT-полимеризации.

Термин «степень полимеризации» (DP) относится к числу мономерных звеньев в полимере. Этот показатель рассчитывается путем деления средней молекулярной массы образца полимера на молекулярную массу мономеров. Как определено в данном документе, средняя молекулярная масса полимера может быть представлена усредненной по числу молекулярной массой (M_n), усредненной по весу молекулярной массой (M_w), Z-средней молекулярной массой (M_z) или молекулярной массой в максимумах пиков кривой молекулярно-массового распределения (M_p). Среднюю молекулярную массу полимера можно определить с помощью различных методов аналитической характеристики, известных специалистам в данной области техники, например, гель-проникающей хроматографии (GPC), анализа статического светорассеяния (SLS), анализа многоуглового лазерного рассеяния света (MALLS), спектроскопии ядерного магнитного резонанса (NMR), характеристической вискозиметрии (IV), индекса текучести расплава (MFI) и масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией с использованием матрицы (MALDI-MS) и их комбинаций. Степень полимеризации также можно определить экспериментально с помощью подходящих аналитических способов, известных в данной области техники, таких как ядерно-магнитная спектроскопия (NMR), инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FT-IR) и Рамановская спектроскопия.

Термин «амфифильный» относится к химическим веществам, обладающим как гидрофильными (влаголюбивыми, полярными), так и липофильными (жиролубивыми, неполярными) свойствами. Примеры распространенных амфифильных соединений включают детергенты, мыла, поверхностно-активные вещества, липопротеины и фосфолипиды. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения амфифильное вещество представляет собой заряженную частицу. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения амфифильное вещество представляет собой нейтральную частицу.

В контексте данного документа термин «носитель на основе липидов» относится к структурам, имеющим защитный внешний слой липидов, которые можно применять в качестве носителей для доставки лекарственных средств. Например, носитель на основе липидов можно применять для инкапсулирования и транспортировки груза (например, терапевтического агента) к биологической мишени. Примеры носителей на основе липидов включают, помимо прочего, липосомы, мицеллы, полимеросомы и липидные наночастицы.

В контексте данного документа термин «биологическая молекула» относится к таким молекулам, как белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и липиды.

Термин «белок» определяется как класс больших молекул, включающих одну или большее количество длинных цепей аминокислот. Большое разнообразие белков можно рассматривать как принадлежащие к семейству белков на основании сходных структурных особенностей, определенных биологических функций и/или родства с конкретными микроорганизмами, в частности с микроорганизмами, вызывающими заболевания. Такие белки включают, например, антитела (иммуноглобулины), цитокины, хемокины, ферменты, гормоны, вакцинные антигены, раковые антигены, адъюванты, маркеры питательных веществ и тканеспецифические антигены.

В контексте данного документа термин «нуклеиновая кислота» включает дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), рибонуклеиновую кислоту (РНК), матричную РНК (мРНК), малую интерферирующую РНК (siРНК), короткую шпилечную РНК (shРНК) и микроРНК (miРНК).

Термин «антитело» относится к большим белкам Y-образной формы, вырабатываемым иммунной системой для выявления и нейтрализации инородных объектов, таких как патогенные бактерии и вирусы. Термин «антитело» включает моноклональные антитела (например, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), поликлональные антитела, поливалентные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические или триспецифические антитела, если они проявляют желаемую биологическую активность) и может также включать некоторые фрагменты антител. Антитело может быть человеческим, гуманизированным и/или с созревшей аффинностью. «Фрагменты антитела» включают только часть интактного антитела, при этом в некоторых вариантах осуществления данного изобретения часть сохраняет по меньшей мере одну, а обычно большую часть или все функции, обычно ассоциированные с этой частью, когда она присутствует в интактном антителе. В одном варианте осуществления данного изобретения фрагмент антитела содержит антигенсвязывающий сайт интактного антитела и, таким образом, сохраняет способность связывать антиген. В другом варианте осуществления данного изобретения фрагмент антитела, например, тот, который содержит Fc-область, сохраняет по меньшей мере одну из биологических функций, обычно связанных с Fc-областью, когда он присутствует в интактном антителе, например, связывание FcRn, модуляцию периода полужизни антитела, функцию ADCC и связывание комплемента. В одном варианте осуществления данного изобретения фрагмент антитела представляет собой моновалентное антитело, которое имеет период полужизни *in vivo*, по существу аналогичный таковому у

интактного антитела. Например, такой фрагмент антитела может содержать антигенсвязывающее плечо, связанное с последовательностью Fc, способной придавать фрагменту стабильность *in vivo*.

Термин «моноклональное антитело» в данном документе относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, то есть отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и направлены против одного антигена. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене.

Моноклональные антитела в контексте данного документа включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, если они проявляют желаемую биологическую активность.

Термин «инсулин» относится к гормону, вырабатываемому бета-клетками островков поджелудочной железы, который регулирует количество глюкозы в крови. Организмы многих эукариот, включая людей, приматов, свиней, коров, кошек, собак и грызунов, вырабатывают инсулин. Таким образом, в контексте данного документа термин «инсулин» включает инсулин, продуцируемый людьми, и его аналоги, а также инсулин и его аналоги, продуцируемые другими эукариотами, включая, помимо прочего, приматов, свиней, коров, кошек, собак и грызунов, а также включает рекомбинантный, очищенный или синтетический инсулин или аналоги инсулина, имеющие аналогичную функцию и структуру, если не указано иное. Белок инсулина человека состоит из 51 аминокислоты и имеет молекулярную массу приблизительно 5,8 килодальтон (кДа). Инсулин человека представляет собой гетеродимер А-цепи и В-цепи, соединенных дисульфидными связями.

Инсулин также включает мономерные и олигомерные формы, такие как димерные и гексамерные формы. Инсулин может существовать в виде мономера, поскольку он циркулирует в плазме, и он также связывается со своим рецептором, находясь в мономерной форме. Составы инсулина (или составы аналогов инсулина), содержащие

преобладающие белковые молекулы в форме мономеров и димеров, обычно имеют сильную тенденцию к агрегации и образованию неактивных фибрилл. Гексамеры инсулина слишком велики, чтобы всасываться, поэтому составы гексамерного инсулина должны разлагаться на димеры или момеры, прежде чем инсулин сможет всасываться и функционировать в организме. Активной формой инсулина в кровотоке является мономерная форма.

Инсулин может быть выделен из экстрактов островков поджелудочной железы животного, продуцирующего инсулин, или рекомбинантно экспрессирован в подходящей системе экспрессии, такой как *E. coli*, дрожжи, клетки насекомых и клетки млекопитающих (например, клетки яичника китайского хомяка (CHO)). В зависимости от специфических фармакокинетических и фармакодинамических (PK/PD) свойств (например, продолжительность действия, максимальная наблюдаемая концентрация (C_{max}), время до начала действия, площадь под кривой (AUC)), инсулин можно дополнительно охарактеризовать как инсулин быстрого действия, инсулин короткого действия, инсулин промежуточного действия, инсулин длительного действия и предварительно смешанный инсулин.

Термин «агрегация» относится к образованию аморфных частиц с более высокой молекулярной массой благодаря нековалентному присоединению («слипанию») частиц меньшего размера. Процесс агрегации может быть необратимым или обратимым. Многие биологические и синтетические молекулы могут подвергаться агрегации, включая белки, пептиды, липидные частицы, нуклеиновые кислоты, неорганические наночастицы и органические наночастицы (например, мицеллы, липидные наночастицы, липосомы, полимеросомы), которые могут дополнительно содержать инкапсулированные виды.

В случае агрегации белка образование белковых агрегатов может быть связано с присущей белку неупорядоченной природой или неправильной укладкой белковых молекул, что приводит к обнажению гидрофобных остатков и поверхностей, которые обычно скрыты внутри трехмерной структуры белка. Из-за гидрофобного эффекта обнаженные гидрофобные части неправильно свернутого белка имеют тенденцию взаимодействовать с другими молекулами неправильно свернутого белка, чтобы защитить обнаженные гидрофобные поверхности, что может привести к агрегации белка.

Некоторые биологические молекулы более «подвержены агрегации», чем другие. Например, аминокислотная последовательность и общая трехмерная структура белка имеют отношение к его предрасположенности к агрегации. Например, трансмембранные белки более склонны (или восприимчивы) к агрегации, чем немембранные белки, особенно при рекомбинантной экспрессии без применения стабилизирующего агента.

Белки, которые находятся в условиях, выходящих за пределы физиологических (37 ° C, ~ нейтральный pH, изотонический), также могут быть более восприимчивы к агрегации, чем в своей естественной среде. Стрессовые условия, такие как колебания температуры, свет, механические воздействия (например, встряхивание), поверхности, ультразвуковая вибрация, изменения pH и изменения ионной силы, могут повлиять на стабильность белка и вызвать агрегацию. Агрегация белков может привести к образованию субвидимых или видимых частиц (т. е. преципитации). Степень субвидимой агрегации белка можно измерить с помощью различных аналитических методов, известных в данной области техники, например, эксклюзионной хроматографии (SEC), гель-электрофореза, асимметричного фракционирования в поле (AF4), аналитического ультрацентрифугирования (AUC), масс-спектрометрии (MS), оптической микроскопии, флуоресцентной микроскопии, динамического рассеяния света (DLS), многоугольного лазерного рассеяния света (MALLS), визуализации потока, измерения мутности/нефелометрии и пропускания.

В контексте данного документа термин «уменьшение агрегации» биологической молекулы или носителя на основе липидов включает все формы уменьшения агрегации. Степень или уровень наблюдаемой агрегации (например, в композиции) может быть снижена по сравнению с композицией из той же биологической молекулы или носителя на основе липида в отсутствие сополимера на основе полиакриламида по данному изобретению. Таким образом, «уменьшенная агрегация» включает отсутствие наблюдаемой агрегации или пониженную степень агрегации (например, пониженные уровни агрегированного белка). Таким образом, количество агрегатов, присутствующих в композиции, может быть уменьшено по меньшей мере на около 10 моль%, около 20 моль%, около 30 моль%, около 40 моль%, около 50 моль%, около 60 моль%, около 70 моль%, около 80 моль%, около 90 моль% или около 100 моль% по сравнению с количеством агрегатов той же биологической молекулы или носителя на основе липидов в отсутствие сополимера на основе полиакриламида. Агрегация может быть измерена любым способом, известным в данной области техники, включая, помимо прочего, эксклюзионную хроматографию (SEC), гель-электрофорез, асимметричное фракционирование в поле (AF4), аналитическое ультрацентрифугирование (AUC), масс-спектрометрию (MS), оптическую микроскопию, флуоресцентную микроскопию, динамическое рассеяние света (DLS), многоугольное лазерное рассеяние света (MALLS), визуализацию потока, измерение мутности/нефелометрии и пропускания.

В контексте данного документа термин «повышенная стабильность», когда он относится к составу, содержащему биологическую молекулу или носитель на основе

липидов, означает измеримое снижение уровня агрегации в течение фиксированного периода времени при тестировании или фиксированных условиях хранения по сравнению с количеством агрегатов той же биологической молекулы или носителя на основе липидов в отсутствие сополимера на основе полиакриламида.

В контексте данного документа термины «агрегированный белок» или «белковые агрегаты» относятся к совокупности белков, которые неупорядочены или неправильно свернуты и сгруппированы вместе. Агрегаты могут быть растворимыми или нерастворимыми. Белковые агрегаты включают, помимо прочего, включенные тельца, растворимые и нерастворимые преципитаты, растворимые ненативные олигомеры, гели, фибриллы, пленки, филаменты, протофибриллы, амилоидные отложения, амилоидные фибриллы, бляшки и дисперсные ненативные внутриклеточные олигомеры. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белки в белковом агрегате до их агрегации являются растворимыми предшественниками. Агрегация белков может быть предотвращена в композициях, содержащих сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению. Агрегация белков также может быть снижена в композиции, содержащей сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению, по сравнению с композицией, содержащей тот же белок, но которая не содержит сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению. Таким образом, сополимер на основе полиакриламида может уменьшить или предотвратить агрегацию белка.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой инсулин или его аналог. В контексте данного документа термины «агрегированный инсулин» или «инсулиновые агрегаты» относятся к инсулину, который агрегировался с образованием высокомолекулярных полимеров или агрегатных частиц, или амилоидных фибрилл. Образование агрегатов инсулина может быть обусловлено, например, нагреванием или встряхиванием и частичным разворачиванием инсулина. Агрегацию инсулина можно предотвратить, т.е. предотвращается агрегация молекул инсулина и образование высокомолекулярных полимеров или амилоидных фибрилл в композициях, содержащих сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению. Агрегация также может быть уменьшена в композиции, содержащей инсулин или его аналог и сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению, по сравнению с композицией, содержащей инсулин или его аналог, но которая не содержит сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению. Таким образом, сополимер на основе полиакриламида может снижать или предотвращать агрегацию инсулина или его аналогов.

В контексте данного документа термин «продолжительность действия» определяется как период времени, в течение которого введенный инсулин снижает уровень глюкозы в крови, т.е. временной интервал, в течение которого введенный инсулин продолжает оставаться активным. Термин «максимальная наблюдаемая концентрация» ($C_{\max}$) относится к максимальной концентрации в сыворотке, которой активный агент достигает в определенном компартменте или тестируемой области организма после введения первой дозы активного агента и перед введением второй дозы. Термин «время начала действия» относится к количеству времени, которое требуется активному агенту для достижения минимальной эффективной концентрации после введения. Термин «площадь под кривой» (AUC) относится к определенному интегралу кривой, описывающей изменение концентрации активного агента в плазме крови в зависимости от времени, которую можно измерить аналитическими методами, такими как жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (LC-MS). AUC отражает экспозицию активного агента при введении и выражается в мг*ч/л. AUC активного агента зависит от скорости выведения активного агента из организма и введенной дозы.

Сополимеры на основе полиакриламида

В данном описании предлагаются сополимеры на основе полиакриламида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры на основе полиакриламида содержат водорастворимый мономер-носитель и функциональный мономер-допант. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида является амфифильным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит неионогенный водорастворимый акриламидный мономер и функциональный акриламидный мономер-допант, выбранный из группы, состоящей из гидрофобного функционального акриламидного мономера-допанта, ароматического функционального акриламидного мономера-допанта, образующего водородную связь, и ионного функционального акриламидного мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит неионогенный водорастворимый акриламидный мономер, а функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой гидрофобный функциональный акриламидный мономер-допант. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный сополимер содержит неионогенный водорастворимый акриламидный мономер, а функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой ароматический функциональный акриламидный мономер-допант. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный сополимер содержит

неионогенный водорастворимый акриламидный мономер, а функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой функциональный акриламидный мономер-допант, образующий водородную связь. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный сополимер содержит неионогенный водорастворимый акриламидный мономер, а функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой ионный функциональный акриламидный мономер-допант.

Сополимеры на основе полиакриламида по данному изобретению содержат водорастворимый мономер-носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель является неионогенным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из *N*-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), *N,N*-диметилакриламида (DMA), *N*-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM) или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из MPAM и MORPH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой *N*-(3-метоксипропоил)акриламид (MPAM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой 4-акрилоилморфолин (MORPH). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой *N,N*-диметилакриламид (DMA). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой *N*-гидроксиэтилакриламид (HEAM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой акриламид (AM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер содержит водорастворимый мономер-носитель, выбранный из группы, состоящей из *N*-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM) и 4-акрилоилморфолина (MORPH).

Сополимеры на основе полиакриламида по данному изобретению также содержат функциональный мономер-допант. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант выбирают из группы, состоящей из гидрофобного функционального акриламидного мономера-допанта, ароматического функционального акриламидного мономера-допанта, образующего водородную связь, и ионного функционального акриламидного мономера-допанта или их смесей.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой гидрофобный функциональный

акриламидный мономер-допант. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой *N*-изопропилакриламид (NIP) или *N*-трет-бутилакриламид (ТВА). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой *N*-изопропилакриламид (NIP). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой *N*-трет-бутилакриламид (ТВА). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой ароматический функциональный акриламидный мономер-допант. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ароматический функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой *N*-фенилакриламид (PHE).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой гидрофобный функциональный акриламидный мономер-допант, образующий водородную связь. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант, образующий водородную связь, представляет собой *N*-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид (TRI). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой ионный функциональный акриламидный мономер-допант. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновую кислоту (AMP) или (3-акриламидопропил)триметиламмоний хлорид (ТМА). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновую кислоту (AMP). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант представляет собой (3-акриламидопропил)триметиламмоний хлорид (ТМА).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант выбирают из группы, состоящей из *N*-[трис(гидроксиметил)метил]акриламида (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой кислоты (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмония хлорида (ТМА), *N*-изопропилакриламида (NIP), *N*-трет-бутилакриламида (ТВА) и *N*-фенилакриламида (PHE) или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой *N*-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид (TRI). В некоторых вариантах осуществления

данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновую кислоту (AMP). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой (3-акриламидопропил)триметиламмоний хлорид (TMA). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-изопропилакриламид (NIP). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-трет-бутилакриламид (TBA). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-фенилакриламид (PHE).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит водорастворимый мономер-носитель, выбранный из группы, состоящей из N-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), N,N-диметилакриламида (DMA), N-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM); и функциональный мономер-допант, выбранный из группы, состоящей из N-[трис(гидроксиметил)-метил]акриламида (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой кислоты (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмония хлорида (TMA), N-изопропилакриламида (NIP), N-трет-бутилакриламида (TBA) и N-фенилакриламида (PHE).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой N-(3-метоксипропоил)акриламид (MPAM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой N-(3-метоксипропоил)акриламид (MPAM), а функциональный мономер-допант выбирают из группы, состоящей из N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламида (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой кислоты (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмония хлорида (TMA), N-изопропилакриламида (NIP), N-трет-бутилакриламида (TBA) и N-фенилакриламида (PHE). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой MPAM, а функциональный мономер-допант представляет собой TRI. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой MPAM, а функциональный мономер-допант представляет собой AMP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой MPAM, а функциональный мономер-допант представляет собой TMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой MPAM, а функциональный мономер-допант представляет собой NIP. В некоторых

вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой МРАМ, а функциональный мономер-допант представляет собой ТВА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой МРАМ, а функциональный мономер-допант представляет собой РНЕ.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой 4-акрилоилморфолин (MORPH). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой 4-акрилоилморфолин (MORPH), а функциональный мономер-допант выбирают из группы, состоящей из N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламида (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой кислоты (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмония хлорида (TMA), N-изопропилакриламида (NIP), N-трет-бутилакриламида (TBA) и N-фенилакриламида (PHE). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH, а функциональный мономер-допант представляет собой TRI. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH, а функциональный мономер-допант представляет собой AMP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH, а функциональный мономер-допант представляет собой TMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH, а функциональный мономер-допант представляет собой NIP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH, а функциональный мономер-допант представляет собой TBA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH, а функциональный мономер-допант представляет собой PHE.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой N,N-диметилакриламид (DMA). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой N,N-диметилакриламид (DMA), а функциональный мономер-допант выбирают из группы, состоящей из N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламида (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой кислоты (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмония хлорида (TMA), N-изопропилакриламида (NIP), N-трет-бутилакриламида (TBA) и N-фенилакриламида (PHE). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет

собой DMA, а функциональный мономер-допант представляет собой TRI. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой DMA, а функциональный мономер-допант представляет собой AMP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой DMA, а функциональный мономер-допант представляет собой TMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой DMA, а функциональный мономер-допант представляет собой NIP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой DMA, а функциональный мономер-допант представляет собой TBA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой DMA, а функциональный мономер-допант представляет собой PHE.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой N-гидроксиэтилакриламид (HEAM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой N-гидроксиэтилакриламид (HEAM), а функциональный мономер-допант выбирают из группы, состоящей из N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламида (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой кислоты (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмония хлорида (TMA), N-изопропилакриламида (NIP), N-трет-бутилакриламида (TBA) и N-фенилакриламида (PHE). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM, а функциональный мономер-допант представляет собой TRI. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM, а функциональный мономер-допант представляет собой AMP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM, а функциональный мономер-допант представляет собой TMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM, а функциональный мономер-допант представляет собой NIP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM, а функциональный мономер-допант представляет собой TBA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM, а функциональный мономер-допант представляет собой PHE.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой акриламид (AM). В некоторых вариантах

осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой акриламид (AM), а функциональный мономер-допант выбирают из группы, состоящей из N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламида (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой кислоты (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмония хлорида (TMA), N-изопропилакриламида (NIP), N-трет-бутилакриламида (TBA) и N-фенилакриламида (PHE). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM, а функциональный мономер-допант представляет собой TRI. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM, а функциональный мономер-допант представляет собой AMP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM, а функциональный мономер-допант представляет собой TMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM, а функциональный мономер-допант представляет собой NIP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM, а функциональный мономер-допант представляет собой TBA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM, а функциональный мономер-допант представляет собой PHE.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид (TRI). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид (TRI), а водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из N-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), N,N-диметилакриламида (DMA), N-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TRI, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой MPAM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TRI, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TRI, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой DMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TRI, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM. В

некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TRI, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновую кислоту (AMP). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновую кислоту (AMP), а водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из N-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), N,N-диметилакриламида (DMA), N-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой AMP, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой MPAM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой AMP, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой AMP, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой DMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой AMP, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой AMP, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой (3-акриламидопропил)триметиламмонийхлорид (ТМА). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой (3-акриламидопропил)триметиламмоний хлорид (ТМА), а водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из N-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), N,N-диметилакриламида (DMA), N-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой ТМА, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой MPAM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой ТМА, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой ТМА, а

водорастворимый мономер-носитель представляет собой DMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TMA, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TMA, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-изопропилакриламид (NIP). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-изопропилакриламид (NIP), а водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из N-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), N,N-диметилакриламида (DMA), N-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой NIP, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой MPAM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой NIP, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой NIP, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой DMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой NIP, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой NIP, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-трет-бутилакриламид (TBA). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-трет-бутилакриламид (TBA), а водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из N-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), N,N-диметилакриламида (DMA), N-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TBA, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой MPAM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TBA, а водорастворимый мономер-носитель представляет

собой MORPH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TBA, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой DMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TBA, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой TBA, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-фенилакриламид (PHE). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-фенилакриламид (PHE), а водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из N-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), N,N-диметилакриламида (DMA), N-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой PHE, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой MPAM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой PHE, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой PHE, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой DMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой PHE, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой HEAM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой PHE, а водорастворимый мономер-носитель представляет собой AM.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит N-(3-метоксипропоил)акриламид (MPAM) или 4-акрилоилморфолин (MORPH) в качестве водорастворимого мономера-носителя и N-изопропилакриламид (NIP) или N-фенилакриламид (PHE) в качестве функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит N,N-диметилакриламид (DMA), N-гидроксиэтилакриламид (HEAM) или акриламид (AM) в качестве водорастворимого мономера-носителя и N-изопропилакриламид (NIP) или N-фенилакриламид (PHE) в качестве функционального мономера-допанта.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит *N*-(3-метоксипропоил)акриламид (MPAM) или 4-акрилоилморфолин (MORPH) в качестве водорастворимого мономера-носителя и *N*-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислоту (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмоний хлорид (ТМА) или *N*-*трет*-бутилакриламид (ТБА) в качестве функционального мономера-допанта.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит *N,N*-диметилакриламид (DMA), *N*-гидроксиэтилакриламид (HEAM) или акриламид (AM) в качестве водорастворимого мономера-носителя, а функциональный мономер-допant представляет собой (3-акриламидопропил)триметиламмоний хлорид (ТМА). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит *N,N*-диметилакрилами (DMA), *N*-гидроксиэтилакриламид (HEAM) или акриламид (AM) в качестве водорастворимого мономера-носителя, а функциональный мономер-допant представляет собой *N*-*трет*-бутилакриламид (ТБА). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит *N,N*-диметилакрилами (DMA), *N*-гидроксиэтилакриламид (HEAM) или акриламид (AM) в качестве водорастворимого мономера-носителя, а функциональный мономер-допant представляет собой *N*-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид (TRI). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит *N,N*-диметилакрилами (DMA), *N*-гидроксиэтилакриламид (HEAM) или акриламид (AM) в качестве водорастворимого мономера-носителя, а функциональный мономер-допant представляет собой 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислота (AMP).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения количество мономера-допанта, применяемого в реакции сополимеризации, предусмотрено для максимизации загрузки допанта при получении функциональных сополимеров с более низкими значениями критической температуры растворения (LCST) выше 37 °C. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в результате этого получают сополимеры, которые остаются растворимыми при всех соответствующих температурах. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 2% до около 30% по массе функционального мономера-допанта, например, от около 5% до около 30%, от около 10% до около 30%, от около 15% до около 30%, %, от около 20% до около 30%, от около 25% до около 30%, от около 2% до около 25%, от около 5% до около 25%, от около 10% до около 25%, от около 15% до около 25%,

от около 20% до около 25%, от около 2% до около 20%, от около 5% до около 20%, от около 10% до около 20%, от около 15% до около 20%, от около 2% до около 15%, около 5% до около 15%, от около 10% до около 15%, от около 2% до около 10%, от около 5% до около 10% или от около 2% до около 5% по массе функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит около 2 %, около 5%, около 8%, около 10%, около 12%, около 15%, около 18%, около 20%, около 22%, около 25%, около 28% или около 30% по массе функционального мономера-допанта.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 70% до около 98% по массе водорастворимого мономера-носителя, например, от около 75% до около 98%, от около 80% до около 98%, от около 85% до около 98%, от около 90% до около 98%, от около 95% до около 98%, от около 70% до около 95%, от около 75% до около 95%, от около 80% до около 95%, от около 85% до около 95%, от около 90% до около 95%, от около 70% до около 90%, от около 75% до около 90%, от около 80% до около 90%, от около 85% до около 90%, от около 70% до около 85%, около 75% до около 85%, от около 80% до около 85%, от около 70% до около 80%, от около 75% до около 80% или от около 70% до около 75% по массе водорастворимого мономера-носителя. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит около 70%, около 72%, около 75%, около 78%, около 80%, около 82%, около 85%, около 88%, около 90%, около 92%, около 95% или около 98% по массе водорастворимого мономера-носителя.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 70% до около 98% по массе водорастворимого мономера-носителя и от около 2% до около 30% по массе функционального мономера-допанта. Например, сополимер на основе полиакриламида может содержать от около 70% до около 98%, от около 70% до около 95%, от около 70% до около 80%, от около 80% до около 90%, от около 90% до около 98%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95% или около 98% по массе водорастворимого мономера-носителя и от около 2% до около 30%, от около 5% до около 25%, от около 5% до около 20%, от около 2% до около 5%, от около 5% до около 10%, от около 10% до около 15%, около 15% до около 20%, от около 20% до около 25% или от около 25% до около 30%, около 2%, около 5%, около 8%, около 10%, около 12%, около 15%, около 18%, около 20%, около 22%, около 25%, около 28% или около 30% по массе функционального мономера-допанта.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 2% до около 30% по массе функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 5% до около 30% по массе функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 10% до около 28% по массе функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 5% до около 26% по массе функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 5% до около 10% по массе функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 10% до около 15% по массе функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 15% до около 20% по массе функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 20% до около 26% по массе функционального мономера-допанта.

изобретения сополимер содержит MORPH и около 21% по массе NIP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер содержит MORPH и около 22% по массе NIP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер содержит MORPH и около 23% по массе NIP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер содержит MORPH и около 24% по массе NIP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер содержит MORPH и около 25% по массе NIP.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит MORPH в качестве водорастворимого мономера-носителя и от около 2% до около 16% по массе PHE в качестве функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит MORPH в качестве водорастворимого мономера-носителя и от около 4% до около 16% по массе PHE в качестве функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит MORPH в качестве водорастворимого мономера-носителя и от около 6% до около 14% по массе PHE в качестве функционального мономера-допанта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит MORPH в качестве водорастворимого мономера-носителя и от

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения степень полимеризации (DP) сополимера на основе полиакриламида составляет от около 10 до около 500, от около 20 до около 200, от около 50 до около 100, от около 100 до около 200, от около 200 до около 300, около 300. до около 400, или от около 400 до около 500, или около 10, около 50, около 70, около 100, около 120, около 150, около 170, около 200, около 220, около 250, около 270, около 300, около 320, около 350, около 370, около 400, около 420, около 450, около 470 или около 500. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения DP сополимера составляет около 40. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения DP сополимера составляет около 50. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения DP сополимера составляет около 60. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения DP сополимера составляет около 70. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения DP сополимера составляет около 80. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения DP сополимера составляет около 90. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения DP сополимера составляет около 100.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения молекулярная масса сополимера на основе полиакриламида составляет около 1000 г/моль до около 40000 г/моль, например, от около 1000 г/моль до около 35000 г/моль, от около 1000 г/моль до около 30000 г/моль, от около 1000 г/моль до около 25000 г/моль, от около 1000 г/моль до около 20000 г/моль, от около 1000 г/моль до около 15000 г/моль, от около 1000 г/моль до около 10000 г/моль, от около 1000 г/моль до около 7000 г/моль, от около 1000 г/моль до около 6000 г/моль, от около 1000 г/моль до около 5000 г/моль, от около 1000 г/моль до около 4000 г/моль, от около 1000 г/моль до около 3000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 40000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 35000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 30000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 25000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 20000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 15000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 10000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 7000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 6000 г/моль, от около 3000 г/моль до около 5000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 40000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 35000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 30000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 25000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 20000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 15000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 10000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 7000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 6000 г/моль, от около 4000 г/моль до около 5000 г/моль, от около 5000 г/моль до около 40000 г/моль, от около 5000 г/моль до около 35000 г/моль, от около 5000 г/моль до около 30000 г/моль, от около 5000 г/моль до

осуществления данного изобретения молекулярная масса сополимера составляет от около 4000 до около 6000 г/моль.

В данном изобретении также предлагается сополимер на основе полиакриламида, который содержит водорастворимый мономер-носитель, содержащий реакционноспособный акриламидный фрагмент, и функциональный мономер-допант, содержащий реакционноспособный акриламидный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 70% до около 98% водорастворимого мономера-носителя с реакционноспособным акриламидным фрагментом и от около 2% до около 30% функционального мономера-допанта с реакционноспособным акриламидным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения усредненная по числу молекулярная масса (M_n) сополимера составляет от около 1000 до около 30000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения степень полимеризации составляет от около 10 до около 250. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель является неионогенным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант является гидрофобным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер является амфифильным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из N-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), N,N-диметилакриламида (DMA), N-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из N-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM) и 4-акрилоилморфолина (MORPH). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой N-(3-метоксипропоил)акриламид (MPAM). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель представляет собой 4-акрилоилморфолин (MORPH).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный акриламидный мономер-допант выбирают из группы, состоящей из N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламида (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой кислоты (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмония хлорида (TMA), N-изопропилакриламида (NIP), N-трет-бутилакриламида (TBA) и N-фенилакриламида (PHE). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант выбирают из группы, состоящей из N-изопропилакриламида (NIP) и N-

фенилакриламида (PHE). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-изопропилакриламид (NIP). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональный мономер-допант представляет собой N-фенилакриламид (PHE).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 70% до около 95% по массе водорастворимого мономера-носителя MORPH и от около 5% до около 30% по массе функционального мономера-допанта NIP, при этом усредненная по числу молекулярная масса (M_n) сополимера составляет от около 1000 г/моль до около 10000 г/моль, а степень полимеризации составляет от около 10 до около 100. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит от около 74% до около 80% по массе водорастворимого мономера-носителя MORPH и от около 20% до около 26% по массе функционального мономера-допанта NIP, при этом усредненная по числу молекулярная масса (M_n) сополимера составляет от около 1000 г/моль до около 5000 г/моль, а степень полимеризации составляет от около 10 до около 50. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер на основе полиакриламида содержит около 77% по массе водорастворимого мономера-носителя MORPH и около 23% по массе функционального мономера-допанта NIP, при этом усредненная по числу молекулярная масса (M_n) сополимера составляет около 3200 г/моль, а степень полимеризации составляет около 26.

Композиции, содержащие сополимер на основе полиакриламида

В данном изобретении также предлагаются композиции, содержащие сополимеры на основе полиакриламида, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная композиция содержит сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная композиция содержит сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению и биологическую молекулу. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологическая молекула представляет собой белок. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой белок, подверженный агрегации в водной среде. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер является незаряженным, катионным или анионным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер является амфифильным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мономеры-носители

представляют собой водорастворимые вещества и отвечают как за сохранение растворимости, так и за обеспечение инертного барьера для предотвращения агрегации биологических видов, например, для предотвращения межбелковых взаимодействий. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водорастворимый мономер-носитель является преобладающим веществом в сополимере на основе полиакриламида. В некоторых вариантах осуществления функциональные мономер-допаны сополимеризуются при более низких массовых процентах и статистически включаются в полученный сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эти допаны выбирают таким образом, чтобы стимулировать либо взаимодействие «полимер-граница раздела», либо взаимодействие «полимер-белок».

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция, которая содержит сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению и биологическую молекулу или носитель на основе липида, имеет концентрацию сополимера от около 0,0001% до около 5% по массе композиции, например, от около 0,0001% до около 4%, от около 0,0001% до около 3%, от около 0,0001% до около 2%, от около 0,0001% до около 1%, от около 0,0001% до около 0,5%, от около 0,0001% до около 0,4%, от около 0,0001% до около 0,3%, от около 0,0001% до около 0,2%, от около 0,0001% до около 0,1%, от около 0,0001% до около 0,05%, от около 0,0001% до около 0,02%, от около 0,0001% до около 0,01%, от около 0,0001% до около 0,005%, от около 0,005% до около 5%, от около 0,005% до около 4%, от около 0,005% до около 3%, от около 0,005% до около 2%, от около 0,005% до около 1%, от около 0,005% до около 0,5%, от около 0,005% до около 0,4%, от около 0,005% до около 0,3%, от около 0,005% до около 0,2%, от около 0,005% до около 0,1%, от около 0,005% до около 0,05%, от около 0,005% до около 0,02%, от около 0,005% до около 0,01%, от около 0,01% до около 5%, от около 0,01% до около 4%, от около 0,01% до около 3%, от около 0,01% до около 2%, от около 0,01% до около 1%, от около 0,01% до около 0,5%, от около 0,01% до около 0,4%, от около 0,01% до около 0,3%, от около 0,01% до около 0,2%, от около 0,01% до около 0,1%, от около 0,01% до около 0,05%, от около 0,01% до около 0,02%, от около 0,02% до около 5%, от около 0,02% до около 4%, от около 0,02% до около 3%, от около 0,02% до около 2%, от около 0,02% до около 1%, от около 0,02% до около 0,5%, от около 0,02% до около 0,4%, от около 0,02% до около 0,3%, от около 0,02% до около 0,2%, от около 0,02% до около 0,1%, от около 0,02% до около 0,05%, от около 0,05% до около 5%, от около 0,05% до около 4%, от около 0,05% до около 3%, от около 0,05% до около 2%, от около 0,05% до около 1%, от около 0,05% до около 0,5%, от около 0,05% до около 0,4%, от около 0,05% до около 0,3%, от около 0,05% до около 0,2%, от около 0,05% до около 0,1%, от около

0,1% до около 5%, от около 0,1% до около 4%, от около 0,1% до около 3%, от около 0,1% до около 2%, от около 0,1% до около 1%, от около 0,1% до около 0,5%, от около 0,1% до около 0,4%, от около 0,1% до около 0,3%, от около 0,1% до около 0,2%, от около 0,2% до около 5%, от около 0,2% до около 4%, от около 0,2% до около 3%, от около 0,2% до около 2%, от около 0,12% до около 1%, от около 0,2% до около 0,5%, от около 0,2% до около 0,4%, от около 0,2% до около 0,3%, от около 0,3% до около 5%, от около 0,3% до около 4%, от около 0,3% до около 3%, от около 0,3% до около 2%, от около 0,3% до около 1%, от около 0,3% до около 0,5%, от около 0,3% до около 0,4%, от около 0,4% до около 5%, от около 0,4% до около 4%, от около 0,4% до около 3%, от около 0,4% до около 2%, от около 0,4% до около 1%, от около 0,4% до около 0,5%, от около 0,5% до около 5%, от около 0,5% до около 4%, от около 0,5% до около 3%, от около 0,5% до около 2%, от около 0,5% до около 1%, от около 1% до около 5%, от около 1% до около 4%, от около 1% до около 3%, от около 1% до около 2%, от около 2% до около 5%, от около 2% до около 4%, от около 2% до около 3%, от около 3% до около 5%, от около 3% до около 4% или от около 4% до около 5% по массе композиции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация сополимера составляет от около 0,0001% до около 5% по массе композиции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация сополимера составляет от около 0,001% до около 1% по массе, от около 0,005% до около 0,5% по массе, от около 0,005% до около 0,02% по массе, от около 0,01% до около 0,2% по массе, около 0,1% % до около 0,4% по массе или от около 0,2% до около 0,3% по массе композиции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация сополимера составляет около 0,005% по массе композиции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация сополимера составляет около 0,01% по массе композиции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация сополимера составляет около 0,05% по массе композиции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация сополимера составляет около 0,1% по массе композиции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация сополимера составляет около 1% по массе композиции.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок выбирают из группы, состоящей из антител и их фрагментов, цитокинов, хемокинов, гормонов, вакцинных антигенов, раковых антигенов, адъювантов и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой вакцину. В

некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой гормон. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция демонстрирует пониженную агрегацию белка по сравнению с композицией того же белка без сополимера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция демонстрирует пониженную преципитацию белка по сравнению с композицией того же белка без сополимера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит белок в концентрации по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза или по меньшей мере в пять раз больше, чем концентрация того же белка в композиции без сополимера.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой инсулин или его аналог. Таким образом, в данном изобретении также предлагаются композиции, которые содержат сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению и инсулин или его аналог.

Неограничивающие примеры инсулина и аналогов инсулина включают инсулин лизпро, HUMALOG[®] (быстродействующий инсулин лизпро), инсулин гларгин, LANTUS[®] (инсулин гларгин), инсулин детемир, LEVEMIR[®] (инсулин детемир), ACTRAPID[®] (быстродействующий человеческий инсулин), инсулин модерн, NOVORAPID[®] (инсулин аспарт), VELOSULIN[®] (человеческий инсулин), HUMULIN[®] M3 (смесь растворимого инсулина и инсулина изофана, называемая двухфазным инсулином изофаном), HYPURIN[®] (нейтральный бычий инсулин), INSUMAN[®] с (рекомбинантный человеческий инсулин), INSUMAN[®] (человеческий инсулин изофан длительного действия), MIXTARD[®] 40 (смесь 30% растворимого инсулина и 70% инсулина изофана), MIXTARD[®] 50 (смесь 50% растворимого инсулина и 50% инсулина изофана), инсулин аспарт, инсулин глулизин, инсулин изофан, инсулин деглудек, инсулин икодек, инсулин с цинком пролонгированного действия, NOVOLIN[®] R (человеческий инсулин), HUMULIN[®] R (человеческий инсулин), HUMULIN[®] R Regular U-500 (концентрированный обычный инсулин), NOVOLIN[®] N (человеческий инсулин средней продолжительности действия), HUMULIN[®] N (человеческий инсулин средней продолжительности действия), RELION[®] (торговая марка NOVOLIN[®] R, NOVOLIN[®] N и NOVOLIN[®] 70/30, отпускаемая без рецепта), AFREZZA[®] (быстродействующий ингаляционный инсулин), HUMULIN[®] 70/30 (смесь 70% суспензии человеческого инсулина изофана и 30 % человеческого инсулина для инъекций), NOVOLIN[®] 70/30 (смесь 70 % NPH, суспензии человеческого инсулина изофана и 30 % обычного человеческого инсулина для инъекций), NOVOLIN[®] 70/30 (смесь 70 % суспензии инсулина аспарта протамина и 30% инсулина аспарта для инъекций), HUMULIN[®] 50/50 (смесь 50% суспензии человеческого инсулина изофана и

50% человеческого инсулина для инъекций), HUMALOG[®] Mix 75/25 (смесь 75% суспензии инсулина лизпро протамина и 25% инсулина лизпро для инъекций), инсулин аспарт протамин-инсулин аспарт, инсулин лизпро протамин-инсулин лизпро, инсулин лизпро протамин-инсулин лизпро, человеческий инсулин NPH-человеческий обычный инсулин, инсулин деглудек-инсулин аспарт и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог представляет собой человеческий инсулин или рекомбинантный человеческий инсулин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог представляет собой нечеловеческий инсулин (например, примата, свиньи, коровы, кошки, собаки или грызуна) или рекомбинантный нечеловеческий инсулин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог представляет собой очищенный или синтетический инсулин. В некоторых вариантах осуществления инсулин или его аналог выбирают из группы, состоящей из инсулина быстрого действия, инсулина короткого действия, инсулина средней продолжительности действия, инсулина длительного действия и предварительно смешанного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог представляет собой инсулин лизпро. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог представляет собой HUMALOG[®], коммерчески доступный быстродействующий аналог человеческого инсулина, инсулин лизпро. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог представляет собой инсулин аспарт. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог представляет собой инсулин глулизин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог представляет собой рекомбинантный человеческий инсулин.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог присутствует в композиции в мономерной форме, димерной форме, гексамерной форме и их комбинациях. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения от около 1 моль% до около 5 моль%, от около 1 моль% до около 10 моль%, от около 1 моль% до около 20 моль%, от около 1 моль% до около 30 моль%, от около 1 моль% до около 40 моль%, от около 1 моль% до около 50 моль%, от около 1 моль% до около 60 моль%, от около 1 моль% до около 70 моль%, от около 1 моль% до около 80 моль%, от около 1 моль% до около 90 моль% или от около 10 моль% до около 100 моль% инсулина или его аналога присутствует в композиции в мономерной форме. Например, около 1 моль%, около 2 моль%, около 3 моль%, около 4 моль%, около 5 моль%, около 6 моль%, около 7 моль%, около 8 моль%, около 9 моль%, около 10 моль%, около 15 моль%, около 20

моль%, около 25 моль%, около 30 моль%, около 35 моль%, около 40 моль%, около 45 моль%, около 50 моль%, около 55 моль%, около 60 моль%, около 65 моль%, около 70 моль%, около 75 моль%, около 80 моль%, около 85 моль%, около 90 моль%, около 95 моль%, около 99 моль% или около 100 моль% инсулина или его аналога присутствует в композиции в мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения около 3 моль% инсулина или его аналога присутствует в композиции в мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог «по существу присутствует» в композиции в мономерной форме, что означает, что более чем около 50 моль% инсулина или аналога инсулина присутствует в мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 50 моль% или более инсулина в мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 60 моль% или более инсулина в мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 70 моль% или более инсулина в мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 80 моль% или более инсулина в мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 90 моль% или более инсулина в мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 99 моль% или более инсулина в мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 100 моль% инсулина в мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог «по существу отсутствует» в композиции в мономерной форме, что означает, что менее чем около 10 моль% инсулина или аналога инсулина присутствует в мономерной форме.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения от около 10 до около 100 моль% инсулина или его аналога присутствует в композиции в димерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения от около 10 моль% до около 100 моль%, от около 20 моль% до около 90 моль%, от около 30 моль% до около 80 моль%, от около 40 моль% до около 70 моль%, от около 50 моль% до около 60 моль%, от около 60 моль% до около 100 моль%, от около 80 моль% до около 100 моль%, от около 90 моль% до около 100 моль% или от около 95 моль% до около 100 моль% инсулина или его аналога присутствует в композиции в димерной форме. Например, около 10 моль%, около 15 моль%, около 20 моль%, около 25 моль%, около 30 моль%, около 35 моль%, около 40 моль%, около 45 моль%, около 50 моль%, около

55 моль%, около 60 моль%, около 65 моль%, около 70 моль%, около 75 моль%, около 80 моль%, около 85 моль%, около 90 моль%, около 95 моль%, около 97 моль%, около 99 моль% или около 100 моль% инсулина или его аналога присутствует в композиции в димерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог «по существу присутствует» в композиции в димерной форме, что означает, что более чем около 50 моль% инсулина или аналога инсулина присутствует в димерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 50 моль% или более инсулина в димерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 60 моль% или более инсулина в димерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 70 моль% или более инсулина в димерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 80 моль% или более инсулина в димерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 90 моль% или более инсулина в димерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 97 моль% или более инсулина в димерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 99 моль% или более инсулина в димерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог содержат около 100 моль% инсулина в димерной форме.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин не конъюгирован с полиэтиленгликолем (PEG) или полимером трегалозы.

Диапазон концентраций инсулина или его аналога может составлять от около 0,34 мг/мл (10 ЕД/мл) до около 34 мг/мл (1000 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина составляет от около 1,7 мг/мл (50 ЕД/мл) до около 17 мг/мл (500 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина составляет от около 17 мг/мл (500 ЕД/мл) до около 34 мг/мл (1000 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина составляет около 3,4 мг/мл (100 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина составляет около 6,8 мг/мл (200 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина составляет около 10,2 мг/мл (300 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина составляет около 13,6 мг/мл (400 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина

составляет около 17 мг/мл (500 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина составляет около 20,4 мг/мл (600 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина составляет около 23,8 мг/мл (700 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина составляет около 27,2 мг/мл (800 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина составляет около 30,6 мг/мл (900 ЕД/мл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация инсулина составляет около 34 мг/мл (1000 ЕД/мл).

Таким образом, в данном изобретении также предлагаются композиции, которые содержат сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению и инсулин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры на основе полиакриламида содержат мономер-носитель MORPH и функциональный мономер-допант NIP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит от около 0,005 мас. % до около 0,2 мас. % сополимера на основе полиакриламида, содержащего от около 70% до около 95% по массе мономера-носителя MORPH; и от около 5% до около 30 % по массе мономера-допанта NIP; а также около 100 Ед/мл инсулина или его аналога. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит около 0,01 мас. % сополимера на основе полиакриламида, содержащего от около 74% до около 80% по массе мономера-носителя MORPH; и от около 20% до около 26% по массе мономера-допанта NIP; а также около 100 Ед/мл инсулина или его аналога. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит около 0,01 мас. % сополимера на основе полиакриламида, содержащего около 77% по массе мономера-носителя MORPH; и около 23% по массе мономера-допанта NIP; а также около 100 Ед/мл инсулина или его аналога.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры, описанные в данном документе, уменьшают или предотвращают агрегацию инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры позволяют получить стабильный состав инсулина или его аналога в его мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения от около 10 моль% до около 100 моль% молекул инсулина или его аналога в составе присутствуют в виде мономерного инсулина или его аналога. Например, около 10 моль%, около 15 моль%, около 20 моль%, около 25 моль%, около 30 моль%, около 35 моль%, около 40 моль%, около 45 моль%, около 50 моль%, около 55 моль%, около 60 моль%, около 65 моль%, около 70 моль%, около 75 моль%, около 80 моль%, около 85 моль%, около 90 моль%, около 95 моль%, около 99 моль% или около 100 моль% молекул

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения стабильный состав инсулина в его мономерной форме приводит к сверхбыстрой кинетике *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры позволяют получать инсулин лизпро со сверхбыстрой абсорбцией (UFAL). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения более чем около 50 моль% молекул инсулина в составе UFAL присутствуют в виде мономерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения более чем около 60 моль% молекул инсулина в составе UFAL присутствуют в виде мономерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения более чем около 70 моль% молекул инсулина в составе UFAL присутствуют в виде мономерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения более чем около 80 моль% молекул инсулина в составе UFAL присутствуют в виде мономерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения более чем около 90 моль% молекул инсулина в составе UFAL присутствуют в виде мономерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения менее чем около 30 моль% молекул инсулина в составе UFAL присутствуют в виде мономерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения менее чем около 20 моль% молекул инсулина в составе UFAL присутствуют в виде мономерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения UFAL состав по существу не содержит димерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения менее чем около 30 моль% молекул инсулина в составе UFAL присутствуют в виде гексамерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения менее чем около 20 моль% молекул инсулина в составе UFAL присутствуют в виде гексамерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения менее чем около 10 моль% молекул инсулина в составе UFAL присутствуют в виде гексамерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения менее чем около 5 моль% молекул инсулина в составе UFAL присутствуют в виде гексамерного инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения UFAL состав по существу не содержит гексамерного инсулина.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит инсулин или его аналог, по существу присутствующий в мономерной форме, при этом введение указанной композиции субъекту приводит к более короткой продолжительности действия по сравнению с введением композиции, содержащей такое же количество

инсулина, или его аналога, по существу присутствующего в димерной форме, гексамерной форме или их комбинации, при этом продолжительность действия представляет собой время до деплетирования 50% максимальной наблюдаемой концентрации ($C_{\max}$).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит инсулин или его аналог, по существу присутствующий в мономерной форме, при этом введение указанной композиции субъекту приводит к более короткому времени до начала действия инсулина по сравнению с введением композиции, содержащей такое же количество инсулина, или его аналога, по существу присутствующего в димерной форме, гексамерной форме или их комбинации, при этом время до начала действия представляет собой время до достижения 50% наблюдаемой максимальной концентрации ($C_{\max}$).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит инсулин или его аналог, по существу присутствующий в мономерной форме, при этом введение указанной композиции субъекту приводит к большей доле общей экспозиции инсулина по сравнению с введением композиции, содержащей такое же количество инсулина, или его аналога, по существу присутствующего в димерной форме, гексамерной форме или их комбинации, при этом экспозиция представляет собой долю площади под кривой (AUC) в данный момент времени от общей AUC ($AUC_{\text{time}}/AUC_{\text{total}}$).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит инсулин или его аналог, по существу присутствующий в мономерной форме, при этом введение указанной композиции субъекту приводит к более короткому времени достижения максимальной наблюдаемой концентрации инсулина ($T_{\max}$) по сравнению с введением композиции, содержащей такое же количество инсулина, или его аналога, по существу присутствующего в димерной форме, гексамерной форме или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция, содержащая сополимер по данному изобретению и биологическую молекулу, дополнительно содержит один или большее количество из следующих агентов: фармацевтически приемлемый носитель, водный буфер, модификатор тоничности и консервант. Применяемые в данном изобретении фармацевтически приемлемые носители, модификаторы тоничности и консерванты нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная композиция содержит буфер, такой как фосфатный, цитратный, сукцинатный, буфер других органических кислот и гистидиновый, при этом термин «буфер» относится к смеси слабой кислоты и сопряженного с ней основания или наоборот, т.е. буфер применяется для поддержания pH раствора на почти постоянном уровне. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения буфер содержит одну или большее

количество фосфатных солей. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения буфер представляет собой фосфат натрия.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная композиция содержит модификатор тоничности, такой как хлорид натрия, хлорид калия, маннит, декстроза, глицерин или хлорид магния. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанным модификатором тоничности является хлорид натрия (NaCl) или глицерин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанным модификатором тоничности является глицерин.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная композиция содержит один или большее количество консервантов, таких как феноксиэтанол, фенол, метакрезол, метилпарабен, пропилпарабен и бензиловый спирт. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество консервантов содержат феноксиэтанол и фенол. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество консервантов содержат феноксиэтанол и метакрезол. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения консервант представляет собой феноксиэтанол. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения консервант представляет собой фенол или метакрезол.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция, содержащая сополимеры по данному изобретению, представляет собой водную композицию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция, содержащая сополимеры по данному изобретению, по существу содержит воду.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH композиции составляет от около 4 до около 9, например, от около 4 до около 8, от около 4 до около 7, от около 4 до около 6, от около 4 до около 5, от около 5 до около 9, от около 5 до около 8, от около 5 до около 7, от около 5 до около 6, от около 6 до около 9, от около 6 до около 8, от около 6 до около 7, от около 7 до около 9, от около 7 до около 8, от около 8 до около 9, или около 4, около 4,5, около 5, около 5,5, около 6, около 6,5, около 7, около 7,4, около 8, около 8,5 или около 9. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH композиции составляет от около 4 до около 9. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH композиции составляет от около 6 до около 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH композиции составляет от около 7 до около 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH композиции составляет около 7,4.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения UFAL, содержащий сополимер MORPH-NIP_{23%} устойчив к стрессовому выдерживанию в течение более 24

часов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения UFAL, содержащий сополимер MORPH-NIP_{23%}, остается стабильным почти в четыре раза дольше, чем коммерческий HUMALOG®.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения составы UFAL, содержащие сополимер по данному изобретению, дополнительно содержат один или большее количество фармацевтически приемлемых носителей, модификаторов тоничности и консервантов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения состав UFAL содержит буфер, консервант, агент тоничности и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения буфер содержит одну или большее количество фосфатных солей. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения буфер представляет собой фосфат натрия. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения консервант представляет собой феноксиэтанол. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения консервант представляет собой фенол или метакрезол. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанным агентом тоничности является хлорид натрия (NaCl) или глицерин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанным агентом тоничности является глицерин.

В данном изобретении также предлагаются композиции, содержащие сополимеры на основе полиакриламида по данному изобретению и носитель на основе липидов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения носитель на основе липидов выбирают из группы, состоящей из липосом, полимеросом, мицелл и липидных наночастиц.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих моноклональные антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих конъюгаты «антитело-лекарственное средство». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих вакцинные антигены на белковой основе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих вакцинные антигены с конъюгатом «белок-полисахарид». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления данного

изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих матричную РНК (мРНК). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих малую интерферирующую РНК (siРНК). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих короткую шпилечную РНК (shРНК). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих микроРНК (miРНК). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих одну или большее количество нуклеиновых кислот и один или большее количество липидов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих один или большее количество нейтральных липидов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих один или большее количество катионных липидов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих один или большее количество анионных липидов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих липосомы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих липидные наночастицы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих мицеллы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих полимеросомы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению применяются в качестве добавок к составам в составах, содержащих экзосомы.

Совместные составы, содержащие инсулин

Также в данном изобретении предлагается композиция, содержащая сополимер на основе полиакриламида согласно данному изобретению, инсулин или его аналог и один или большее количество из следующих агентов: пептиды, белки или гормоны.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения совместный состав содержит инсулин или его аналог и глюкагон, агонист рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), агонист рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP) или агонист двойного рецептора GIP и GLP-1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения совместный состав, содержащий сополимер по данному изобретению и инсулин, содержит агонист рецептора GLP-1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения агонист рецептора GLP-1 выбирают из группы, состоящей из ликсисенатида, лираглутида, альбиглутида, дулаглутида, эксенатида, эксенатида с пролонгированным высвобождением и семаглутида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения совместный состав, содержащий сополимер по данному изобретению и инсулин, содержит агонист рецептора GLP-1 и агонист рецептора GIP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения совместный состав, содержащий сополимер по данному изобретению и инсулин, содержит агонист двойного рецептора GIP и GLP-1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения агонист двойного рецептора GIP и GLP-1 представляет собой тирзепатид. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения совместный состав, содержащий сополимер по данному изобретению и инсулин, содержит агонист рецептора GIP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения совместный состав, содержащий сополимер по данному изобретению и инсулин, содержит глюкагон.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения совместный состав, содержащий сополимер по данному изобретению и инсулин, дополнительно содержит амилин или его аналог. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения аналогом амилина является прамлинтид. В соответствии с вариантами осуществления данного изобретения совместный состав мономерного инсулина или его аналога и прамлинтида в присутствии сополимера, описанного в данном документе, имеет сверхбыструю кинетику с высокой степенью перекрытия, что приводит к улучшенному контролю за уровнем глюкозы после нагрузки глюкозой. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения совместный состав мономерного инсулина лизпро и прамлинтида в присутствии сополимера, описанного в данном документе, имеет сверхбыструю кинетику с высокой степенью перекрытия, что приводит к улучшенному

контролю за уровнем глюкозы после нагрузки глюкозой. Как описано в Примере 3, состав, содержащий амфифильный сополимер MoNi₂₃% в качестве стабилизатора, сохраняет физическую стабильность в два раза дольше, чем коммерческий HUMALOG® в тесте на стрессовое выдерживание.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в композиции, содержащей сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению, инсулин или его аналог и амилин или его аналог амилина присутствуют в соотношении амилина или его аналога к инсулину или его аналогу от около 1:1 до около 1:20, от около 1:1 до около 1:15, от около 1:1 до около 1:10, от около 1:1 до около 1:6 или около 1:20, около 1:15, около 1:10, около 1:9, около 1:8, около 1:7, около 1:6, около 1:5, около 1:4, около 1:3, около 1:2 или около 1:1.

Сополимеры по данному изобретению также позволяют получать препарат прамлинтида при pH, близком к нейтральному (~ pH 7), тогда как для существующих составов прамлинтида требуется, чтобы pH состава составлял ~ pH 4, что несовместимо с инсулином. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH совместного состава, включающего сополимер по данному изобретению, инсулин или его аналог и амилин или его аналог, находится при близком к нейтральному pH (~ pH 7). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH совместного состава, включающего сополимер по данному изобретению, инсулин или его аналог и амилин или его аналог, составляет от около 6 до около 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH совместного состава, включающего сополимер по данному изобретению, инсулин или его аналог и амилин или его аналог, составляет около 6,5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH совместного состава, включающего сополимер по данному изобретению, инсулин или его аналог и амилин или его аналог, составляет около 7. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH совместного состава, включающего сополимер по данному изобретению, инсулин или его аналог и амилин или его аналог, составляет около 7,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения аналогом амилина является прамлентид.

Таким образом, в данном изобретении также предлагаются совместные составы, содержащие сополимер на основе полиакриламида по данному изобретению, инсулин или его аналог и прамлентид. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит от около 0,005 мас. % до около 0,2 мас. % сополимера на основе полиакриламида, содержащего от около 70 мас. % до около 95 мас. % мономера-носителя MORPH; и от около 5 мас. % до около 30 мас. % мономера-допанта NIP; около 100 Ед/мл инсулина или его аналога; а также от около 0,01 мг/мл до около 0,1 мг/мл прамлентид. В

некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит около 0,01 мас. % сополимера на основе полиакриламида, содержащего от около 74 мас. % до около 80 мас. % мономера-носителя MORPH; и от около 20 мас. % до около 26 мас. % мономера-допанта NIP; около 100 Ед/мл инсулина или его аналога; а также от около 0,5 мг/мл до около 0,6 мг/мл прамлинтида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит около 0,01 мас. % сополимера на основе полиакриламида, содержащего около 77% по массе мономера-носителя MORPH; и около 23% по массе мономера-допанта NIP; около 100 Ед/мл инсулина или его аналога, а также около 0,6 мг/мл прамлинтида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин или его аналог по существу присутствует в мономерной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная композиция не содержит цинка(II).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения введение композиции субъекту характеризуется соотношением AUC_6/AUC_{120} инсулина, которое по меньшей мере на около 25% больше, чем соотношение AUC_6/AUC_{120} инсулина после введения только HUMALOG® или введения HUMALOG® и прамлинтида по отдельности, например, на около 30%, 40%, 50% или больше.

Варианты осуществления данного изобретения демонстрируют, что сополимер, присутствующий в совместном составе, не изменяет фармакокинетические (PK) или фармакодинамические (PD) свойства активных ингредиентов в указанном составе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения прамлинтид в совместном составе приводит к замедлению опорожнения желудка, как и при отдельном введении прамлинтида. В других вариантах осуществления данного изобретения комбинированные эффекты сверхбыстрой доставки инсулина и прамлинтида, синхронизированные в совместном составе по данному изобретению, приводят к уменьшению деплетирования глюкозы по сравнению с исходными измерениями при сохранении контроля над первоначальным подъемом уровня глюкозы при моделируемой авторами нагрузке глюкозой «во время еды». Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения совместный состав может улучшать контроль уровня глюкозы за счет снижения риска постпрандиальной гипогликемии при одновременном снижении бремени болезни у пациента.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применение совместного состава обеспечивает оптимизированную болюсную доставку инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения инсулин со сверхбыстрой кинетикой доставляется синхронно с прамлинтидом в инсулиновых инфузионных насосах

и системах замкнутого цикла «искусственная поджелудочная железа». В некоторых вариантах осуществления данного изобретения стабильный совместный состав инсулина и прамлинтида позволяет проводить лечение двумя гормонами в системах замкнутого цикла вне клинических исследований, когда применение двух отдельных инфузионных насосов нецелесообразно. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения синхронизированная кинетика инсулин-прамлинтид и более короткая продолжительность действия инсулина в совместном составе по данному изобретению обеспечивают улучшенную автономную доставку инсулина. Как правило, системы замкнутого цикла требуют от пациентов вводить определенное количество углеводов во время еды и не являются полностью автономными, отчасти потому, что кинетика абсорбции инсулина недостаточно быстрая, чтобы уменьшить колебания уровня глюкозы во время еды, а увеличенная продолжительность действия инсулина может привести к постпрандиальной гипогликемии. Таким образом, сверхбыстродействующий совместный состав инсулина и прамлинтида может быстро реагировать на подъемы уровня глюкозы во время приема пищи, поскольку действие инсулина будет немедленным, а прамлинтид замедлит появление глюкозы (благодаря замедлению опорожнения желудка). Кроме того, при более короткой продолжительности действия инсулина риск гипогликемии в результате стекинга инсулина будет снижен.

Данное изобретение демонстрирует, что стабильный совместный состав инсулина и прамлинтида для однократного введения, использующий мономерный инсулин, может иметь синхронизированную сверхбыструю фармакокинетику инсулина и прамлинтида, что приводит к лучшему гликемическому контролю при моделировании приема пищи. Этот совместный состав может улучшить контроль уровня глюкозы и уменьшить бремя болезни у пациентов в клинической практике, при применении такого состава как для прямого болюсного введения, так и в инсулиновых инфузионных помпах или системах искусственной поджелудочной железы с замкнутым циклом.

Свойства сополимерных композиций

Сополимеры на основе полиакриламида по данному изобретению обладают уникальными свойствами и при применении в водном составе с биологической молекулой могут придавать составу полезные свойства.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры, описанные в данном документе, уменьшают или предотвращают агрегацию биологической молекулы или носителя на основе липида, например, при составлении водной композиции, содержащей биологическую молекулу или носитель на основе липида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологическая

молекула представляет собой белок. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры, описанные в данном документе, уменьшают или предотвращают агрегацию белка, например, при составлении в виде водной композиции, содержащей белок. Соплимеры можно применять с любым белком, склонным к агрегации в водной среде. Неограничивающие примеры включают антитела и их фрагменты, цитокины, хемокины, гормоны, вакцинные антигены, раковые антигены, адъюванты и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры на основе полиакриламида снижают или предотвращают агрегацию белка, подверженного агрегации в водной среде. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой инсулин или его аналог. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой гормон. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой вакцину.

Соплимеры по данному изобретению также могут повышать стабильность состава. В соответствии с вариантами осуществления данного изобретения сополимеры, описанные в данном документе, могут быть добавлены для повышения стабильности состава, содержащего, например, биологическую молекулу или носитель на основе липидов, например, пептиды, белки и их конъюгаты, нуклеиновые кислоты и олигонуклеотиды, липосомы, полимеросомы, мицеллы и липидные наночастицы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения добавление сополимера по данному изобретению повышает стабильность белкового состава. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения добавление сополимера по данному изобретению повышает стабильность липосомного состава. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения добавление сополимера по данному изобретению повышает стабильность мицеллярного состава. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения добавление сополимера по данному изобретению повышает стабильность состава из липидных наночастиц. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения добавление сополимера по данному изобретению повышает стабильность состава, содержащего одну или большее количество нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения добавление сополимера по данному изобретению повышает стабильность состава, содержащего одну или большее количество матричных РНК (мРНК). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения

добавление сополимера по данному изобретению повышает стабильность состава, содержащего одну или большее количество малых интерферирующих РНК (siРНК). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения добавление сополимера по данному изобретению повышает стабильность состава, содержащего одну или большее количество дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению повышают термостабильность состава, содержащего биологическую молекулу, которая в некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляет собой белок. Белковые составы обычно требуют дорогостоящей транспортировки и хранения в холодильнике, чтобы предотвратить потерю целостности белка. Поддержание целостности белка является проблемой для фармацевтической промышленности, поставщиков медицинских услуг и пациентов во всем мире, особенно в развивающихся регионах и регионах с низким уровнем дохода, где холодовая цепь, необходимая для поддержания активности и эффективности белка, является несовершенной, перегруженной или отсутствует. Это приводит к тому, что большое количество терапевтических белковых составов тратится впустую и потенциально угрожает жизни пациентов. Таким образом, перерывы в холодовой цепи могут быть дорогостоящими. Сополимеры по данному изобретению могут придавать долговременную стабильность и/или устойчивость белковым композициям к холодовой цепи. Например, в то время как коммерческие белковые составы имеют хороший срок годности при правильном хранении (т. е. в холодильнике), перерывы в холодовой цепи могут снизить биологическую активность белка и целостность состава.

Белковые составы, содержащие сополимеры по данному изобретению, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения являются стабильными в течение продолжительных периодов времени при температурах выше, чем обычно требуется для хранения в холодовой цепи. Например, белковые составы, содержащие сополимеры по данному изобретению, можно хранить при комнатной температуре (от около 20 °C до около 22 °C) или при повышенных температурах, таких как около 25 °C, около 30 °C, около 35 °C, около 40 °C, около 45 °C или выше при сохранении целостности белка. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белковые составы, содержащие сополимеры по данному изобретению, можно хранить при более высокой температуре, чем обычно требуется, например, при около -20 °C, или около 0 °C, или около 2 °C, или около 4 °C, или около 8 °C, или около 20 °C, вместо более низкой температуры, такой как около -80 °C, или около -60 °C, или около -40 °C. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры обеспечивают возможность хранения белковых

составов при комнатной температуре или более высоких температурах, и не требуют хранения в холодовой цепи. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения для поддержания целостности белка хранение в холодовой цепи не требуется.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применение сополимеров по данному изобретению в белковых составах сохраняет целостность состава, биологическую активность, фармакокинетику и фармакодинамику в течение более длительного периода времени при воздействии таких условий, как повышенные температуры и перемешивание, по сравнению с тем же составом без сополимера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения составы сохраняют целостность белка в течение около 1 дня, около 1 недели, около 1 месяца, около 3 месяцев, около 6 месяцев, около 9 месяцев, около 12 месяцев, около 18 месяцев, около 24 месяцев или дольше при более высоких температурах по сравнению с тем же составом, который не содержит сополимер по данному изобретению.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению снижают скорость агрегации биологической молекулы в водном составе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению снижают скорость агрегации белка в водной белковом составе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белок представляет собой белок, который имеет тенденцию к агрегации в водной среде. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой антитело или его фрагменты, цитокин, хемокин, гормон, вакцинный антиген, раковый антиген, адъювант и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения это позволяет составлять более концентрированные белковые растворы, тем самым уменьшая объем белкового раствора, который необходимо вводить, например, пациенту. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция содержит белок в концентрации по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза или по меньшей мере в пять раз больше, чем концентрация того же белка в композиции без сополимера.

Таким образом, применение сополимеров по данному изобретению может придавать белковым составам долговременную стабильность и/или устойчивость к холодовой цепи. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белок в композиции, которая содержит сополимер по данному изобретению, проявляет повышенную стабильность при хранении при комнатной температуре по сравнению с белковой композицией, которая не содержит сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения повышение стабильности составляет по меньшей

мере 10-кратное, по меньшей мере 15-кратное, по меньшей мере 20-кратное, по меньшей мере 25-кратное, по меньшей мере 30-кратное, по меньшей мере 35-кратное, по меньшей мере 40-кратное, по меньшей мере 45-кратное, по меньшей мере 50-кратное повышение или более по сравнению с белковой композицией, которая не содержит сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой инсулин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой гормон. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой вакцину.

Таким образом, в одном конкретном варианте осуществления данного изобретения инсулин в композиции, которая содержит сополимер по данному изобретению, проявляет повышенную стабильность при хранении при комнатной температуре по сравнению с инсулиновой композицией, которая не содержит сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения повышение стабильности составляет по меньшей мере 10-кратное, по меньшей мере 15-кратное, по меньшей мере 20-кратное, по меньшей мере 25-кратное, по меньшей мере 30-кратное, по меньшей мере 35-кратное, по меньшей мере 40-кратное, по меньшей мере 45-кратное, по меньшей мере 50-кратное повышение или более по сравнению с инсулиновой композицией, которая не содержит сополимер.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению сохраняют активность белка в течение 6 месяцев стрессового выдерживания без изменения одной или большего количества из следующих свойств: фармакокинетика состава, вторичная структура белка, прозрачность состава и биологическая активность *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер снижает агрегацию белка в составе при хранении при температуре окружающей среды (от около 23 °C до около 27 °C) по сравнению с белковым составом, не содержащим сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер снижает агрегацию белка в составе при хранении при температуре 37 °C по сравнению с белковым составом, не содержащим сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер снижает агрегацию белка в составе при хранении при температуре 50 °C по сравнению с белковым составом, не содержащим сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой инсулин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой гормон. В

некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой вакцину.

В одном варианте осуществления данного изобретения сополимеры по данному изобретению сохраняют активность инсулина в течение 6 месяцев стрессового выдерживания без изменения одной или большего количества из следующих свойств: фармакокинетика состава, вторичная структура белка, прозрачность состава и биологическая активность *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер снижает агрегацию инсулина в составе при хранении при температуре окружающей среды (от около 23 °C до около 27 °C) по сравнению с составом человеческого инсулина, не содержащим сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер снижает агрегацию инсулина в составе при хранении при температуре 37 °C по сравнению с составом человеческого инсулина, не содержащим сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер снижает агрегацию инсулина в составе при хранении при температуре 50 °C по сравнению с составом человеческого инсулина, не содержащим сополимер. Как описано в Примере 4, при тестировании на выдерживание в жестких условиях в стандартной упаковке, HUMULIN[®] R, составленный из сополимера MoNi₂₃%, не агрегировал в течение более 56 дней при постоянном перемешивании при 37 °C и четырех днях постоянного перемешивания при 50 °C, тогда как HUMULIN[®] R, взятый отдельно, агрегировался в течение двух дней при 37 °C и в течение одного дня при 50 °C. Условия стрессового выдерживания, использованные в исследованиях, описанных в данном документе, предназначены для имитации типовых условий хранения и транспортировки. Даже в жарком климате с ограниченной инфраструктурой холодовой цепи маловероятно, что транспортные контейнеры будут оставаться при температуре 50 °C при постоянном перемешивании без перерыва более 24 часов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер увеличивает время до агрегации белкового состава по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 35 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 45 раз или по меньшей мере в 50 раз при хранении при температуре 37 °C по сравнению с белковым составом, не содержащим сополимер. Время до агрегации можно оценить любым известным способом, включая, например, анализ пропускания. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер увеличивает время до агрегации белкового состава по меньшей мере в 10 раз при хранении при 37 °C по сравнению с белковым составом, не содержащим сополимер. В некоторых вариантах осуществления

[illegible]

[illegible]

некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер увеличивает время до агрегации инсулинового состава по меньшей мере в 20 раз при хранении при 50 °C, как определено с помощью анализа пропускания, по сравнению с составом человеческого инсулина, который не содержит сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер увеличивает время до агрегации инсулинового состава по меньшей мере в 30 раз при хранении при 50 °C, как определено с помощью анализа пропускания, по сравнению с составом человеческого инсулина, который не содержит сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер увеличивает время до агрегации инсулинового состава по меньшей мере в 40 раз при хранении при 50 °C, как определено с помощью анализа пропускания, по сравнению с составом человеческого инсулина, который не содержит сополимер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер увеличивает время до агрегации инсулинового состава по меньшей мере в 50 раз при хранении при 50 °C, как определено с помощью анализа пропускания, по сравнению с составом человеческого инсулина, который не содержит сополимер.

Повышенная стабильность, наблюдаемая для HUMULIN[®] R, составленного с сополимером MoNi_{23%}, по сравнению с HUMULIN[®] R, взятым отдельно, позволяет предположить, что сополимер MoNi_{23%} является пригодным для стабилизации инсулина в различных условиях перемешивания, когда межфазный оборот может быть выше (например, горизонтальное перемешивание). Условия, оцененные в Примере 4 данного описания, представляют собой экстремальные условия воздействия во время перевозки в неизолированных контейнерах или грузовиках в самом жарком климате в мире, когда транспортировка может занять несколько недель, прежде чем препарат будет доставлен пациентам.

В дополнение к рефрижераторной транспортировке на ранних этапах холодовой цепи, поддержание надлежащих условий транспортировки и хранения во время местного распределения и после того, как препараты попадут в руки пациентов, представляет собой проблему во многих частях мира. Как описано в данном документе, добавление сополимеров на основе полиакриламида может сохранить целостность белковой композиции даже во время серьезных прерываний холодовой цепи. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения это позволяет снизить требования холодовой цепи к транспортировке и хранению белка, которые трудно поддерживать в условиях ограниченных ресурсов. Как описано в данном документе, сополимеры на основе полиакриламида в качестве добавок к составам могут повышать устойчивость к холодовой цепи, тем самым расширяя глобальный доступ к критически важным

лекарственным средствам и вакцинам. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения добавление сополимера поддерживает биологическую активность белкового состава *in vitro* в течение по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев или по меньшей мере 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения добавление сополимера поддерживает биологическую активность белкового состава *in vitro* в течение по меньшей мере 1 месяца. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения добавление сополимера поддерживает биологическую активность белкового состава *in vitro* в течение по меньшей мере 2 месяцев. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения добавление сополимера поддерживает биологическую активность белкового состава *in vitro* в течение по меньшей мере 3 месяцев. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой инсулин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой гормон. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой вакцину.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимер, присутствующий в составе с белком, не изменяет фармакокинетические (PK) или фармакодинамические (PD) свойства активных ингредиентов в составе.

Способы применения сополимерных композиций

В данном изобретении предлагаются способы применения композиций и совместных составов, описанных в данном документе, которые содержат сополимер на основе полиакриламида, содержащий водорастворимый мономер-носитель и функциональный мономер-допант.

В данном изобретении предлагаются способы контроля уровня глюкозы в крови у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения повышенных уровней глюкозы в крови у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения повышенный уровень глюкозы в крови ассоциирован с дефицитом инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения повышенный уровень глюкозы в крови ассоциирован с приемом пищи (например, повышается во время еды). Например, предлагается способ компенсации повышения уровня глюкозы, которое может сопровождать прием макронутриентов, повышающих уровень глюкозы, таких как углеводы (например, прием инсулина во время приема пищи). В некоторых вариантах

осуществления данного изобретения контроль уровня глюкозы в крови включает снижение уровня глюкозы у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения контроль уровня глюкозы в крови включает регулирование уровня глюкозы в крови у субъекта, у которого диагностирован диабет 1 типа или 2 типа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения контроль уровня глюкозы в крови включает снижение уровня глюкозы во время еды. В контексте данного документа термин «дефицит инсулина» относится к сниженным уровням инсулина и/или сниженной чувствительности к инсулину по отношению к метаболическим потребностям. Субъект с дефицитом инсулина включает, помимо прочего, субъекта с диабетом, включая, помимо прочего, диабет 1 типа, диабет 1,5 типа, диабет 2 типа, гестационным сахарным диабетом и диабетом после панкреатэктомии, субъекта с гипергликемией и субъекта с транзиторной гипергликемией, такой как транзиторная гипергликемия от стресса у субъекта, не страдающего диабетом, например, во время госпитализации. У людей нормальным считается уровень сахара в крови менее 100 мг/дл после голодания в течение не менее восьми часов и менее 140 мг/дл через два часа после еды. Субъект-человек с нормальным уровнем сахара в крови, описанным выше, считается не страдающим диабетом. Способы по данному изобретению включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества композиции по данному изобретению, содержащей сополимер на основе полиакриламида и инсулин или его аналог. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическую композицию вводят с помощью помпы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения помпа представляет собой инфузионную помпу. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композицию вводят через систему искусственной поджелудочной железы с замкнутым циклом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композицию вводят с помощью автоматизированной системы доставки инсулина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения повышенный уровень глюкозы ассоциирован с дефицитом инсулина у субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения у субъекта был диагностирован диабет 1 типа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения у субъекта был диагностирован диабет 2 типа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект не страдает диабетом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект перенес травму, операцию или и то, и другое.

Также предлагается способ повышения стабильности состава, содержащего биологическую молекулу или носитель на основе липидов. В соответствии с вариантами

осуществления данного изобретения сополимеры, описанные в данном документе, могут быть добавлены для повышения стабильности составов, содержащих пептиды, белки и их конъюгаты, нуклеиновые кислоты и олигонуклеотиды, липосомы, полимеросомы, мицеллы и липидные наночастицы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ повышения стабильности белкового состава. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ повышения термостабильности состава, содержащего биологическую молекулу или носитель на основе липидов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ повышения термостабильности белкового состава. Также предлагается способ снижения скорости агрегации биологической молекулы или носителя на основе липидов в водной композиции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения молекула представляет собой молекулу, которая имеет тенденцию к агрегации в водной среде. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный белок представляет собой антитело или его фрагменты, цитокин, хемокин, гормон, вакцинный антиген, раковый антиген, адъювант и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные способы включают добавление от около 0,001 мас. % до около 5 мас. % сополимера на основе полиакриламида по данному изобретению в состав, содержащий биологическую молекулу или носитель на основе липидов, например, добавление от около 0,001 мас. % до около 4 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 3 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 2 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 1 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 0,5 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 0,4 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 0,3 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 0,2 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 0,1 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 0,05 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 0,02 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 0,01 мас. %, от около 0,001 мас. % до около 0,005 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 5 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 4 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 3 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 2 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 1 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 0,5 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 0,4 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 0,3 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 0,2 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 0,1 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 0,05 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 0,02 мас. %, от около 0,005 мас. % до около 0,01 мас. %, от около 0,01 мас. % до около 5 мас. %, от около 0,01 мас. % до около 4 мас. %, от около 0,01 мас. % до около 3 мас. %, от около 0,01 мас. % до около 2 мас. %, от около 0,01 мас. % до около 1 мас. %, от около 0,01 мас. % до около 0,5 мас. %, от около 0,01 мас. % до около 0,4 мас. %, от около 0,01 мас. % до около 0,3 мас. %, от около 0,01

изобретению. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает добавление к составу от около 0,001 мас. % до около 1 мас. % сополимера на основе полиакриламида по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный состав содержит биологическую молекулу. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный состав содержит белок. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный состав содержит носитель на липидной основе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения носитель на липидной основе включает липосому, липидную наночастицу, полимеросому или мицеллу.

Другие области применения сополимеров на основе полиакриламида

Сополимеры на основе полиакриламида по данному изобретению можно применять в любой композиции или составе, где применяется поверхностно-активное вещество. Например, сополимеры по данному изобретению можно применять в изготовлении следующих продуктов, включая, помимо прочего, косметические продукты, продукты для волос, лосьоны, пищевые продукты, диетические продукты, пигменты и чернила. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры применяют для улучшения текстуры пищи или улучшения вкусовых ощущений. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сополимеры применяют в биофармацевтических композициях для животных или ветеринарии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения наличие сополимера улучшает стабильность состава.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 – Синтез и характеристика библиотеки сополимеров AD/DC

Дизайн исследования: Фармакокинетику состава инсулина лизпро, сверхбыстро всасывающегося инсулина лизпро (UFAL), сравнивали с коммерческим составом инсулина лизпро (HUMALOG[®]). Концентрации глюкозы в крови и концентрации лизпро в плазме измеряли после подкожного введения либо (i) HUMALOG[®], либо (ii) UFAL с помощью портативного глюкометра или с помощью ELISA на собранных образцах крови. Рандомизация: Для этого исследования использовали 5 свиней, и каждая свинья получала каждый состав один раз. Порядок, в котором давали составы, был случайным. Заслепление: Для анализа фармакокинетических параметров ($t_{50\%}$ подъема, время до пика, $t_{50\%}$ спада) фармакокинетические кривые были закодированы и проанализированы слепым исследователем. Повторности. В этом исследовании использовали 5 свиней, и

каждая свинья выступала в качестве собственного контроля, получая каждый состав (HUMALOG[®] и UFAL) один раз.

Материалы: Растворители N,N-диметилформамид (DMF; класс HPLC, Alfa Aesar, >99,7%), этанол (EtOH; сертифицированный ACS, Acros, >99,5%), ацетон (Sigma, класс HPLC, >99,9%), гексаны (Fisher, сертифицированный ACS, >99,9%), эфир (Sigma, сертифицированный ACS, безводный, >99%) и CDCl₃ (Acros, >99,8%) применяли в том виде, в котором они были получены. Мономеры N,N-диметилакриламид (DMA; Sigma, 99%), N-(3-метоксипропил)акриламид (MPAM; Sigma, 95%), 4-акрилоилморфолин (MORPH; Sigma, >97%), акриламид (AM; Sigma, >99%), и N-гидроксиэтилакриламид (HEAM; Sigma, >97%) перед применением фильтровали с основным оксидом алюминия. Мономеры N-фенилакриламид (PHE; Sigma, 99%), N-трет-бутилакриламид (TBA; Sigma, 97%), N-изопропилакриламид (NIPAM; Sigma, >99%) и N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид (TRI; Sigma, 93%) применяли в том виде, в котором они были получены. (3-акриламидопропил)триметиламмоний (TMA; Sigma, 75%) промывали этилацетатом. 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновую кислоту (AMP; Sigma, 99%) превращали в натриевую соль путем эквимольного смешивания с ацетатом натрия в метаноле и осаждали в ацетоне. Агенты переноса цепи RAFT, 2-циано-2-пропилдодецилтретиокарбонат (2-CPDT; Strem Chemicals, >97%) и 4-(((2-карбоксиэтил)тио)карботиоил)тио)-4-цианопентановую кислоту (BM1433; Boron Molecular, >95%), применяли в том виде, в котором они были получены. Инициатор 2,2'-азобис(2-метилпропионитрил) (AIBN; Sigma, >98%) перекристаллизовывали из метанола (MeOH; Fisher, класс HPLC, >99,9%) и сушили в вакууме перед применением. Инициатор, 4,4-азобис(4-циановалериановая кислоту) (ACVA; Sigma, >98%), применяли в том виде, в каком он был получен. Агенты для удаления группы Z, лауроилпероксид (LPO; Sigma, 97%) и перекись водорода (H₂O₂; Sigma, 30%), применяли в том виде, в котором они были получены.

Синтез первой библиотеки сополимеров с помощью автоматизированного параллельного синтеза: Сополимеризацию носителей и допантов проводили с помощью RAFT-полимеризации ([Общий мономер]/[CTA] = 50, [CTA]/[AIBN] = 0,2). Мономеры-носители MPAM, MORPH и DMA, сополимеризованные с мономерами-допантами AMP, TMA, NIP, TBA или PHE, полимеризовали в DMF с применением 2-CPDT в качестве СТА и AIBN в роли инициатора. Мономеры-носители MPAM, MORPH и DMA, сополимеризованные с мономером-допантом TRI, полимеризовали в смеси DMF/вода с применением BM1433 в качестве СТА и ACVA в роли инициатора. Общая молярность винилового мономера поддерживалась на уровне 2,72 М (сополимеризация с MPAM),

2,86 М (сополимеризация с MORPH) и 3,84 М (сополимеризация с DMA), так что гомополимеризация мономера-носителя в DMF происходила бы при постоянной концентрации 40 мас. %. Мономер-носитель HEAM, сополимеризованный с мономерами-допантами AMP, TMA, NIP, TBA или PHE, полимеризовали в смеси DMF/EtOH с применением 2-CPDT в качестве СТА и AIBN в роли инициатора. Мономер-носитель HEAM, сополимеризованный с мономерами-допантами AMP, TMA, NIP, TBA или PHE, полимеризовали в смеси DMF/EtOH/вода с применением BM1433 в качестве СТА и ACVA в роли инициатора. Общая молярность виниловых мономеров поддерживалась на уровне 2,58 М (сополимеризация с HEAM), так что гомополимеризация HEAM в DMF происходила бы при постоянной концентрации 30 мас. %. Мономер-носитель AM, сополимеризованный с мономерами-допантами AMP, TMA, NIP, TBA или PHE, полимеризовали в смеси DMF/вода с применением BM1433 в качестве СТА и ACVA в роли инициатора. Мономер-носитель AM, сополимеризованный с мономером-допантом TRI, полимеризовали в воде с применением BM1433 в качестве СТА и ACVA в роли инициатора. Общая молярность виниловых мономеров поддерживалась на уровне 4,05 М (сополимеризация с AM), так что гомополимеризация HEAM в DMF происходила бы при постоянной концентрации 30 мас. %.

Реакционные смеси готовили путем объединения исходных растворов: (i) носители, (ii) допанты и (iii) СТА и инициатор. Исходными растворами мономеров-носителей были HEAM (555 мг/мл в EtOH), AM (462 мг/мл в воде), MPAM (818 мг/мл в DMF), DMA (без разбавления растворителем) и MORPH (без разбавления растворителем). Исходными растворами мономеров-допантов были TRI (181 мг/мл в воде), PHE (120 мг/мл в DMF), NIP (245 мг/мл в DMF), TBA (122 мг/мл в DMF), AMP (120 мг/мл в DMF) и TMA (124 мг/мл в DMF). Исходные растворы СТА и инициатора готовили таким образом, чтобы $[СТА]/[инициатор] = 5$ для AM (BM1433 при 310 мг/мл в воде), HEAM и MPAM (BM1433 при 198 мг/мл в воде и 2-CPDT при 221 мг/мл в DMF), MORPH (BM1433 при 220 мг/мл в воде и 2-CPDT при 247 мг/мл в DMF) и DMA (BM1433 при 220 мг/мл в воде и 2-CPDT при 332 мг/мл в DMF). Реакционные смеси HEAM, DMA, MPAM и MORPH разбавляли с применением DMF, а реакционные смеси AM разбавляли водой до достижения желаемой концентрации винилового мономера.

Параллельный синтез сополимерных вспомогательных веществ на основе полиакриламида (также называемых вспомогательными веществами AC/DC) проводили на автоматизированном роботе-синтезаторе Chemspeed Swing XL, оснащенном инструментом с 4-игольчатой головкой и реактором iSynth. Реакции проводили в одноразовых реакторных флаконах iSynth объемом 8 мл. Все аспирации и дозирование

растворов реагентов выполняли с помощью инструмента с 4-игольчатой головкой, оснащенного шприцами 2 x 10 мл и 2 x 1 мл, снабженными иглами для прокалывания перегородки, при этом в этом конкретном эксперименте применяли шприцы объемом как 1, так и 10 мл. Все линии растворителя заполняли 60 мл (6 ходов объема шприца) дегазированного DMF. Типовая скорость аспирации и дозирования реагентов составляла 10 мл/мин для обоих шприцев объемом 1 мл. Воздушный зазор 50 мкл и дополнительный объем 50 мкл использовали для шприцев объемом 1 мл, а воздушный зазор 50 мкл и дополнительный объем 100 мкл использовали для шприцев объемом 10 мл во время аспирации с помощью инструмента с 4-игольчатой головкой. Иглы и линии промывали после каждого этапа дозирования с 3 мл внутреннего и внешнего объема прайм-растворителя для шприцев объемом 1 мл и 20 мл внутреннего и внешнего объема прайм-растворителя для шприцев объемом 10 мл. Резервуар с DMF дегазировали путем непрерывного барботирования азотом. Все исходные растворы готовили во флаконах с реагентами, закрытых перегородками, и дегазировали путем барботирования аргоном в течение 15 минут перед переносом в Chemspeed. Атмосфера внутри Chemspeed снижали до <1 % кислорода путем продувки азотом при закрытых выпускных отверстиях. Реакционные флаконы подвергали воздействию потока азота до начала реакции. Рассчитанные аликвоты исходных растворов и растворителя переносили в реакторы с помощью автоматизированной системы обработки жидкостей. После дозирования, реакционные флаконы вручную герметизировали в инертной атмосфере, извлекали из Chemspeed, вручную встряхивали для объединения реагентов и нагревали до 65 °C в печи в течение 24 часов, после чего реакционные флаконы охлаждали до комнатной температуры и выставляли на воздух.

Процедура удаления СТА Z групп из вспомогательных веществ AC/DC, содержащих сополимеры MORPH, DMA, HEAM и MPAM, была адаптирована из литературных источников. Реакционный флакон разбавляли до 6 мл с применением DMF. LPO (2 экв.) и AIBN (20 экв.) добавляли в реакционную смесь, которая была закрыта крышкой с уплотнением из PTFE. Реакционную смесь продували газообразным азотом в течение 10 минут при нагревании при 90 °C и затем нагревали в течение 12 часов при 90 °C. Процедура удаления СТА Z групп из вспомогательных веществ AC/DC, содержащих сополимеры AM, была адаптирована из литературных источников. Реакционный флакон разбавляли до 5 мл водой miliQ. H₂O₂ (20 экв.) добавляли в реакционный флакон, который запечатывали и нагревали до 60 °C в течение 12 часов. Полученные сополимеры выделяли осаждением, как описано ниже.

Вспомогательные вещества AC/DC, синтезированные с носителями AM и HEAM, дважды осаждали из ацетона. Вспомогательные вещества AC/DC, синтезированные с DMA и MORPH, дважды осаждали из диэтилового эфира. Вспомогательные вещества AC/DC, синтезированные с MPAM дважды осаждали из смесей диэтилового эфира и гексана (соотношение 3:1). Усредненную по числу (M_n) и весу (M_w) молекулярную массу и дисперсность для вспомогательных веществ AC/DC, содержащих MORPH, MPAM, DMA и HEAM, определяли с помощью SEC в DM со стандартами поли(этиленгликоля). M_n , M_w и дисперсность вспомогательных веществ AC/DC, содержащих AM, определяли с применением водных растворов SEC-MALLS.

Синтез второй полимерной библиотеки: Типовая процедура синтеза вспомогательного вещества MORPH-NIP AC/DC выглядит следующим образом и почти идентична для всех других комбинаций носителя/допанта, в которых изменяются только выбор и концентрация носителя/допанта. MORPH (645 мг, 4,57 ммоль, 41,5 экв.), NIPAM (105 мг, 0,93 ммоль, 8,5 экв.), 2CPDT (38 мг, 0,11 ммоль, 1 экв.) и AIBN (3,6 мг, 0,02 ммоль, 0,2 экв.) объединяли и разбавляли DMF до общего объема 2,25 мл (концентрация винилового мономера 33,3 мас./об.) в сцинтилляционной пробирке объемом 8 мл, снабженной перегородкой из PTFE. Реакционную смесь барботировали газообразным азотом в течение 10 минут, а затем нагревали в течение 12 часов при 65 °C. Для удаления Z-конца полученного полимера к реакционной смеси добавляли AIBN (360 мг, 2,2 ммоль, 20 экв.) и LPO (88 мг, 0,22 ммоль, 2 экв.), которую затем барботировали газообразным азотом в течение 10 минут и нагревали в течение 12 часов при 90 °C. Удаление Z-группы подтверждалось отношением показателя преломления к интенсивности УФ ($\lambda = 310$ нм) в анализе SEC. Полученные полимеры трижды осаждали из эфира и сушили в вакууме в течение ночи. Полученную композицию и молекулярные массы определяли с помощью ^1H ЯМР-спектроскопии и SEC со стандартами поли(этиленгликоля).

Характеризация молекулярной массы сополимера: M_n , M_w и дисперсность сополимеров с мономерами-носителями HEAM, DMA, MPAM и MORPH определяли с помощью SEC с применением стандартов поли(этиленгликоля) (American Polymer Standards Corporation) после прохождения через две колонки для эксклюзионной хроматографии (Re-solve Mixed Bed Low DVB, внутренний диаметр 7,8 мм, диапазон молекулярных масс 200-600 000 г моль $^{-1}$ (Jordi Labs) в подвижной фазе N,N-диметилформамида (DMF) с 0,1 M LiBr при 35 °C и скорости потока 1,0 мл мин $^{-1}$ (Hасос Dionex Ultimate 3000, дегазатор и автоматический пробоотборник (Thermo Fisher Scientific).

M_n , M_w и дисперсность сополимеров с АМ определяли с помощью SEC-MALLS после прохождения через колонку для эксклюзионной хроматографии (Superose 6 Increase 10/300 GL, 5000-5000000 г моль (GE Healthcare)) в подвижной фазе фосфатно-солевого буфера, содержащего 300 ppm азид натрия. Детекцию проводили с помощью детектора показателя преломления Optilab T-rEX (Wyatt Technology Corporation), работающего на длине волны 658 нм, и детектора светорассеяния TREOS II (Wyatt Technology Corporation), работающего на длине волны 659 нм. Предполагалось, что значение dn/dc для сополимеров АМ составляет 0,185 в этой среде.

Способ определения экспериментальных значений VM мас. %

Обработка вязких мономеров (HEAM, MPAM, MORPH) с помощью Chemspeed привела к получению загрузок мономеров, которые отличались от загрузок целевых мономеров для выбранных сополимеризаций во время синтеза первоначальной библиотеки сополимеров AC/DC. Экспериментальные массовые проценты были аппроксимированы из пиковых молекулярных масс (M_p) следов SEC. Поскольку воздействию подвергались только вязкие мономеры, изменения M_p возникали из-за недостаточного добавления мономера-носителя (за исключением небольших изменений в проникающем объеме при различных массовых процентах мономера-допанта по сравнению с носителем). Таким образом, для расчета экспериментальных массовых процентов, для данной пары носитель/допант определено значение $M_{p,max}$.

Результаты

Высокопроизводительный синтез полиакриламидной библиотеки: Библиотеку вспомогательных веществ AC/DC синтезировали комбинаторно путем статистической сополимеризации водорастворимых мономеров-носителей и функциональных мономеров-допантов (Фиг. 2). Мономеры-носители были преобладающими видами и отвечали как за поддержание растворимости, так и за обеспечение инертного барьера для предотвращения взаимодействий «инсулин-инсулин». Функциональные допанты сополимеризовались при более низких массовых процентах и статистически включались в полученный сополимер. Эти допанты выбирали так, чтобы стимулировать либо взаимодействие «полимер-граница раздела», либо взаимодействие «полимер-инсулин». Библиотека нацелена на степень полимеризации (DP) 50 для сополимеров, что приводит к молекулярной массе, близкой к инсулину, и значительно ниже порога клубочковой фильтрации для синтетических полимеров.

Экспериментальную степень полимеризации (DP) мономера-носителя аппроксимировали с помощью уравнения (S1). Это значение использовали для аппроксимации экспериментальных массовых процентов (мас. %). Результаты,

рассчитанные с помощью этого способа, были подтверждены ^1H ЯМР спектроскопией для сополимеризации MORPH (носитель) и PHE (допант), как продемонстрировано на Фиг. 3. Результаты этого сравнения представлены в Таблице 1. Экспериментальные значения массового процента мономера-носителя и функционального мономера-допанта для каждого сополимера были определены с помощью ^1H ЯМР и SEC и обобщены в Таблице 2.

$$DP_{\text{carrier,experimental}} = \frac{M_p}{M_{p,\text{max}}} * DP_{\text{carrier,target}} \quad (\text{S1})$$

Таблица 1. Валидация измерения SEC, мас. %, с помощью ^1H ЯМР-спектроскопии

Носитель	мас. %	Допант	мас. %	мас. % ^a	мас. % ^b	M _p
	(Целевой)		(Целевой)	(Экспериментальный, ЯМР)	(Экспериментальный, M _p)	
MORPH	96,7	PHE	3,3	4,5	3,6	2900
MORPH	93,3	PHE	6,7	11,7	10,7	1850
MORPH	90	PHE	10	11,3	10	3100

^a Экспериментальный мас. %, рассчитанный из постосажденного ^1H ЯМР ($\delta = 3,3\text{-}3,7, 8\text{H}$).

^b Экспериментальный мас. %, рассчитанный по уравнению 1 с использованием значений M_p (пиковая молекулярная масса), определенных с помощью SEC

Таблица 2. Характеризация SEC и MALS, а также анализ полимеров, синтезированных в первоначальной библиотеке AC/DC

Носитель	мас. %	мас. %	Допант	мас. %	мас. %	M _n ^a	M _w ^a	Đ ^a
	(Целевой)	(Экспериментальный)	т	(Целевой)	(Экспериментальный)	(Да)	(Да)	
DMA	100	-		0	-	2700	3000	1,1
DMA	93,34	-	NIP	6,66	-	2900	3500	1,2
DMA	86,67	-	NIP	13,33	-	3000	3500	1,15
DMA	80	-	NIP	20	-	3000	3400	1,14
DMA	96,67	-	PHE	3,33	-	2800	3200	1,14
DMA	93,34	-	PHE	6,66	-	3000	3500	1,17
DMA	90	-	PHE	10	-	3400	3900	1,15
DMA	96,67	-	AMP	3,33	-	3400	4100	1,22
DMA	93,34	-	AMP	6,66	-	3700	4400	1,2
DMA	90	-	AMP	10	-	3500	4100	1,16
DMA	96,67	-	TMA	3,33	-	3700	4300	1,15
DMA	93,34	-	TMA	6,66	-	3800	4600	1,2

Носи- тель	мас. %	мас. %	Допан т	мас. %	мас. %	M _n ^a	M _w ^a	Đ ^a
	(Целе- вой)	(Эксперименталь- ный)		(Целе- вой)	(Эксперименталь- ный)	(Да)	(Да)	
DMA	90	-	TMA	10	-	3800	4500	1,19
DMA	96,67	-	TBA	3,33	-	2900	3500	1,2
DMA	93,34	-	TBA	6,66	-	3000	3600	1,2
DMA	90	-	TBA	10	-	3100	3600	1,17
DMA	95	-	TRI	5	-	2900	3500	1,2
DMA	90	-	TRI	10	-	3500	4100	1,17
DMA	85	-	TRI	15	-	3200	3900	1,23
MORPH	100	-		0	-	2300	2300	1,12
MORPH	93,34	90,2	NIP	6,66	9,8	1600	1800	1,12
MORPH	86,67	86,7	NIP	13,33	13,3	2300	2600	1,14
MORPH	80	78,7	NIP	20	21,3	2200	2500	1,13
MORPH	96,67	96,4	PHE	3,33	3,6	2500	2800	1,1
MORPH	93,34	89,3	PHE	6,66	10,7	1700	2000	1,16
MORPH	90	90	PHE	10	10	2700	3200	1,17
MORPH	96,67	95,6	AMP	3,33	4,4	2900	3300	1,14
MORPH	93,34	91,8	AMP	6,66	8,2	3000	3500	1,16
MORPH	90	90	AMP	10	10	3600	4200	1,17
MORPH	96,67	н/д	TMA	3,33	н/д	н/д	н/д	н/д
MORPH	93,34	78,2	TMA	6,66	21,8	3700	4400	1,2
MORPH	90	90	TMA	10	10	1700	1900	1,1
MORPH	96,67	94,5	TBA	3,33	5,5	2400	2900	1,2
MORPH	93,34	92,8	TBA	6,66	7,2	2700	3300	1,2
MORPH	90	90	TBA	10	10	2900	3300	1,14
MORPH	95	92,7	TRI	5	7,3	2200	2500	1,14
MORPH	90	90	TRI	10	10	3100	3900	1,25
MORPH	85	84,1	TRI	15	15,9	2900	3500	1,22
HEAM	100	-		0	-	4900	5500	1,13
HEAM	93,34	93	NIP	6,66	7	5300	6000	1,14
HEAM	86,67	86,7	NIP	13,33	13,3	5600	6300	1,13
HEAM	80	79,2	NIP	20	20,8	5400	6000	1,12
HEAM	96,67	96,7	PHE	3,33	3,3	5800	6600	1,14
HEAM	93,34	93	PHE	6,66	7	5500	6300	1,13
HEAM	90	89,4	PHE	10	10,6	5200	6100	1,16
HEAM	96,67	96,2	AMP	3,33	3,8	4900	5600	1,15
HEAM	93,34	93,3	AMP	6,66	6,7	5800	6600	1,12
HEAM	90	87,8	AMP	10	12,2	4800	5500	1,14
HEAM	96,67	96,2	TMA	3,33	3,8	5100	5900	1,15

Носи- тель	мас. %	мас. %	Допан т	мас. %	мас. %	M _n ^a	M _w ^a	Đ ^a
	(Целе- вой)	(Эксперименталь- ный)		(Целе- вой)	(Эксперименталь- ный)	(Да)	(Да)	
НЕАМ	93,34	93,3	ТМА	6,66	6,7	5500	6500	1,17
НЕАМ	90	86	ТМА	10	14	3900	4500	1,15
НЕАМ	96,67	96,6	ТВА	3,33	3,4	5300	6000	1,13
НЕАМ	93,34	93,3	ТВА	6,66	6,7	5300	6100	1,14
НЕАМ	90	88,6	ТВА	10	11,4	4700	5300	1,13
НЕАМ	95	95	TRI	5	5	5100	6000	1,17
НЕАМ	90	89,2	TRI	10	10,8	4600	5400	1,18
НЕАМ	85	84,3	TRI	15	15,7	4600	5400	1,18
МРАМ	100	-		0	-	3600	4000	1,13
МРАМ	93,34	93,3	NIP	6,66	6,7	4600	5100	1,12
МРАМ	86,67	84,4	NIP	13,33	15,6	3800	4300	1,14
МРАМ	80	72,5	NIP	20	27,5	3000	3300	1,12
МРАМ	96,67	96,5	PHE	3,33	3,5	5000	5300	1,11
МРАМ	93,34	93,3	PHE	6,66	6,7	5000	5700	1,14
МРАМ	90	86,7	PHE	10	13,3	3900	4400	1,13
МРАМ	96,67	96,3	AMP	3,33	3,7	4500	5100	1,14
МРАМ	93,34	93,3	AMP	6,66	6,7	4900	5500	1,13
МРАМ	90	87,9	AMP	10	12,1	4000	4500	1,13
МРАМ	96,67	96,7	ТМА	3,33	3,3	4600	5200	1,14
МРАМ	93,34	91,9	ТМА	6,66	8,1	3600	4100	1,13
МРАМ	90	89,8	ТМА	10	10,2	4400	5000	1,13
МРАМ	96,67	96,6	ТВА	3,33	3,4	4500	5100	1,13
МРАМ	93,34	93,3	ТВА	6,66	6,7	4800	5400	1,13
МРАМ	90	89,2	ТВА	10	10,8	4200	4700	1,12
МРАМ	95	93,9	TRI	5	6,1	4900	5700	1,17
МРАМ	90	90	TRI	10	10	5800	6800	1,17
МРАМ	85	80,3	TRI	15	19,7	4300	4800	1,13
АМ	100	-		0	-	4800	5100	1,06
АМ	93,34	-	NIP	6,66	-	4400	4600	1,05
АМ	86,67	-	NIP	13,33	-	4500	4800	1,05
АМ	80	-	NIP	20	-	4800	5100	1,07
АМ	96,67	-	PHE	3,33	-	4300	4500	1,04
АМ	93,34	-	PHE	6,66	-	4600	4700	1,04
АМ	90	-	PHE	10	-	4500	4600	1,03
АМ	96,67	-	AMP	3,33	-	3700	4000	1,09
АМ	93,34	-	AMP	6,66	-	4000	4300	1,07
АМ	90	-	AMP	10	-	4100	4300	1,05

Носитель	мас. %	мас. %	Допант	мас. %	мас. %	M_n^a	M_w^a	$\bar{D}^a$
	(Целевой)	(Экспериментальный)		(Целевой)	(Экспериментальный)	(Да)	(Да)	
АМ	96,67	-	ТМА	3,33	-	4300	4500	1,04
АМ	93,34	-	ТМА	6,66	-	-	не	элюировал
АМ	90	-	ТМА	10	-	4700	4900	1,06
АМ	96,67	-	ТВА	3,33	-	4300	4400	1,04
АМ	93,34	-	ТВА	6,66	-	4100	4300	1,03
АМ	90	-	ТВА	10	-	4400	4600	1,05
АМ	95	-	ТРИ	5	-	4300	4500	1,05
АМ	90	-	ТРИ	10	-	4600	4800	1,04
АМ	85	-	ТРИ	15	-	4600	4900	1,06

^a M_n (усредненная по числу молекулярная масса), M_w (усредненная по весу молекулярная масса), и $\bar{D}$ (дисперсия), определенные с помощью эксклюзионной хроматографии в DMF, калиброванной с применением полиэтиленгликолевых стандартов для HEAM, MPAM, MORPH и DMA. M_n и M_w , определенные с помощью водной SEC-MALS для АМ с использованием значения dn/dc , равного 0,185.

^b Экспериментальные значения мас. %, определенные с помощью SEC по уравнению S1.

Библиотека была создана путем параллельного синтеза с помощью Chemspeed Swing XL Auto Synthesizer, робота для работы с жидкостями в инертной среде. RAFT-полимеризация была применена потому, что она обеспечивает точную стехиометрию сополимеризации, низкую дисперсность и контролируемую молекулярную массу для широкого спектра мономеров. Производные полиакриламида применяли как в качестве носителей, так и в качестве допантов благодаря широкому спектру и доступности коммерчески доступных водорастворимых мономеров (носители) и функциональных мономеров (допанты) и стабильности полимеров. В то время как мономерные производные акриламида часто проявляют острую токсичность, производные полиакриламида, если они правильно очищены от своих мономерных предшественников, демонстрируют высокую степень биосовместимости. Более того, коэффициенты реакционной способности между различными акриламидными мономерами близки к 1, что позволяет получать сополимеры с небольшим или нулевым градиентом состава допанта. Мономеры-носители включали акриламид (АМ), гидроксиэтилакриламид (HEAM), диметилакриламид (DMA), акрилоилморфолин (MORPH) и метоксипропилакриламид (MPAM), поскольку они являются неионными и растворимыми в воде (в порядке возрастания гидрофобности). Мономеры-допанты включали: трис(гидроксиметил)метилакриламид (ТРИ), акриламидометилпропансульфоновую

кислоту (AMP), акриламидопропилтриметиламмонийхлорид (TMA), n-изопропилакриламид (NIP), третбутилакриламид (TBA) и фенилакриламид (PHE). Эти функциональные допанты могут быть дополнительно классифицированы на мономеры с водородной связью (TRI), ионные (AMP, TMA), гидрофобные (NIP, TBA) и ароматические (PHE) мономеры на основе их химического состава.

Библиотеку из 90 вспомогательных веществ AC/DC синтезировали путем комбинаторной сополимеризации мономеров носителя и допанта при каждой из трех различных композиций для данной пары носитель-допант. NIP сополимеризовали в количестве 6,7, 13,3 или 20 мас. %. TRI сополимеризовали в количестве 5, 10 или 15 мас. %. AMP, TMA, TBA и PHE сополимеризовали в количестве 3,3, 6,7 или 10 мас. %. Эти значения были выбраны для максимизации загрузки допанта при получении функциональных сополимеров с нижней критической температурой раствора (LCST) выше 37 °C, чтобы обеспечить их растворимость при всех соответствующих температурах. Полимеры были охарактеризованы с помощью ЯМР и SEC (Таблица 2, Фиг. 3 и Фиг. 4). Хотя RAFT-полимеризация обладает многими преимуществами для синтеза, она обеспечивает получение полимеров с реакционноспособным тритиокарбонатным агентом передачи цепи (CTA), присоединенным на Z-конце. Соответственно, мотив CTA в синтезированных вспомогательных веществах AC/DC был удален перед использованием сополимеров в последующих анализах для обеспечения их инертности.

Пример 2 - Состав сверхбыстро всасывающегося инсулина лизпро (UFAL) и оценки *in vitro* и *in vivo*

Способ определения жизнеспособности клеток млекопитающих: Фибробласты мышцы NIH/3T3 от ATCC культивировали в DMEM, содержащей 10 мас. % FBS и 1 мас. % пенициллина-стрептомицина в инкубаторе при 37 °C, 5% CO₂. 3T3 на пассаже 9 высевали по 5000 клеток на лунку в 96-луночный планшет и культивировали в течение 24 ч в 100 мкл среды. Затем среду заменяли на 100 мкл среды, содержащей MORPH-NIP_{23%} в различных концентрациях, и инкубировали в течение 24 ч. После этого полимерсодержащую среду отсасывали из каждой лунки. Затем каждую лунку промывали 100 мкл PBS и добавляли 100 мкл новой среды и 10 мкл реагента WST. После 3 часов инкубации в растворе WST считывали данные абсорбции с помощью планшет-ридера ($\lambda = 450$ нм). Все эксперименты проводили в трех повторностях. Жизнеспособность клеток рассчитывали по уравнению S2, где A_{well} , A_{control} и A_{WST} – измерения абсорбции для клеток, культивированных с полимером, клеток, культивированных без полимера, и WST в среде.

$$\text{Жизнеспособность} = \frac{A_{\text{well}} - A_{\text{WST}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{WST}}} \quad (\text{S2})$$

Анализ клеточной активности инсулина in vitro: Мышечные миобласты мыши C2C12 (ATCC CRL-1772) культивировали для подтверждения функциональной активности инсулина через путь фосфорилирования АКТ с применением наборов AlphaLISA SureFire Ultra (Perkin-Elmer) для обнаружения фосфорилированного АКТ 1/2/3 (pS473) по сравнению с общим Akt1. Перед использованием клеток убеждались в отсутствии контаминации их микоплазмой. В модифицированную по Дульбекко среду Игла (DMEM) с 4,5 г/л D-глюкозы, L-глутамина и 110 мг/л пирувата натрия (Gibco) добавляли 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS) и 5% пенициллин-стрептомицин для получения полной культуральной среды. Клетки высевали с плотностью 25000 клеток/лунку в объеме 200 мкл/лунку в 96-луночный планшет для тканевых культур и выращивали в течение 24 часов. Перед стимуляцией инсулином клетки дважды промывали 200 мкл DMEM, не содержащей добавок, и выдерживали в течение ночи в 100 мкл DMEM, не содержащей добавок. Затем среду удаляли и клетки стимулировали 100 мкл инсулина: (i) HUMALOG[®], (ii) UFAL, (iii) выдержанный HUMALOG[®] (12 ч встряхивания при 37 °C), (iv) выдержанный UFAL (12 ч встряхивании при 37°C), разбавляли с применением DMEM, не содержащей добавок, до желаемой концентрации в течение 30 мин при инкубации при 37 °C. Клетки дважды промывали 100 мкл холодного 1X трис-буферного солевого раствора перед добавлением 100 мкл лизирующего буфера в каждую лунку и встряхиванием в течение по меньшей мере 10 минут при комнатной температуре для полного лизиса клеток. 30 мкл лизата переносили в 96-луночный белый планшет с половинной площадью лунок для каждого анализа. Анализы выполняли в соответствии с протоколом производителя. Планшеты инкубировали при комнатной температуре и считывали через 18-20 часов после добавления реагентов для окончательного анализа с помощью планшет-ридера Tecan Infinite M1000 PRO. Результаты наносили на график как отношение [pАКТ]/[АКТ] для каждого образца (n = 3 клеточных репликата), а регрессию EC₅₀ [log(агонист) относительно ответа (три параметра)] получали с помощью GraphPad Prism 8.

Стабильность инсулина in vitro: Способы анализа агрегации рекомбинантного человеческого инсулина были адаптированы из Webber et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 14189–14194 (2016)). Вкратце, образцы состава (3,4 мг/мл) высевали по 150 мкл на лунку (n = 3/группа) в прозрачный 96-луночный планшет и запечатывали оптически прозрачным и термостабильным уплотнением (VWR). Планшет немедленно помещали в планшет-ридер и инкубировали при непрерывном встряхивании при 37 °C. Данные абсорбции снимали каждые 10 минут при 540 нм в течение 100 ч (микропланшет-ридер

BioTek Syner-gyH1). Агрегация инсулина приводила к рассеиванию света, что обуславливало увеличение измеряемой абсорбции. Время до агрегации (t_A) определяли как время, в течение которого наблюдалось увеличение абсорбции более чем на 10% по сравнению с абсорбцией в нулевой момент времени. Через 100 ч планшет удаляли из планшет-ридера и переносили на шейкер-инкубатор для планшетов, где подвергали длительному стрессовому выдерживанию. Абсорбцию измеряли периодически в течение 30 дней.

Для первичного высокопроизводительного скрининга стабильности, рекомбинантный человеческий инсулин (Gibco) готовили в фосфатно-солевом буфере (0,9 мас. % NaCl), а вспомогательные вещества AC/DC добавляли в концентрациях 1 мг/мл или 10 мг/мл к составу рекомбинантного инсулина для получения конечной концентрации инсулина 3,4 мг/мл. Каждый планшет содержал рекомбинантный контрольный инсулин без добавления полимера.

Для вторичного скрининга стабильности с составами UFAL контрольные группы включали: (i) коммерческий HUMALOG[®] (Eli Lilly), (ii) безцинковый лизпро, содержащий фосфатный буфер, глицерин (2,6 мас.%) и феноксизтанол (0,85 мас. %). Цинк (II) был удален из коммерческих составов инсулина за счет конкурентного связывания путем добавления этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), которая демонстрирует константу связывания диссоциации, приближающуюся к аттомолярным концентрациям ($K_D \sim 10^{-18}$ М). EDTA добавляли к составам (1 экв. по отношению к цинку) для связывания цинка с составом. После секвестрации цинка, для удаления комплексов цинк/EDTA и других вспомогательных веществ состава использовали гравитационные колонки PD MidiTrap G-10 (GEHealthcare). Лизпро концентрировали с помощью центрифужных установок Amino Ultra 3K (Millipore), а затем пересоставляли до концентрации 100 ЕД/мл с фосфатным буфером (10 mM), глицерином (2,6 мас. %), феноксизтанолом (0,85 мас. %) и вспомогательным веществом AC/DC (0,01 мас. %).

ЯМР DOSY: Спектры ^1H 2D DOSY записывали при концентрации инсулина лизпро 3,4 мг/мл с 40 мас. % D₂O для состава UFAL, включающего фосфатный буфер, глицерин (2,6 мас. %), феноксизтанол (0,85 мас. %) и сополимер MORPH-NIP_{23%} (0,1 мас. %). Для получения данных использовали ЯМР-прибор Varian Inova 600 МГц. Напряженность магнитного поля составляла от 2 до 57 G см⁻¹. Время DOSY и импульс градиента устанавливали на 132 мс (Δ) и 3 мс (δ) соответственно. Все данные ЯМР обрабатывали с помощью программы MestReNova 11.0.4.

Стрептозотоцин-индуцированная модель диабета у крыс: Для экспериментов использовали самцов крыс Sprague Dawley (Charles River). Исследования на животных

проводились в соответствии с рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных; все протоколы были одобрены Стэнфордским институциональным комитетом по уходу и использованию животных. Протокол, используемый для индукции STZ, адаптирован из протокола Wu и Huan (*Curr. Protoc. Pharmacol.* 2008) 5:Unit 5.47). Вкратце, самцов крыс Sprague Dawley весом 160-230 г (8-10 недель) взвешивали и не кормили 6-8 часов до получения STZ. STZ разбавляли до 10 мг/мл в буфере цитрата натрия непосредственно перед инъекцией. Раствор STZ вводили внутривентально каждой крысе в дозе 65 мг/кг. Крысы получали воду, содержащую 10% сахарозы, в течение 24 часов после инъекции STZ. Уровень глюкозы в крови крыс анализировали на предмет гипергликемии ежедневно после введения STZ посредством забора крови из хвостовой вены и использования портативного глюкометра Bayer Contour Next (Bayer). Диабет определяли как наличие 3 подряд измерений глюкозы в крови >400 мг/дл у крыс не натощак.

Фармакодинамика in vivo у крыс с диабетом: Крысы с диабетом не получали пищи в течение 4-6 часов. Крысам вводили подкожно (i) HUMALOG[®], (ii) UFAL, (iii) выдержанный HUMALOG[®] (12 часов встряхивания при 37 °C), (iv) выдержанный UFAL (12 часов встряхивания при 37 °C) в дозе 1,5 Ед/кг. Для приготовления выдержанных образцов 150 мкл каждого состава помещали в 96-луночный планшет при постоянном перемешивании. Для этого исследования использовали 16 крыс, которые были случайным образом разделены на две группы (i) HUMALOG[®] и (ii) UFAL. В этих группах каждая крыса получала по одной дозе свежей и выдержанной версии состава в отдельные экспериментальные дни. Порядок, в котором давали составы, был случайным. Инсулины разбавляли в 10 раз в фосфатно-солевом буфере перед инъекцией, чтобы можно было точно дозировать небольшие объемы. Перед инъекцией измеряли исходный уровень глюкозы в крови. После инъекции кровь брали каждые 30 минут в течение 4 часов. Глюкозу крови измеряли с помощью портативного глюкометра (Bayer Contour Next).

Биосовместимость у крыс с диабетом: Крысам с диабетом вводили либо (i) HUMALOG[®] (n=5), либо (ii) UFAL (n=5) в течение 7 дней подряд. Составы вводили подкожно в дозе 1,5 ЕД/кг. Кровь для биохимического анализа крови собирали в День 0 и в День 7. Биохимический анализ проводили на анализаторе Siemens Dimension Xpand. Медицинский технолог выполнял все анализы, включая разведения и повторные тесты, как указано, и рассматривал все данные.

Исследования фармакокинетики и фармакокинетики in vivo сверхбыстро абсорбирующегося инсулина лизпро (UFAL) в модели свиньи:

Дизайн исследования: Фармакокинетику состава инсулина лизпро, сверхбыстро всасывающегося инсулина лизпро (UFAL), сравнивали с коммерческим составом инсулина лизпро (HUMALOG®). Концентрации глюкозы в крови и концентрации лизпро в плазме измеряли после подкожного введения либо (i) HUMALOG®, либо (ii) UFAL с помощью портативного глюкометра или с помощью ELISA на собранных образцах крови. Рандомизация: Для этого исследования использовали 5 свиней, и каждая свинья получала каждый состав один раз. Порядок, в котором давали составы, был случайным. Заслепление: Для анализа фармакокинетических параметров (t50% подъема, время до пика, t50% спада) фармакокинетические кривые были закодированы и проанализированы слепым исследователем. Повторности. В этом исследовании использовали 5 свиней, и каждая свинья выступала в качестве собственного контроля, получая каждый состав (HUMALOG® и UFAL) один раз.

Индукцированный стрептозотоцином диабет у свиней: В проводимых авторами исследованиях на животных использовались пять самок йоркширских свиней (Pork Power), при этом исследования проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных и Положениями Закона о защите животных. Все протоколы были одобрены Стэнфордским комитетом по уходу и использованию животных. Диабет 1 типа индуцировали у свиней (25-30 кг) с применением стрептозотоцина (STZ) (MedChemExpress). STZ вводили внутривенно в дозе 125 мг/кг и наблюдали за животными в течение 24 часов. Питание и 5% раствор декстрозы давали по мере необходимости для предотвращения гипогликемии. Диабет определяли, когда уровень глюкозы в крови натошак превышал 300 мг/дл.

Фармакокинетика и фармакодинамика in vivo у свиней с диабетом: Пять свиней с диабетом голодали в течение 4-6 часов. Свиньям подкожно вводили по 2-4 ЕД следующих составов: (i) HUMALOG® (100 ЕД/мл, Eli Lilly) или (ii) сверхбыстро всасывающийся инсулин лизпро (UFAL) (100 ЕД/мл лизпро без цинка, 2,6 мас. % глицерина, 0,85 мас. % феноксизанола, 0,01 мас.% MORPH-NIP₂₃%). Дозы определяли на основе индивидуальных значений чувствительности свиней к инсулину с целью снижения уровня глюкозы в крови примерно на 200 мг/дл. Отдельные свиньи получали одинаковую дозу для каждой группы лечения. Свиньи получали каждый состав один раз в отдельные дни, и порядок групп лечения был случайным. Перед инъекцией исходный уровень крови брали из линии внутривенного катетера и измеряли с помощью портативного глюкометра (Bayer Contour Next). После инъекции кровь брали из линии внутривенного катетера каждые 5 минут в течение первых 60 минут, затем каждые 30 минут до 4 часов. Кровь собирали в пробирки для плазмы K₂EDTA (Greiner-Bio One) с целью проведения анализа с помощью

ELISA. Концентрации лизпро в плазме количественно определяли с помощью набора Insulin Lispro ELISA (Mercodia).

Фармакокинетическое моделирование: Фармакокинетическая модель, используемая в этом анализе, была получена из литературных источников. Концентрации инсулина для инъекции (I_{inj}), равновесие в интерстиции (I_{eq}) и плазме (I_p) численно решали с помощью системы дифференциальных уравнений, описанных ниже, как функция времени, с применением SciPy (версия 1.2.1) функции odeint в Python (версия 3.6.8).

$$\frac{d[I]_{inj}}{dt} = -k_1 * I_{inj} \quad (1)$$

$$\frac{d[I]_{eq}}{dt} = k_1 * I_{inj} - k_2 * I_{eq} \quad (2)$$

$$\frac{d[I]_p}{dt} = k_2 * I_{eq} - k_3 * I_p \quad (3)$$

Концентрации устанавливали такими, чтобы в момент времени $t = 0$ весь инсулин присутствовал в I_{inj} . Кинетические константы скорости подбирали для нормализованных фармакокинетических кривых свиней путем минимизации суммы квадратов ошибок (SSE) между сгенерированными, нормализованными концентрациями инсулина в плазме, полученными из модели в экспериментальные моменты времени от 0 до 90 минут, и нормализованными концентрациями инсулина в плазме свиней для UFAL и HUMALOG[®]. Авторы предполагают, что k_2 и k_3 зависят от вида, а k_1 зависит как от вида, так и от состава. При минимизации SSE авторы заметили, что для $k_{1,UFAL,Pig}$ не существует восходящей границы; так, более высокие значения $k_{1,UFAL,Pig}$ приводили к все более незначительному уменьшению SSE для заданных k_2 и k_3 . Соответственно, значение $k_{1,UFAL,Pig}$ затем было установлено на 100 000 мин⁻¹. SSE минимизировали сначала с помощью поиска по сетке с использованием функции SciPy's optimize brute и последующего уточнения констант скорости с помощью функции SciPy's optimize minimize, используя метод L-BFGS-B. Чтобы найти $k_{1,UFAL,Human}$, авторы предлагают следующее соотношение:

$$\frac{k_{1,UFAL,Pig}}{k_{1,Humalog,Pig}} = \frac{k_{1,UFAL,Human}}{k_{1,Humalog,Human}}$$

Значения для $k_{1, HUMALOG[®],Human}$, $k_{2,Human}$ и $k_{3,Human}$ использовали в соответствии слитературными данными.

Статистический анализ: Все результаты выражены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, если не указано иное. Фиг. 10D-10F представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Все статистические анализы проводили в виде общих

линейных моделей (GLM) в JMP Pro, версия 14. Сравнение составов (Фиг. 10D-I и K-M) проводили с использованием смешанной модели повторных измерений с ограниченной максимальной вероятностью (REML). Подходящие преобразования применяли по мере необходимости для соответствия предположениям методов (*т. е.* однородности дисперсии, нормальности ошибки и линейности). Время до 50% пикового подъема, время до пика и время до 50% пикового спада логарифмически преобразовали для анализа с поправкой на неоднородность дисперсии. Свинья была включена в модель в качестве переменной как случайный блокирующий фактор (контроль) для учета различий в ответе отдельных свиней. Статистической значимостью считалось $p < 0,05$. Для Фиг. 10D-I, для учета множественных сравнений применяли апостериорную поправку Бонферрони, а значимость доводили до $\alpha = 0,008$.

Результаты

Высокопроизводительный скрининг вспомогательного вещества, стабилизирующего инсулин: Вспомогательные вещества AC/DC, приготовленные, как описано в Примере 1, оценивали на предмет их потенциала в качестве стабилизирующего вспомогательного вещества для инсулина с помощью анализа стрессового выдерживания на основе абсорбции, в котором дестабилизированные агрегаты инсулина рассеивают свет и увеличивают абсорбцию раствора. Время до агрегации в этих анализах определяется как увеличение абсорбции состава на 10%. Рекомбинантный инсулин готовили в PBS в стандартных концентрациях (100 Ед/мл; 3,4 мг/мл) и тестировали (i) без полимерных вспомогательных веществ, (ii) с плуроником L-61 (наиболее похожий коммерчески доступный полимер как химически, так и физически на полоксамер 171, применяемый в INSUMAN® U400), (iii) с 1 мг/мл вспомогательных веществ AC/DC или (iv) с 10 мг/мл вспомогательных веществ AC/DC. Контрольные образцы рекомбинантного инсулина, не содержащие полимерного вспомогательного вещества, агрегировали за 13 ± 8 часов в этом анализе. Состав с плуроником L-61 (1 мг/мл) пролонгировал агрегацию до 27 ± 2 часов, демонстрируя эффективность коммерческого полимера в качестве вспомогательного вещества для предотвращения агрегации инсулина. Применение водорастворимых гомополимерных вспомогательных веществ-носителей (1 мг/мл) не влияло на стабильность инсулина (Фиг. 5A), демонстрируя, что свободных гидрофильных полимеров недостаточно для предотвращения агрегации инсулина. Этот вывод подтверждается предыдущей работой, демонстрирующей, что другие гидрофильные полимеры, такие как полиэтиленгликоль (PEG), не улучшают стабильность инсулина.

Стабильность инсулина при применении вспомогательных веществ AC/DC сильно зависела от химического состава. Каждое вспомогательное вещество AC/DC составляли с

инсулином, и стабильность тестировали в течение периода до одного месяца (Фиг. 5B-G и Таблица 3). Составы, содержащие вспомогательные вещества AC/DC с химическими составами носителей MPAM и MORPH, продемонстрировали общее максимальное улучшение стабилизации инсулина, особенно в комбинации с допантами NIP, TBA и PHE. Хотя многие комбинации носитель-допант продемонстрировали долгосрочную стабильность при концентрации в составе 1 мас. %, авторы стремились разработать сополимеры, способные стабилизировать инсулин при минимальных концентрациях в составе. Вспомогательные вещества AC/DC, содержащие MPAM-PHE, MPAM-TBA, MPAM-TRI и MORPH-TBA (0,1 мас. %), стабилизировали инсулин в течение более 100 часов стрессового выдерживания. Таким образом, эти составы в 7 раз стабильнее, чем рекомбинантный инсулин, взятый отдельно, и в 3 раза стабильнее, чем составы, содержащие плуроник L-61. Более того, вспомогательные вещества AC/DC, содержащие MPAM-NIP, MPAM-AMP и MORPH-PHE (0,1 мас. %) стабилизировали инсулин в течение 30 дней стрессового выдерживания, после чего анализ был прекращен. Эти составы в 50 раз стабильнее, чем инсулин, взятый отдельно, и в 24 раза стабильнее, чем составы, содержащие плуроник L-61. Эти выбранные носители и допанты являются наиболее гидрофобными среди всех исследованных мономеров, что позволяет предположить, что амфифильные водорастворимые сополимеры наиболее эффективны для предотвращения агрегации инсулина.

Таблица 3: Дни до агрегации для рекомбинантного инсулина, составленного с вспомогательными веществами AC/DC, при двух концентрациях вспомогательных веществ (1 мг/мл и 10 мг/мл)

Концентрация вспомогательных веществ		1 мг/мл			10 мг/мл		
Нагрузка допанта		Низкая	Средняя	Высокая	Низкая	Средняя	Высокая
Носитель	Допант						
DMA	NIP	1,61	1,09	1,05	1,21	0,93	2,13
DMA	PHE	1,41	0,72	1,13	1,86	2,41	3,91
DMA	AMP	0,9	1,49	0,29	1,42	н/т	0,79
DMA	TMA	1,46	1,07	0,15	1,7	н/т	0,52
DMA	TBA	1,13	0,36	0,29	1,5	1,66	1,29
DMA	TRI	1,58	0,25	0,25	1,91	1,46	1,09
MORPH	NIP	4,39	3,25	3,53	4,79	7,14	3,4
MORPH	PHE	3,08	3,85	30	4,82	17,55	30
MORPH	AMP	2,09	2,03	1,33	5,15	2,27	1,59
MORPH	TMA	н/т	0,58	0,37	н/т	0,6	0,71
MORPH	TBA	4,26	3,62	3,63	21,58	9,25	14,91

MORPH	TRI	1,29	0,38	0,22	н/т	н/т	н/т
HEAM	NIP	1,7	1,19	1,79	1,82	3,26	2,59
HEAM	PHE	0,59	0,87	1,97	1,87	11,87	30
HEAM	AMP	2,22	0,47	0,4	4,8	2,01	2,72
HEAM	TMA	12,25	4,99	0,68	3,78	4,01	10,75
HEAM	TBA	0,7	0,56	0,87	1,96	28	23,62
HEAM	TRI	1,07	0,37	0,17	1,34	22,68	1,34
MPAM	NIP	17,98	25,94	30	30	10,93	2,39
MPAM	PHE	27,91	7,89	20,37	11,72	3,61	30
MPAM	AMP	29,32	30	29,32	30	29,32	28,64
MPAM	TMA	22,01	3,51	2,36	21,33	2,35	4,06
MPAM	TBA	15,04	9,55	2,63	18,26	6,35	18,25
MPAM	TRI	4,56	1,55	0,08	н/т	н/т	н/т
AM	NIP	1,81	1,99	1,7	1,74	1,96	1,76
AM	PHE	1,87	1,34	1,43	2,23	3,57	2,24
AM	AMP	0,93	0,89	0,87	1,74	3,5	1,76
AM	TMA	0,85	0,8	0,63	1,45	2,32	4,43
AM	TBA	1,63	1,38	1,49	5,9	3,96	2,49
AM	TRI	0,78	0,85	0,81	1,63	3,91	4,06

н/т означает не тестировали

Стабилизация мономерного инсулина с помощью усовершенствованного скрининга: На основании первичного скрининга стабильности рекомбинантного инсулина, сополимеры, содержащие носители MPAM или MORPH с допантами NIP или PHE, проявили себя как наиболее перспективные кандидаты для стабилизации мономерного инсулина. Предыдущая работа авторской группы продемонстрировала, что равновесие между ассоциативными состояниями инсулина может быть сдвинуто путем изменения вспомогательных веществ в составе, при этом состав, содержащий приблизительно 70% мономеров, может быть получен с составом безцинкового лизпро с глицерином и феноксиэтанолом. Этот состав благоприятствует мономеру инсулина и полностью диссоциирует гексамер инсулина. Репрезентативные SEC-следы преимущественно гексамерного HUMALOG[®] и преимущественно мономерного безцинкового UFAL демонстрируют состояния ассоциации инсулина в препарате (Фиг. 6). Однако мономеры инсулина нестабильны в составе и требуют дополнительных стабилизирующих вспомогательных веществ, чтобы быть жизнеспособными для трансляции. Кроме того, вероятно, будет целесообразно применять наименьшую возможную концентрацию сополимерного вспомогательного вещества, чтобы уменьшить длительное воздействие вспомогательного вещества при частом применении инсулина, характерном для лечения диабета.

Чтобы удовлетворить эту потребность, была синтезирована вторая библиотека вспомогательных веществ AC/DC для оценки дополнительных соотношений носителя и допанта с наиболее эффективными мономерами-кандидатами, разработанными авторами: (i) МРАМ и MORPH в качестве носителей и (ii) NIP и PHE в качестве допантов. Для создания вторичной библиотеки применяли стандартные методы синтеза, при этом указанная библиотека состояла из сополимеров при DP 50 с MORPH или МРАМ в качестве носителей и либо (i) NIP, загруженного в количестве 14, 17, 20, 23 или 26 мас. %, либо (ii) PHE, загруженного в количестве 6, 8, 10, 12 или 14 мас. %, соответственно, по данным спектроскопии SEC и ^1H ЯМР (Фиг. 7, Таблица 4).

Таблица 4. SEC- и ^1H ЯМР-анализ полимеров, синтезированных во время второго скрининга с целью DP 50

Носитель	мас. %	мас. % по ЯМР	Допант	мас. %	мас. % по ЯМР	M_n^a	M_w^a	$\bar{D}^a$
	(Целевой)	(Экспериментальный)		(Целевой)	(Экспериментальный)			
MORPH	94	93,68 ^b	PHE	6	6,32 ^b	2900	3400	1,17
MORPH	92	91,83 ^b	PHE	8	8,17 ^b	3100	3400	1,1
MORPH	90	90,12 ^b	PHE	10	9,88 ^b	3100	3400	1,1
MORPH	88	87,93 ^b	PHE	12	12,07 ^b	3100	3500	1,13
MORPH	86	85,51 ^b	PHE	14	14,49 ^b	3200	3600	1,13
MORPH	86	79,75 ^c	NIP	14	20,25 ^c	2900	3300	1,14
MORPH	83	77,9 ^c	NIP	17	22,10 ^c	3100	3500	1,13
MORPH	80	77,73 ^c	NIP	20	22,27 ^c	3100	3500	1,13
MORPH	77	74,46 ^c	NIP	23	25,54 ^c	3200	3800	1,19
MORPH	74	72,23 ^c	NIP	26	27,77 ^c	3000	3400	1,13
MPAM	94	93,54 ^d	PHE	6	6,46 ^d	4700	5200	1,11
MPAM	92	90,94 ^d	PHE	8	9,06 ^d	5000	5400	1,08
MPAM	90	89,05 ^d	PHE	10	10,95 ^d	5100	5600	1,1
MPAM	88	87,61 ^d	PHE	12	12,39 ^d	4900	5500	1,12
MPAM	86	86,15 ^d	PHE	14	13,85 ^d	5000	5500	1,1
MPAM	86	86,33 ^e	NIP	14	13,67 ^e	4700	5100	1,09
MPAM	83	82,35 ^e	NIP	17	17,65 ^e	4600	5000	1,09
MPAM	80	78,91 ^e	NIP	20	21,09 ^e	4500	4800	1,07
MPAM	77	77,95 ^e	NIP	23	22,05 ^e	4400	4800	1,09
MPAM	74	73,11 ^e	NIP	26	26,89 ^e	4400	4800	1,09

^a M_n (усредненная по числу молекулярная масса), M_w (усредненная по весу молекулярная масса), и $\bar{D}$ (дисперсия), определенные с помощью эксклюзионной хроматографии, калиброванной с применением полиэтиленгликолевых стандартов.

^b Массовые проценты, рассчитанные из постосаженных ЯМР спектров MORPH ($\delta = 3,3-3,7$, 8H) и PHE ($\delta = 7,6$, 2H).

^c Массовые проценты трудно определить из-за перекрывающихся спектров. Массовые проценты, рассчитанные из постосаженных ЯМР спектров путем измерения более разрешенной левой половины пика NIP ($\delta = 4,0$, 0,5 H), удвоения его и вычитания из неразрешенных пиков MORPH и NIP ($\delta = 3,2-4,2$, 7H (MORPH) 1H (NIP)).

^d Массовые проценты, рассчитанные из постосаженных ЯМР спектров MPAM ($\delta = 3,1-3,5$, 7H) и PHE ($\delta = 7,6$, 2H).

^e Массовые проценты, рассчитанные из постосаженных ЯМР спектров MPAM ($\delta = 3,2$, 3H) и NIP ($\delta = 3,8$, 1H).

Используя вспомогательные вещества AC/DC, синтезированные в ходе второго скрининга, готовили составы UFAL с 0,01 мас.% (0,1 мг/мл) сополимерного вспомогательного вещества, и агрегацию инсулина оценивали в стрессовых условиях с помощью того же анализа, что и при первичном скрининге (Таблица 5 в Дополнительном приложении А). HUMALOG[®], коммерческий препарат инсулина лизпро, агрегировался в этих условиях в течение 6 часов. UFAL без вспомогательных веществ AC/DC агрегировался за $1,3 \pm 0,3$ часа, что свидетельствует о сильной нестабильности мономера инсулина в растворе. Все составы UFAL, стабилизированные вспомогательными веществами MORPH-PHE или MPAM-PHE AC/DC, продемонстрировали устойчивость к стрессовому выдерживанию, по меньшей мере эквивалентную коммерческому HUMALOG[®]. Сополимеры, содержащие MPAM с 14 мас. % PHE (MPAM-PHE_{14%}) и MORPH с 12 мас. % PHE (MORPH-PHE_{12%}), были среди лучших кандидатов, продлевая стабильность состава UFAL до 27 ± 2 часов и 25 ± 5 часов, соответственно (Фиг. 8B-C). Сополимеры MPAM-NIP продемонстрировали ограниченную эффективность в стабилизации мономерного инсулина; однако сополимеры MORPH-NIP продлевали стабильность мономерного инсулина по сравнению с HUMALOG[®]. Действительно, сополимеры, содержащие MORPH с 23 мас. % NIP (MORPH-NIP_{23%}), продлевали стабильность состава UFAL до более чем 25 ± 1 часов. Лучшими вспомогательными веществами-кандидатами AC/DC после второго скрининга были MPAM-PHE_{14%}, MORPH-PHE_{12%} и MORPH-NIP_{23%}. В то время как эти сополимеры продемонстрировали высокую эффективность, MPAM-PHE_{14%} и MORPH-PHE_{12%} также продемонстрировали пониженную растворимость и фазовое разделение, подобное LCST, при физиологической температуре, когда они присутствуют в более высоких концентрациях. Таким образом, MORPH-NIP_{23%} был выбран в качестве лучшего кандидата для стабилизации нашей композиции UFAL в последующих исследованиях *in vivo*. Анализы биологической активности *in vitro* и *in vivo* применяли для подтверждения данных о пропуске и

подтверждения целостности UFAL до и после выдерживания. UFAL не продемонстрировал потери активности после 12 часов стрессового выдерживания ни в клеточном анализе фосфорилирования Ser⁴⁷³ на АКТ, ни у крыс с диабетом, снижая уровень глюкозы в крови (Фиг. 9).

Для проверки того, что состав с MORPH-NIP_{23%} не изменяет равновесие состояния ассоциации лизпро в сторону от мономерной формы, применяли ЯМР DOSY (Фиг. 8D). ЯМР DOSY продемонстрировал, что скорость диффузии лизпро в условиях состава (100 ед./мл лизпро, 2,6 мас. % глицерина, 0,85 мас. % феноксиэтанола и 0,1 мас. % MORPH-NIP_{23%}) составляла $2,0 \times 10^{-10} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$, что соответствует гидродинамическому радиусу 1,2 нм, что соответствует литературным значениям мономера инсулина(28). ЯМР DOSY также дал представление о механизме стабилизации полимерных вспомогательных веществ. MORPH-NIP_{23%} диффундирует медленнее, чем инсулин, что позволяет предположить, что механизм стабилизации не связан с комплексообразованием «вспомогательное вещество-инсулин» и совместной диффузией. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что взаимодействие сополимера с границей раздела является основным механизмом, обеспечивающим стабилизацию мономерного инсулина в составе.

Фармакокинетика и фармакодинамика состава UFAL у свиней с диабетом: Для оценки сверхбыстрого потенциала составов мономерного инсулина были проведены фармакокинетические исследования на модели диабета свиней с дефицитом инсулина. Свиньям с диабетом натошак вводили либо (i) коммерческий HUMALOG[®], либо (ii) UFAL (100 ед./мл лизпро, 2,6 мас. % глицерина, 0,85 мас. % феноксиэтанола и 0,1 мас. % MORPH-NIP_{23%}) в дозе 2-4 ЕД инсулина лизпро, в зависимости от чувствительности каждой свиньи к инсулину. Свиньи имели исходный уровень глюкозы в крови от 330 до 430 мг/дл, а дозы инсулина подбирали таким образом, чтобы снизить уровень глюкозы в крови приблизительно на 100 мг/дл. Доза инсулина, вводимая каждой свинье, была одинаковой в группах лечения, а снижение содержания глюкозы в крови было сходным как при лечении HUMALOG[®], так и UFAL (Фиг. 10A и Фиг. 11). Концентрации лизпро в плазме измеряли с течением времени с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) для оценки фармакокинетики после подкожной инъекции каждой из групп лечения. Никакой разницы в общей экспозиции (AUC_{210}) между группами не наблюдалось (Фиг. 10C). Процент экспозиции в различные моменты времени анализировали с учетом AUC_t/AUC_{210} . Этот анализ демонстрирует повышенную экспозицию UFAL по сравнению с HUMALOG[®] в моменты времени 10 мин и 20 мин (Фиг. 10D-10I). Среднее время пребывания (MRT) обычно указывается для

фармакокинетики состава. MRT обычно описывается как площадь под кривой момента времени (AUMC), деленная на площадь под кривой (AUC) для внутривенных инъекций; однако при подкожном введении необходимо также учитывать среднее время абсорбции (MAT). Когда есть фаза абсорбции, $AUMC/AUC = MAT + MRT$. Отношение площади под кривой момента времени (AUMC) к площади под кривой для фармакокинетического графика (AUMC/AUC) рассчитывали и наносили на график, демонстрируя отсутствие различий между лечением UFAL и HUMALOG[®] (Фиг. 13). Это неудивительно, поскольку авторы ожидали, что скорость выведения из крови будет одинаковой как для HUMALOG[®], так и для UFAL (оба представляют собой инсулин лизпро), а величина MAT по сравнению с MRT будет небольшой, тем самым маскируя различия между составами.

В альтернативном варианте, для быстродействующих составов инсулина обычно приводятся показатели экспозиции для описания фармакокинетики состава. Скорость «время начала действия» быстродействующих инсулинов часто определяется с учетом двух показателей: (i) время до 50% нормализованной высоты пика на пути подъема после введения (обозначается как «50%-подъем») и (ii) время до пиковой концентрации инсулина в плазме. Измерения нормализованной концентрации в плазме использовали для сравнения времени достижения пиковых концентраций лизпро между коммерческими группами HUMALOG[®] и UFAL (Фиг. 10J-10M). У свиней фармакокинетика HUMALOG[®] была почти в 2 раза быстрее, чем у людей. UFAL продемонстрировал более быструю абсорбцию, чем HUMALOG[®], при этом время UFAL до 50% пикового подъема (5 ± 2 мин) было в 2,4 раза быстрее, чем HUMALOG[®] (12 ± 6 мин), а время UFAL до пика (9 ± 4 мин) было в 2,8 раза быстрее, чем HUMALOG[®] (25 ± 10 мин). Продолжительность экспозиции, определяемая как время до 50% нормированной высоты пика на пути снижения после пиковых концентраций экспозиции (время до 50% пикового спада), для UFAL (28 ± 8 мин) была в 1,9 раза короче, чем для HUMALOG[®] (54 ± 21 мин).

Моделирование фармакокинетики UFAL у человека: Чтобы лучше понять, как быстрое начало и короткая продолжительность, продемонстрированные UFAL у свиней, будут экстраполироваться на людей, фармакокинетическая модель была адаптирована из Wong et al. (*J. Diabetes Sci. Technol.* (2008) 2:658–671) для аппроксимации фармакокинетики UFAL у людей. Модель была построена таким образом, что быстродействующие аналоги инсулина (HUMALOG[®]), введенные в подкожное пространство (I_{inj}), диссоциируют и диффундируют с константой скорости k_1 в интерстиций (I_{eq}), абсорбируются с константой скорости k_2 в плазму (I_p) и впоследствии выводятся с помощью нескольких механизмов, которые, тем не менее, могут быть аппроксимированы единственной константой элиминации, k_3 (Фиг. 12A). Предполагалось,

что k_2 и k_3 зависят от вида, k_1 зависит от состава и вида, а отношение k_1 между составами не зависит от вида. Поскольку состав UFAL состоял из мономеров и димеров инсулина, ожидалось, что время, необходимое для достижения равновесия в интерстиции, будет значительно меньше, чем для HUMALOG®. Действительно, при подгонке экспериментальной фармакокинетики свиньи при подкожном введении UFAL, k_1 имеет тенденцию к бесконечности, что означает, что UFAL эффективно обходит первый компартмент модели, и мономеры инсулина немедленно достигают равновесия в подкожном пространстве (Таблица 6). Подгонка фармакокинетических данных свиней для UFAL и HUMALOG® представлена на Фиг. 12В, а сравнение прогнозов модели и экспериментальных данных с соответствующими фармакокинетическими метриками представлено на Фиг. 14, Дополнительное приложение А. Бесконечно большое значение k_1 , определенное для UFAL у свиней, экстраполировали на фармакокинетическую модель человека и использовали для оценки фармакокинетики UFAL при сохранении значений k_2 и k_3 , представленных в литературе (Фиг. 12С).

Таблица 6. Константы скорости, использованные для моделирования кривых РК в Примере 2.

Вид	Вариант инсулина	$k_1(\text{мин}^{-1})$	$k_2(\text{мин}^{-1})$	$k_3(\text{мин}^{-1})$
свинья	HUMALOG®	0,091	0,042	0,27
свинья	UFAL	∞	0,042	0,27
человек	HUMALOG®	0,0104 ^a	0,0604 ^a	0,16 ^a
человек	UFAL	∞	0,0604 ^a	0,16 ^a

^aФармакокинетические константы скорости человека по данным *Wong et al., J. Diabetes Sci. Technol.* (2008) 2:658–671.

Модель прогнозирует время начала воздействия UFAL на человека (т.е. 50% подъема) – 2,5 минуты, пик экспозиции – 10 минут и продолжительность экспозиции (т.е. 50% спада) – 28 минут (Фиг. 12D). Для сравнения, с учетом параметров, представленных в литературе, модель прогнозирует, что "быстродействующие" аналоги инсулина (RAI), такие как HUMALOG®, имеют время начала действия – 14 минут, пик экспозиции – 43 минуты и продолжительность воздействия – 157 минут (Фиг. 12С). В то время как модель RAI занижает время до начала экспозиции (t50% пикового подъема), прогнозируемая кривая надежно отражает опубликованные клинические фармакокинетические данные для пика и продолжительности экспозиции HUMALOG®. Таким образом, фармакокинетическое моделирование прогнозирует, что кинетика UFAL более чем в 4 раза быстрее, чем у современных «быстродействующих» составов инсулина.

Дополнительное сравнение с клиническими данными для быстродействующих составов инсулина демонстрирует, что кинетика UFAL прогнозируется более быстрой, чем даже быстродействующие составы инсулина второго поколения, такие как Fiasp (Novo-Nordisk) и BioChaperone Lispro (Adocia) (Фиг. 12E).

У свиней с диабетом этот состав UFAL продемонстрировал сверхбыструю фармакокинетику, примерно в два раза более быстрое начало действия и вдвое более короткую продолжительность экспозиции, чем HUMALOG[®], коммерческий «быстродействующий» состав инсулина, с той же молекулой инсулина Лизпро. Эти результаты продемонстрировали, что этот состав UFAL более точно имитирует секрецию эндогенного инсулина у здоровых людей, и подчеркнули, что указанный состав является многообещающим для оптимизации лечения диабета. Даже постепенное улучшение фармакокинетики по сравнению с современными «быстродействующими» составами инсулина, наблюдаемое для Fiasp, быстродействующей формы NOVOLOG[®] (коммерческий состав аспарт), продемонстрировало многочисленные клинические преимущества. В то время как Fiasp демонстрирует умеренное 10-минутное сокращение времени до пикового действия и 15-минутное сокращение продолжительности действия по сравнению с «быстродействующими» составами инсулина, применение Fiasp, тем не менее, снижает постпрандиальные колебания уровня глюкозы и снижает уровни HbA1c у пациентов с диабетом. Напротив, у свиней с диабетом, у которых наблюдаемая фармакокинетика инсулина была в два раза быстрее, чем у людей, UFAL сокращал время до пиковой экспозиции на 16 минут и уменьшал продолжительность экспозиции на 26 минут по сравнению с HUMALOG[®]. Результаты, полученные у свиней с диабетом, в сочетании с прогнозируемой моделью фармакокинетики UFAL у человека, позволили предположить, что UFAL может иметь кинетику абсорбции, беспрецедентную для инъекционного состава инсулина. В случае реализации в клинических исследованиях на людях эта кинетика будет приближаться к сверхбыстрой кинетике AFREZZA[®], имеющегося в продаже ингаляционного инсулина. Однако, в отличие от AFREZZA[®], UFAL представляет собой инъекционный состав, который обеспечивает более точные схемы введения и совместимость с помповыми системами и системами с замкнутым циклом, что обеспечивает для UFAL потенциал для улучшения постпрандиального гликемического контроля у пациентов с диабетом.

В совокупности эти исследования идентифицировали сополимерное вспомогательное вещество для стабилизации белка и продемонстрировали его полезность для стабилизации состава инсулина со сверхбыстрой абсорбцией. Первоначальные эксперименты по цитотоксичности продемонстрировали, что сополимерное

вспомогательное вещество не токсично в дозах, на порядок превышающих те, которые применяются в составах инсулина (Фиг. 13). Первоначальные исследования биосовместимости UFAL на крысах с диабетом также подтвердили результаты цитотоксичности, что указывает на хорошую переносимость UFAL (Фиг. 14).

Пример 3: Сверхбыстродействующий совместный состав инсулина и прамлинтида

Материалы: Амфифильное акриламидное сополимерное вспомогательное вещество акрилоилморфолин_{77%}-N-изопропилакриламид_{23%} (MoNi_{23%}) получали в соответствии с процедурами, изложенными выше в Примере 1, UFAL HUMALOG® (Eli Lilly) и прамлинтид (BioTang) приобретали и применяли в том виде, в котором они были получены. Относительно лизпро, не содержащего цинка, цинк (II) был удален из составов инсулина за счет конкурентного связывания путем добавления этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), которая демонстрирует константу связывания диссоциации, приближающуюся к аттомолярным концентрациям ($K_D \sim 10^{-18}$ M). EDTA добавляли к составам (4 экв. по отношению к цинку) для секвестрации цинка из состава, а затем выделяли лизпро с помощью гравитационных колонок PD MidiTrap G-10 (GE Healthcare) для замены буфера на воду. Затем раствор концентрировали с помощью центрифужных установок Amino Ultra 3K (Millipore) и пересоставляли с добавлением 2,6 мас. % глицерина, 0,85 мас. % феноксиэтанола в 10 mM фосфатного буфера (pH=7,4). Все остальные реагенты были приобретены у Sigma-Aldrich, если не указано иное.

Поточная эксклюзионная хроматография с многоугольным светорассеянием (SEC-MALS): Композицию ассоциативного состояния инсулина для мономерного состава инсулина получали с помощью SEC-MALS, как сообщалось ранее (Maikawa et al., *Ther.* (2019) 75:1900094). Безцинковый инсулин лизпро оценивали в буфере, содержащем глицерин (2,6%) и феноксиэтанол (0,85%). Вкратце, усредненную по числу молекулярную массу (MW) и дисперсность ($\mathfrak{D} = Mw/Mn$) составов получали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), проводимой с помощью прибора Dionex Ultimate 3000 (включая насос, автоматический пробоотборник и отделение колонки), оснащенного детектором многоугольного светорассеяния Dawn Heleos II и детектором показателя преломления Optilab rEX. Колонка представляла собой колонку Superose 6 Increase 10/300 GL от GE Healthcare. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Astra 6.0 Долю каждого состояния ассоциации инсулина получали путем подгонки экспериментально полученных усредненных по числу и усредненных по весу молекулярных масс к Уравнению 1 и Уравнению 2 ниже. m , d и h , соответственно, представляют собой молярные доли мономерного, димерного и гексамерного инсулина, тогда как I

представляет собой молекулярную массу мономерного инсулина лизпро. Решатель был ограничен таким образом, что $m+d+h=1$, в то время как m , d и h оставались между 0 и 1.

$$M_n = m * I + d * 2I + h * 6I \quad (1)$$

$$M_w = \frac{m*I^2 + d*4I^2 + h*36I^2}{m*I + d*2I + h*6I} \quad (2)$$

Оценка стабильности инсулина и прамлинтида in vitro: Анализы агрегации, применяемые для оценки стабильности, были адаптированы из Webber et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2016) 113:14189-14194). Вкратце, составы аликвотировали по 150 мкл на лунку ($n = 3$ /группа) в прозрачный 96-луночный планшет и запечатывали оптически прозрачным и термостабильным уплотнением (VWR). Планшет инкубировали в микропланшет-ридере (микропланшет-ридер BioTek SynergyH1) при 37 °C при постоянном перемешивании (567 rpm). Показатели абсорбции снимали каждые 10 минут при длине волны 540 нм в течение всего эксперимента. Образование агрегатов инсулина или прамлинтида приводит к рассеиванию света и снижению пропускания образцов (время до агрегации = время до 10% изменения пропускания). Контроли включали: (i) HUMALOG® (100 ЕД/мл), (ii) HUMALOG® (100 ЕД/мл) + прамлинтид (1:6 лизпро:прамлинтид), (iii) лизпро, не содержащий цинка (100 ЕД/мл лизпро, 2,6 мас. % глицерина, 0,85 мас. % феноксиэтанола, pH=7,4). Оценивали стабильность совместной композиции инсулина и прамлинтида (100 ЕД/мл лизпро, 1:6 лизпро:прамлинтид, 2,6 мас.% глицерина, 0,85 мас. % феноксиэтанола, pH=7,4), смешанного с 0,1 мг/мл MoNi₂₃%.

Стрептозотоцин-индуцированная модель диабета у крыс: Для экспериментов использовали самцов крыс Sprague Dawley (Charles River). Исследования на животных проводились в соответствии с рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных; все протоколы были одобрены Стэнфордским институциональным комитетом по уходу и использованию животных. Протокол, используемый для индукции стрептозотоцином (STZ), адаптирован из протокола Wu и Huan (Сунг. Вкратце, самцов крыс Sprague Dawley весом 160-230 г (8-10 недель) взвешивали и не кормили утром 6-8 часов до получения STZ. STZ разбавляли до 10 мг/мл в буфере цитрата натрия непосредственно перед инъекцией. Раствор STZ вводили внутривентально каждой крысе в дозе 65 мг/кг. Крысы получали воду, содержащую 10% сахарозы, в течение 24 часов после инъекции STZ. Уровень глюкозы в крови крыс анализировали на предмет гипергликемии ежедневно после введения STZ посредством забора крови из хвостовой вены и использования портативного глюкометра Bayer Contour Next (Bayer). Диабет

определяли как наличие 3 подряд измерений глюкозы в крови >400 мг/дл у крыс не натошак.

Фармакокинетика и фармакодинамика in vivo у крыс с диабетом: Крысы с диабетом не получали пищи в течение 4-6 часов перед инъекцией. Для фармакокинетических экспериментов крысам вводили 1 ЕД инсулина (~ 2 ЕД/кг) с последующим немедленным (< 30 секунд после инъекции) пероральным введением 1 г/кг раствора глюкозы. Были протестированы следующие составы: (i) HUMALOG[®], (ii) отдельные инъекции HUMALOG[®] и прамлинтида (1:6 прамлинтид:лизпро, pH=4), (iii) совместный состав инсулин-прамлинтид (100 ЕД/мл лизпро, 1:6 лизпро:прамлинтид, 2,6 мас. % глицерина, 0,85 мас. % феноксиэтанола, 0,1 мг/мл MoNi₂₃%, pH=7,4). Когорта из 11 крыс получала каждый состав один раз, при этом порядок, в котором вводили составы, был случайным. Для обеспечения точной дозировки и во избежание эффектов разбавления (разбавление благоприятствует мономерам инсулина), составы разводили в два раза (10 мкл препарата + 10 мкл буфера) непосредственно перед введением. После инъекции измеряли уровень глюкозы в крови с помощью портативного глюкометра (Bayer Contour Next) и дополнительно собирали кровь (пробирки для сыворотки Sarstedt) для анализа с помощью ELISA. Моменты времени были следующими: каждые 3 минуты в течение первых 30 минут, затем каждые 5 минут в течение следующих 30 минут, затем 75, 90 и 120 минут. Концентрации прамлинтида в сыворотке определяли количественно с помощью набора ELISA для амилина человека (Millipore Sigma). Концентрации лизпро в сыворотке определяли количественно с помощью Northern Lights Mercodia Lispro NL-ELISA. Второй фармакодинамический эксперимент проводили с целью достижения лучшего согласования дозы инсулина с пероральной дозой глюкозы, чтобы лучше имитировать контроль уровня глюкозы во время еды. Тестировали те же составы, но дозы были изменены на 0,75 ЕД/кг инсулина, вводимого подкожно непосредственно перед введением глюкозы в дозе 2 г/кг с помощью перорального зонда. Шприц Hamilton на 10 мкл применяли для точного дозирования неразбавленных (100 ЕД/мл) составов. Когорта из 10 крыс получала каждый состав один раз, при этом порядок, в котором вводили составы, был случайным. Измеряли только уровень глюкозы, при этом моменты времени были следующими: каждые 5 минут в течение первого часа, затем 75, 90 и 120 минут.

Опорожнение желудка у крыс с диабетом: Ацетаминофен применяли в качестве модельного соединения для оценки опорожнения желудка во время еды. Крысы с диабетом не получали пищи в течение 4-6 часов до начала эксперимента. Затем крысам подкожно вводили один из следующих составов (2 ЕД/кг): (i) HUMALOG[®], (ii) отдельные

инъекции HUMALOG® и прамлинтида (1:6 прамлинтид:лизпро, pH=4), (iii) совместный состав инсулин-прамлинтид (100 Ед/мл лизпро, 1:6 лизпро:прамлинтид, 2,6 мас. % глицерина, 0,85 мас. % феноксиэтанола, 0,1 мг/мл MoNi_{23%}, pH=7,4). Для обеспечения точной дозировки и во избежание эффектов разбавления (разбавление благоприятствует мономерам инсулина), составы разводили в два раза (10 мкл препарата + 10 мкл буфера) непосредственно перед введением. Когорта из 11 крыс получала каждый состав один раз, при этом порядок, в котором вводили составы, был случайным. Ацетаминофен вводили через желудочный зонд в виде взвеси в фосфатном буфере (100 мг/кг) сразу после введения инсулина. (Наконечники зондов для кормления погружали в раствор глюкозы перед введением перорального зонда, чтобы уменьшить стресс от введения). Образцы крови собирали для анализа ELISA (Neogen) в моменты времени: -30, 0, 15, 30, 60, 90, 120 и 150 минут после инъекции.

Статистические данные: Все результаты выражены как среднее $\pm$ стандартная ошибка (SE), если не указано иное. Все статистические анализы проводили в виде общих линейных моделей в JMP Pro, версия 14. Сравнения между составами проводили с помощью смешанной модели повторных измерений с ограниченной максимальной вероятностью. Апостериорный критерий Тьюки HSD для множественных сравнений применяли, когда состав имел значительный фиксированный эффект, и сообщали скорректированные значения p. Крыса была включена в модель в качестве переменной как случайный блокирующий фактор (контроль) для учета индивидуальных различий в ответах крыс. (Каждая крыса получала все составы и выступала в роли собственного контроля). Статистической значимостью считалось $p < 0,05$. Для Фиг. 18H-18L, апостериорную поправку Бонферрони применяли для учета сравнения составов во множественные моменты времени экспозиции (в дополнение к поправке Тьюки HSD), и значимость доводили до $\alpha = 0,01$.

Результаты

Стабилизация совместного состава инсулина и прамлинтида: Характеризацию молекулярной массы MoNi_{23%} и состава мономера можно найти в Таблице 7. Результаты, приведенные в Примере 2, продемонстрировали пользу от применения MoNi_{23%} в качестве стабилизирующего вспомогательного вещества для мономерного инсулина. Склонность инсулина и прамлинтида к агрегации с образованием амилоидных фибрилл, которые в основном инициируются на гидрофобных поверхностях, делает их хорошими кандидатами для стабилизации посредством MoNi_{23%}. Таким образом, была выдвинута гипотеза, что тот же самый MoNi_{23%} может быть пригоден для физической стабилизации

сверхбыстродействующего совместного состава инсулина и прамлинтида, вводимого во время еды, чтобы обеспечить единый состав с повышенным фармакокинетическим перекрытием между этими двумя гормонами.

Таблица 7: Характеризация сополимерного вспомогательного вещества MoNi.

Мономер-носитель	мас. % (Целевой)	мас. % по ЯМР (Эксп.)	Мономер-допант	мас. % (Целевой)	мас. % по ЯМР (Эксп.)	M_n^a	M_w^a	$\bar{D}^a$
Акрилоилморфолин (Mo)	77	74,5 b	N-изопропилакриламид (Ni)	23	25,5 b	3200	3800	1,19

a Определено с помощью эксклюзионной хроматографии, откалиброванной с применением образцов полиэтиленгликоля.

b Массовые проценты трудно определить из-за перекрывающихся спектров. Массовые проценты, рассчитанные из постосаженных ЯМР спектров путем измерения более разрешенной левой половины пика N-изопропилакриламида ($\delta = 4,0, 0,5$ Н), удвоения его и вычитания из неразрешенных пиков Mo и Ni ($\delta = 3,2-4,2, 7$ Н (Mo) 1Н (Ni)).

Не содержащий цинка лизпро в присутствии глицерина (2,6 мас. %) и феноксиэтанола (0,85 мас. %) в качестве модифицирующих тониичность и противомикробных агентов приводит к получению состава с высоким содержанием мономеров. Этот результат был подтвержден в проводимом исследовании, в котором при анализе с помощью SEC-MALS в составе наблюдалось 83% мономеров, 17% димеров и 0% гексамеров (Фиг. 15Е и Фиг. 16). Для сравнения, коммерческий HUMALOG® на >99% состоит из гексамеров. Для измерений SEC-MALS, состояние ассоциации инсулина тестировали отдельно только с низкомолекулярными вспомогательными веществами, поскольку и прамлинтид, и вспомогательное вещество MoNi_{23%} имеют одинаковую молекулярную массу и не позволили бы рассчитать содержание мономера в составе с помощью SEC-MALS. Было продемонстрировано, что добавление MoNi_{23%} не изменяет состояние ассоциации инсулина с помощью диффузионно-упорядоченной ядерно-магнитно-резонансной спектроскопии (DOSY-ЯМР). Не предполагалось, что наличие прамлинтида изменит состояние ассоциации инсулина.

Совместный состав инсулина и прамлинтида состоял из безцинкового лизпро (100 ЕД/мл), прамлинтида (молярное соотношение прамлинтид:лизпро 1:6), глицерина (2,6 мас. %), феноксиэтанола (0,85 мас. %) и MoNi_{23%} (0,1 мг/мл) в фосфатном буфере при pH~7 (Фиг. 15D). Соотношение прамлинтида 1:6 было выбрано для сравнения с

предыдущей работой с применением СВ[7]-PEG-стабилизированного совместного состава инсулина и прамлинтида у свиней с диабетом. Кроме того, соотношение 1:6 аналогично высоким соотношениям эндогенного инсулина и прамлинтида, о которых сообщалось в литературе, а также находится в диапазоне соотношений, которые, как продемонстрировали эксперименты *in silico*, являются наиболее эффективными. Стабильность состава оценивали с помощью анализа стрессового выдерживания. При образовании агрегатов инсулина и/или прамлинтида они рассеивают свет, который может быть измерен по абсорбции. В контексте данного документа, агрегация состава определяется как изменение светопропускания на 10% или более. Было продемонстрировано, что протестированный совместный состав является стабильным в течение $16,2 \pm 0,1$ часа, что в два раза дольше, чем коммерческий HUMALOG[®], который агрегирует через $8,2 \pm 0,5$ часа (Фиг. 15F). Непосредственное добавление прамлинтида к HUMALOG[®] приводило к получению полупрозрачного состава сразу после смешивания, пропускание которого было снижено на 5-25% по сравнению с HUMALOG[®], взятым отдельно (Фиг. 17). Эта смесь достигла порога агрегации через 8 ± 3 часа, что было весьма непостоянно из-за переменного исходного пропускания. Безцинковый лизпро, взятый отдельно, был в основном мономерным и очень нестабильным, быстро агрегируя через $5,7 \pm 0,1$ часа.

Фармакокинетика и фармакодинамика у крыс с диабетом: После определения стабильности совместного состава инсулина и прамлинтида, оценивали фармакокинетику *in vivo*, чтобы проанализировать, приводит ли применение мономерного инсулина к увеличению фармакокинетического перекрытия инсулина и прамлинтида. Совместный состав тестировали в сравнении с контрольными группами, получавшими только HUMALOG[®] и отдельные инъекции инсулина и прамлинтида (Фиг. 18). Каждой крысе давали высокую дозу каждого препарата (2 ЕД/кг) с последующим пероральным введением раствора глюкозы (1 г/кг). Одинаковая величина деплетирования глюкозы наблюдалась для всех трех составов, однако деплетирование глюкозы для совместного состава имело тенденцию к более быстрому действию (более быстрое деплетирование глюкозы) и более короткой продолжительности действия (более быстрое восстановление глюкозы) по сравнению с HUMALOG[®] и отдельными контрольными инъекциями (Фиг. 18A). Эта тенденция отражалась в фармакокинетике инсулина лизпро, когда наблюдалась тенденция к более быстрому началу действия и времени до пикового воздействия для совместного состава (Фиг. 19A-19C). Между составами наблюдалась разница в продолжительности действия, определяемая как 50% пикового спада ($F_{2, 20}=7,07$, $P=0,0048$). Совместный состав имел более короткую продолжительность действия (22 ± 2

минуты) по сравнению с отдельными инъекциями (34 ± 3 минуты, $P = 0,0034$) и тенденцию к более короткой продолжительности действия по сравнению с HUMALOG® (27 ± 2 минуты, $P=0,24$) (Фиг. 19А-19D). Более быстрое начало также подтверждалось с помощью коэффициента экспозиции – доля площади под кривой (AUC) в данный момент времени от общей экспозиции (AUC_t/AUC_{120}). Совместный состав показал большую долю общей экспозиции по сравнению с HUMALOG® и отдельными инъекциями в моменты времени 6, 15 и 30 минут (Фиг. 19Е-19I). Не наблюдалось различий между составами в площади под кривой экспозиции инсулина лизпро или прамлинтида (Фиг. 20). Как и ожидалось, не наблюдалось также различий между кинетикой прамлинтида, вводимого в виде отдельных инъекций, и в совместном препарате (Фиг. 19J-19М, Фиг. 21).

Сдвиг фармакокинетической кривой инсулина лизпро в совместном составе влево был подтвержден путем наложения кривых инсулина прамлинтида при доставке посредством отдельных инъекций или в совместном составе и сравнения времени перекрытия (Фиг. 22). Перекрытие определяли как отношение перекрытия к общей ширине пика на половине высоты пика ($\text{перекрытие} \div (\text{лизпро} + \text{прамлинтид} - \text{перекрытие})$). Как и предполагалось, введение мономерного инсулина с прамлинтидом в совместном составе приводило к увеличению перекрытия ($0,75 \pm 0,06$) по сравнению с отдельными инъекциями ($0,47 \pm 0,07$, $F_{1, 10} = 6,96$, $P = 0,025$) (Фиг. 10С). Более быстрая кинетика инсулина и увеличенное перекрытие между инсулином и прамлинтидом, наблюдаемое в разработанном авторами совместном составе, более точно имитирует секрецию инсулина-прамлинтида во время еды. Применение ацетаминофена в эксперименте с изучением опорожнения желудка у крыс с диабетом: После того, как для совместного состава по данному изобретению была определена более быстрая кинетика инсулина и увеличенное перекрытие между инсулином и прамлинтидом, целью следующего этапа было определение, есть ли преимущества у этого совместного состава при введении во время еды по сравнению со стандартными введениями только HUMALOG®, или HUMALOG® и прамлинтида, применяемых отдельно. Ацетаминофен применяли в качестве модельной нагрузки для подтверждения функции прамлинтида путем тестирования его способности задерживать опорожнение желудка после введения состава (Фиг. 23). Ожидалось, что прамлинтид как при раздельном введении, так и в совместном препарате, будет приводить к задержке опорожнения желудка по сравнению с HUMALOG®, вводимым отдельно. Действительно, время достижения пиковой концентрации ацетаминофена было задержано до 76 ± 5 минут для отдельных инъекций и 68 ± 6 минут для совместного состава по сравнению с 35 ± 5 минут для HUMALOG®,

вводимого отдельно, демонстрируя отсутствие разницы во времени достижения пика ацетаминофена между отдельными инъекциями и совместным составом (Фиг. 23С).

Нагрузка глюкозой во время еды у крыс с диабетом: Совместный состав дополнительно тестировали в условиях имитации приема пищи с низкой подкожной дозой инсулина (0,75 ЕД/кг) и высокой дозой глюкозы (2 г/кг), вводимых через пероральный желудочный зонд (Фиг. 24). В отличие от измерений уровня глюкозы в фармакокинетических экспериментах, в которых доминировал инсулин, этот эксперимент был направлен на снижение дозы инсулина и увеличение нагрузки глюкозой, чтобы лучше имитировать контроль уровня глюкозы во время приема пищи. Все три состава имели одинаковый контроль пика глюкозы (Фиг. 24С). Тем не менее, быстрое начало действия инсулина в сочетании с замедленным опорожнением желудка и короткой продолжительностью действия было характерным для разработанного совместного состава инсулина и прамлинтида с сополимером MoNi₂₃%, что приводило к более жесткому контролю этого подъема уровня глюкозы во время еды, а также уменьшало величину деплетирования глюкозы ниже исходных уровней (Фиг. 24В и Фиг. 24D). Напротив, в то время как замедленное опорожнение желудка при применении отдельных инъекционных составов приводило к быстрому деплетированию глюкозы и контролированию подъема уровня глюкозы во время еды, это также приводило к большему деплетированию глюкозы ниже исходного уровня. В результате введения только HUMALOG[®] получали кривую глюкозы, аналогичную той, которую получали при отдельных введениях инсулина и прамлинтида, но с отсроченным деплетированием глюкозы, поскольку высвобождение глюкозы не задерживалось. Эти результаты свидетельствуют о том, что совместный состав может обеспечивать хороший контроль уровня глюкозы натощак, а также снижать постпрандиальную гипогликемию.

Это исследование продемонстрировало, что совместный состав мономерного инсулина лизпро и прамлинтида имел сверхбыструю кинетику с высокой степенью перекрытия, что приводило к улучшению контроля уровня глюкозы после нагрузки глюкозой. В этом составе в качестве стабилизирующего агента применяли амфифильное акриламидное сополимерное вспомогательное вещество MoNi₂₃%, и оно оставалось физически стабильным в два раза дольше, чем коммерческий HUMALOG[®], в тесте со стрессовым выдерживанием. Добавление прамлинтида в совместный состав приводит к замедлению опорожнения желудка, как и при отдельном введении прамлинтида. Кроме того, комбинированные эффекты сверхбыстрой доставки инсулина и прамлинтида, синхронизированные в совместном составе, приводят к уменьшению деплетирования глюкозы по сравнению с исходными измерениями при сохранении контроля над

первоначальным пиком глюкозы при моделируемой нагрузке глюкозой «во время еды». Эти результаты свидетельствуют о том, что совместный состав может улучшать контроль уровня глюкозы за счет снижения риска постпрандиальной гипогликемии при одновременном снижении бремени болезни у пациента.

Данные на крысах продемонстрировали только тенденцию к увеличению времени до начала действия (50% пикового подъема) и времени до пика для лизпро в совместном составе по сравнению с HUMALOG[®] и отдельными инъекциями. Тем не менее, отношения AUC, представляющие долю экспозиции в различные моменты времени, продемонстрировали, что совместный состав имел большую долю ранней экспозиции лизпро, чем отдельные инъекции и HUMALOG[®] вплоть до 30 минут после инъекции. Результаты этих наблюдений были неожиданными, поскольку это исследование было проведено на крысах с диабетом, у которых скорость абсорбции инсулина была намного выше из-за их дряблой кожи, что приводило к большей площади поверхности для подкожной абсорбции по сравнению с людьми (Фиг. 25A-25C). Действительно, исследования, сравнивающие быстродействующие аналоги инсулина и рекомбинантный человеческий инсулин, которые имеют явные различия во времени начала действия, не демонстрируют различий при сравнении на крысах. Предыдущее исследование мономерного лизпро на свиньях с диабетом продемонстрировало, что время до начала действия и время до пика было в два раза быстрее для мономерного лизпро по сравнению с HUMALOG[®]. Кроме того, сравнение кинетики HUMALOG[®], мономерного лизпро и прамлинтида между крысами и свиньями подтвердило предыдущее моделирование, что позволяет предположить, что эта сверхбыстрая кинетика будет сохраняться у разных видов (у людей) (Фиг. 26A-26C и Фиг. 27A-27C). В то время как время достижения пика HUMALOG[®] почти удвоилось у крыс (13 ± 1 мин) и свиней (25 ± 4 мин), время достижения пика для мономерного лизпро (вводимого в составе совместного препарата крысам) было одинаковым у обоих видов (11 ± 1 мин у крыс и 9 ± 2 мин у свиней) (Фиг. 26). Сохранение времени до пиковой экспозиции от крыс до свиней было многообещающим для переноса этой сверхбыстрой кинетики инсулина в испытания на людях и привело бы к кинетике, более быстрой, чем у существующих коммерческих составов (Фиг. 26).

Пример 4: Сополимеры в качестве «вставных» вспомогательных веществ для составов инсулина

Материалы: HUMULIN[®] R (Eli Lilly) покупали и применяли в том виде, в котором он был получен. Растворители N,N-диметилформамид (DMF; класс HPLC, Alfa Aesar, >99,7%), гексаны (Fisher, сертифицированный ACS, >99,9%), эфир (Sigma,

сертифицированный ACS, безводный, >99%) и CDCl_3 (Acros, >99,8%) применяли в том виде, в котором они были получены. Мономеры N-(3-метоксипропил)акриламид (MPAM; Sigma, 95%), 4-акрилоилморфолин (MORPH; Sigma, >97%) перед применением фильтровали с помощью основного оксида алюминия. Мономеры N-фенилакриламид (PHE; Sigma, 99%) и N-изопропилакриламид (NIPAM; Sigma, >99%) применяли в том виде, в котором они были получены. Агенты переноса цепи RAFT, 2-циано-2-пропилдодецилтретиокарбонат (2-CPDT; Strem Chemicals, >97%) и 4-(((2-карбоксиэтил)тио)карботиоил)тио)-4-цианопентановую кислоту (BM1433; Boron Molecular, >95%), применяли в том виде, в котором они были получены. Инициатор 2,2'-азобис(2-метилпропионитрил) (AIBN; Sigma, >98%) перекристаллизовывали из метанола (MeOH; Fisher, класс HPLC, >99,9%) и сушили в вакууме перед применением. Агенты для удаления группы Z, лауроилпероксид (LPO; Sigma, 97%) и перекись водорода (H_2O_2 ; Sigma, 30%), применяли в том виде, в котором они были получены. Стрептозотоцин (99,58%) приобретали у MedChem Express. Все остальные реагенты приобретали у Sigma-Aldrich, если не указано иное.

Поверхностное натяжение: Поверхностное натяжение с временным разрешением на границе раздела воздух-раствор измеряли с помощью платино-иридиевой пластины Вильгельми, соединенной с электровесами (KSV Nima, Финляндия). Пластину Вильгельми частично погружали в водный раствор в чашке Петри и регистрировали поверхностное натяжение границы раздела в течение 50 минут с момента образования свежей границы раздела. Фиксировали равновесные значения поверхностного натяжения ($t = 50$ мин), поскольку эти значения более точно описывают среду в хранящемся флаконе до перемешивания. Были взяты два повтора и усреднены.

Межфазная реология: Реологию межфазного сдвига измеряли с помощью реометра Discovery HR-3 (TA Instruments) с межфазной геометрией, состоящей из кольца Дю Нуои из платиновой/иридиевой проволоки (CSC Scientific, Fairfax, VA, номер по каталогу 70542000). Перед каждым экспериментом кольцо Дю Нуои промывали этанолом и водой и обрабатывали пламенем для удаления органических загрязнений. Камера для раствора состояла из двустенной проточной кюветы Куэтта с внутренним тефлоновым цилиндром и внешним стеклянным стаканом. Временную развертку выполняли с деформацией 1% (в пределах линейного режима) и частотой 0,05 Гц (достаточно низкой, чтобы инерция прибора не была значительной). Межфазную комплексную сдвиговую вязкость измеряли в течение 30 минут. Эксперимент повторяли трижды.

Синтез полимеров: Полимеры синтезировали с помощью обратимого аддитивно-фрагментационного переноса, как описано в Примере 1 выше. Процедура синтеза

вспомогательного вещества MoNi_{23%} AC/DC выглядит следующим образом и почти идентична для всех других комбинаций носителя/допанта, в которых изменяются только выбор и концентрация носителя/допанта. MORPH (566 мг, 4,02 ммоль, 36,5 экв.), NIPAM (168 мг, 1,485 ммоль, 13,5 экв.), 2CPDT (38 мг, 0,11 ммоль, 1 экв.) и AIBN (3,6 мг, 0,02 ммоль, 0,2 экв.) объединяли и разбавляли с применением DMF до общего объема 2,25 мл (концентрация винилового мономера 33,3 мас./об.) в сцинтилляционной пробирке объемом 8 мл, снабженной перегородкой из PTFE. Реакционную смесь барботировали газообразным азотом в течение 10 минут, а затем нагревали в течение 12 часов при 65°C. Для удаления Z-конца полученного сополимера к реакционной смеси добавляли AIBN (360 мг, 2,2 ммоль, 20 экв.) и LPO (88 мг, 0,22 ммоль, 2 экв.), которую затем барботировали газообразным азотом в течение 10 минут и нагревали в течение 12 часов при 90°C. Удаление Z-группы подтверждалось отношением показателя преломления к интенсивности УФ ($\lambda = 310$ нм) в анализе эксклюзионной хроматографии (SEC). Полученные сополимеры трижды осаждали из эфира и сушили в вакууме в течение ночи.

Анализ стабильности инсулина in vitro (ускоренное выдерживание): 50 мкл вспомогательного вещества AC/DC (MoNi_{23%}, MpPhe_{8%}, MoPhe_{6%}) в воде milli-Q (2,1, 21 или 105 мг/мл) или 50 мкл воды milli-Q добавляли к 1 мл HUMULIN® R (Eli Lilly 100 Ед) в стеклянный флакон с автодозатором (J.G. Finneran, 2,0 мл Clear R.A.M.™, Флакон с большим отверстием, 12 x 32 мм, резьба 9 мм) и укупоривали, получая 95 ЕД HUMULIN® либо в качестве контроля, либо с добавлением 0,01, 0,1 или 0,5 мас. % вспомогательного вещества AC/DC. Эти флаконы инкубировали при 37 °C и перемешивали при 150 RPM в течение 2, 4 и 6 месяцев (кроме того, контроль HUMULIN® отдельно перемешивали в течение 2 недель и 1 месяца). Приготовление составов проводили в шахматном порядке, чтобы все образцы достигли окончания периода своего выдерживания в одно и то же время. Флаконы охлаждали до тестирования по достижении выбранного момента времени выдерживания. После первоначальных экспериментов с пропуском все дальнейшие эксперименты проводились с составами, содержащими 0,01 мас. % вспомогательного вещества AC/DC, чтобы минимизировать концентрацию сополимера. Кроме того, 500 мкл 2,1 мг/мл MoNi_{23%} или воды milli-Q добавляли к 10 мл чистого HUMULIN® (Eli Lilly 100 Ед) в его коммерческий флакон для получения контроля HUMULIN® 95 Ед и состава с 0,01 мас. % вспомогательного вещества AC/DC. Эти флаконы были помещены в оригинальные индивидуальные упаковочные коробки вместе с инструкцией. Эти упаковки инкубировали либо при 37 °C, либо при 50 °C до значительного изменения помутнения. Аликвоты по 300-400 мкл отбирали каждые 24 часа в течение первых 7 дней и охлаждали. После этого периодически отбирали аликвоты для сохранения объема.

Каждые 24 часа дно флаконов фотографировали для отслеживания изменения помутнения. Способы анализа агрегации рекомбинантного человеческого инсулина были адаптированы из Webber et al. Образцы состава высевали по 150 мкл на лунку в прозрачный 96-луночный планшет и измеряли оптическую плотность при 540 нм (микропланшет-ридер BioTek Synergy H1). Агрегация инсулина приводила к рассеиванию света, что обуславливало увеличение измеряемой абсорбции. Время до агрегации (t_A) определяли как момент времени, когда наблюдалось 10% увеличение пропускания по сравнению с моментом времени нуль.

Круговой дихроизм: Круговой дихроизм использовали для подтверждения того, что выдерживание с вспомогательными веществами AC/DC не приводит к изменениям вторичной структуры инсулина. Выдержанный HUMULIN[®] (0,5, 1, 2, 4 и 6 месяцев) или HUMULIN[®], выдержанный с 0,01 мас. % вспомогательных веществ AC/DC (2, 4 и 6 месяцев), оценивали в сравнении с не выдержанным контролем HUMULIN[®] или не выдержанным HUMULIN[®] с 0,01 мас. % вспомогательного вещества AC/DC. Образцы состава разводили до концентрации 0,2 мг/мл в PBS (pH=7,4). Перед измерением образцы оставляли для уравнивания на 15 минут при комнатной температуре. Спектроскопию кругового дихроизма в ближней УФ-области выполняли при 20 °C на спектрополяриметре J-815 CD (Jasco Corporation) в диапазоне длин волн 200–260 нм с использованием кюветы с длиной оптического пути 0,1 см.

Анализ клеточной активности инсулина *in vitro*: Активность инсулина *in vitro* тестировали через путь фосфорилирования АКТ с применением наборов AlphaLISA SureFire Ultra (Perkin-Elmer) для обнаружения фосфорилированного АКТ 1/2/3 (pS473) по сравнению с общим Akt1. Были протестированы составы HUMULIN[®], выдержанный HUMULIN[®] (t = 6 месяцев), HUMULIN[®] + MoNi_{23%}, и выдержанный HUMULIN[®] + MoNi_{23%} (t = 6 месяцев). Были протестированы составы HUMULIN[®] + MoNi_{23%} и выдержанный HUMULIN[®] + MoNi_{23%} (t= 6 месяцев). Культивировали мышечные миобласты C2C12 (ATCC CRL-1772), и перед использованием клеток убеждались в отсутствии контаминации их микоплазмой. В модифицированную по Дульбекко среду Игла (DMEM) (Gibco; 4,5 г/л D-глюкозы, L-глутамина и 110 мг/л пирувата натрия) добавляли 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS) и 5% пенициллин-стрептомицин. Клетки выращивали в 96-луночном планшете для тканевых культур в течение 24 часов (плотность посева = 25000 клеток/лунку в 200 мкл культуральной среды). Перед стимуляцией инсулином клетки дважды промывали 200 мкл DMEM, не содержащей добавок, и выдерживали в течение ночи в 100 мкл DMEM, не содержащей добавок. Затем среду удаляли и клетки стимулировали 100 мкл инсулина (i) HUMULIN[®], (ii)

выдержанного HUMULIN[®] (t = 6 месяцев), (iii) HUMULIN[®] + MoNi_{23%}, или (iv) выдержанного HUMULIN[®] + MoNi_{23%} (t = 6 месяцев), разведенных в DMEM, не содержащей добавок, в течение 30 минут при инкубации при 37 °C. Клетки дважды промывали 100 мкл холодного 1X трис-буферного солевого раствора перед добавлением 100 мкл лизирующего буфера в каждую лунку и встряхиванием в течение по меньшей мере 10 минут при комнатной температуре для полного лизиса клеток. 30 мкл лизата переносили в 96-луночный белый планшет с половинной площадью лунок для каждого анализа. Анализы выполняли в соответствии с протоколом производителя. Планшеты инкубировали при комнатной температуре и считывали через 18-20 часов после добавления реагентов для окончательного анализа с помощью планшет-ридера Tecan Infinite M1000 PRO. Результаты наносили на график как отношение [pAKT]/[AKT] для каждого образца (n = 3 клеточных репликата), а регрессию EC₅₀ [log(агонист) относительно ответа (три параметра)] получали с помощью GraphPad Prism 8.

Этическое одобрение исследований, включая эксперименты на животных: Все исследования на животных проводили в соответствии с рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных; все протоколы (протокол № 32873) были одобрены Стэнфордским институциональным комитетом по уходу и использованию животных до проведения исследования.

Стрептозотозин (STZ)-индуцированная модель диабета у крыс: Для экспериментов использовали самцов крыс Sprague Dawley (Charles River). Исследования на животных проводились в соответствии с рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных; все протоколы были одобрены Стэнфордским институциональным комитетом по уходу и использованию животных. Протокол, используемый для индукции STZ, адаптирован из протокола Wu и Huan и был описан ранее. Самцов крыс Sprague Dawley массой 180-250 г (8-10 недель) взвешивали и не кормили утром (6-8 часов) перед введением STZ во второй половине дня. Предварительно взвешенный STZ защищали от света и разбавляли до концентрации 10-20 мг/мл в 1 мл цитратно-натриевого буфера (pH=4,5) непосредственно перед инъекцией. Крысам внутрибрюшинно вводили раствор STZ (65 мг/кг). Крысы получали воду, содержащую 10% сахарозы, в течение 24 часов после введения STZ. Через три дня после введения STZ уровни глюкозы в крови крыс анализировали на предмет гипергликемии посредством забора крови из хвостовой вены и использования портативного глюкометра Bayer Contour Next (Bayer). Впоследствии мониторинг уровня глюкозы проводили ежедневно. Диабет определяли как наличие 3 подряд измерений глюкозы в крови >400 мг/дл у крыс не натошак.

Фармакодинамика in vivo у крыс с диабетом: Крысы с диабетом не получали пищи в течение 4-6 часов. Для первоначальных исследований уровня глюкозы в крови крысам вводили подкожно (1,5 Ед/кг) следующие составы: (i) HUMULIN[®] или (ii) HUMULIN[®] с 0,01 мас. % вспомогательного вещества AC/DC (MoNi₂₃%, MpPhe₈%, MoPhe₆%). Составы HUMULIN[®] тестировали в шести моментах времени выдерживания: 0, 0,5, 1, 2, 4 и 6 месяцев, а HUMULIN[®] с вспомогательным веществом AC/DC тестировали в моменты времени выдерживания: 0, 2, 4 и 6 месяцев. Приготовление препаратов было распределено так, чтобы все образцы достигли окончания периода своего выдерживания в одно и то же время, и все моменты времени выдерживания можно было сравнить в одной и той же когорте крыс. 32 крысы с уровнем глюкозы натощак >300 мг/дл были рандомизированы в группы, получавшие состав (8 крыс в группе), и каждая крыса получала этот состав на всех уровнях выдерживания (порядок моментов времени выдерживания, в которые крысы получали состав, также определялся случайным образом). Для исследования уровня глюкозы в крови после выдерживания состава при 50 °С крысам подкожно вводили (1,5 ЕД/кг) следующие составы: (i) HUMULIN[®], (ii) выдержанный HUMULIN[®] (t = 1 день), (iii) HUMULIN[®] + MoNi₂₃%, или (iv) выдержанный HUMULIN[®] + MoNi₂₃% (t = 4 дня). 16 крыс с уровнем глюкозы натощак >300 мг/дл были рандомизированы либо в контрольную группу HUMULIN[®], либо в группу MoNi₂₃%. В обеих группах порядок назначения выдержанных составов также был рандомизированным, и составы вводили в отдельные экспериментальные дни. Перед инъекцией измеряли исходный уровень глюкозы в крови. После инъекции кровь брали каждые 30 минут в течение 5 часов. Уровень глюкозы в крови измеряли с помощью портативного глюкометра. Максимальное изменение уровня глюкозы в крови, измеренное по сравнению с исходным уровнем, использовали в качестве показателя биологической активности каждого состава для оценки биологической активности in vivo после выдерживания.

Фармакокинетика in vivo у крыс с диабетом: Крысы с диабетом не получали пищи в течение 4-6 часов. Для фармакокинетических исследований крысам вводили подкожно (1,5 Ед/кг) следующие составы: (i) HUMULIN[®], (ii) выдержанный HUMULIN[®] (t = 6 месяцев), (iii) HUMULIN[®] + MoNi₂₃%, или (iv) выдержанный HUMULIN[®] + MoNi₂₃% (t = 6 месяцев). 16 крыс с диабетом были рандомизированы в группу для получения состава: HUMULIN[®] или HUMULIN[®] + MoNi₂₃% (8 крыс/группу). В каждой группе крысы получали как свежие (t = 0 месяцев), так и выдержанные (t = 6 месяцев) составы в рандомизированном порядке. После подкожной инъекции образцы крови брали каждые 15 минут в течение 2 часов и кровь собирали в пробирки для сыворотки (Sarstedt) с целью

проведения анализа ELISA. Концентрации инсулина в сыворотке определяли количественно с помощью набора Human Insulin ELISA (Mercodia).

Статистические данные: Все данные приведены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка, если не указано иное. Для анализа активности *in vitro* (АКТ) регрессию EC_{50} ($\log(\text{агонист})$ по сравнению с ответом (три параметра)) строили с помощью GraphPad Prism 8. Дополнительный F-критерий суммы квадратов GraphPad Prism 8 использовали для проверки того, различается ли $\log(EC_{50})$ между наборами данных. Наборы данных сравнивали попарно, и для корректировки множественных сравнений применяли апостериорный критерий Бонферрони (альфа = 0,008). Для измерения уровня глюкозы в крови использовали смешанную модель повторных измерений REML для проверки различий в разные моменты времени выдерживания в составе (JMP Pro 14). Крыса была включена как случайный эффект, а период выдерживания состава как внутрисубъектный фиксированный эффект. Апостериорный критерий Тьюки HSD применяли для составов HUMULIN[®] с целью определения статистической значимости между моментами времени выдерживания.

Результаты

Характеризация синтезированных сополимеров: Композицию и молекулярные массы синтезированных сополимеров определяли методами ¹H ЯМР- и SEC-спектроскопии со стандартами полиэтиленгликоля (Таблица 8).

Таблица 8. Характеризация сополимеров

Носитель	мас. % (Целевой)	мас. % по ЯМР (Эксп.)	Допант	мас. % (Целевой)	мас. % по ЯМР (Эксп.)	M_n^a (Да)	M_w^a (Да)	$\bar{D}^a$
MORPH	77	74,5 ^b	NIP	23	25,5 ^b	3200	3800	1,19
MORPH	94	93,7 ^c	PHE	6	6,3 ^c	2900	3400	1,17
MPAM	92	91 ^d	PHE	8	9 ^d	5000	5400	1,08

^a Определено с помощью эксклюзионной хроматографии, откалиброванной с применением образцов полиэтиленгликоля.

^b Массовые проценты трудно определить из-за перекрывающихся спектров. Массовые проценты, рассчитанные из постосажденных ЯМР спектров путем измерения более разрешенной левой половины пика Nipam ($\delta = 4,0, 0,5$ Н), удвоения его и вычитания из неразрешенных пиков MORPH и Nipam ($\delta = 3,2-4,2, 7$ Н (MORPH) 1Н (Nipam)).

^c Массовые проценты, рассчитанные из постосажденных ЯМР спектров Morph ($\delta = 3,3-3,7, 8$ Н) и Phe ($\delta = 7,6, 2$ Н).

^d Массовые проценты, рассчитанные из постосажденных ЯМР спектров Mp ($\delta = 3,1-3,5, 7$ Н) и Phe ($\delta = 7,6, 2$ Н).

Механизм стабилизации инсулина посредством вспомогательного вещества AC/DC: Были протестированы три амфифильных вспомогательных вещества AC/DC, которые, как было продемонстрировано, стабилизируют мономерный инсулин. Эти вспомогательные вещества состояли из акрилоилморфолина (MORPH или Mo) или метоксипропилакриламида (MPAM) в качестве гидрофильного мономера-носителя, сополимеризованного либо с N-изопропилакриламидом (NIP или Ni), либо с фенилакриламидом (PHE) в качестве гидрофобного мономера-допанта. Чтобы проверить, занимают ли эти вспомогательные вещества преимущественно границу раздела воздух-вода и, следовательно, ингибируют ли взаимодействия инсулин-инсулин, происходящие на этих границах раздела (Фиг. 28), проводили эксперименты по измерению поверхностного натяжения и межфазной реологии с временным разрешением с модельным вспомогательным веществом AC/DC, поли(акрилоилморфолин_{77%}-со-N-изопропилакриламид_{23%}) (MoNi_{23%}), составленным совместно с коммерческим продуктом HUMULIN[®] R (Eli Lilly) (Фиг. 29).

Измерения равновесного поверхностного натяжения HUMULIN[®] R, HUMULIN[®] R, содержащего MoNi_{23%} (0,01 мас. %), и раствора MoNi_{23%} (0,01 мас. %), содержащего те же вспомогательные вещества состава (т.е. HUMULIN[®] R без инсулина), показали, что наличие MoNi_{23%} привело к значениям поверхностного натяжения значительно ниже HUMULIN[®] R (приблизительно 42 против 47 мН/м, Фиг. 29B). Более того, десятикратное увеличение концентрации MoNi_{23%} (0,1 мас. %) еще больше снижало поверхностное натяжение состава (Фиг. 30). Снижение поверхностного натяжения при добавлении MoNi_{23%} к HUMULIN[®] указывает на то, что при совместном составлении MoNi_{23%} и HUMULIN[®], по сравнению с HUMULIN[®] в отдельности, на границе раздела фаз присутствует больше видов. Пониженное поверхностное натяжение, сопровождающееся повышенной концентрацией MoNi_{23%} в отсутствие HUMULIN[®], указывает на то, что поверхность не была насыщена при 0,01 мас. % MoNi_{23%}. Однако поверхностное натяжение одинаково для композиций HUMULIN[®] и MoNi_{23%} и MoNi_{23%} с вспомогательными веществами композиции, что указывает на одинаковое количество молекулярных частиц на границе раздела независимо от наличия HUMULIN[®]. В совокупности эти эксперименты с измерением поверхностного натяжения позволяют продемонстрировать, что MoNi_{23%} предпочтительно адсорбирует и доминирует на границе раздела воздух-вода.

Измерения реологии межфазного сдвига продемонстрировали, что добавление MoNi_{23%} (0,01 мас. %) к HUMULIN[®] R снижало межфазную комплексную вязкость ниже

предела обнаружения прибора по сравнению с HUMULIN® R, который имел значения в диапазоне 0,002 - 0,003 Па·с·м (Фиг. 29С). Комплексная вязкость HUMULIN® свидетельствует об ассоциативных взаимодействиях инсулин-инсулин, которые могут рассеивать энергию вязкости на границе раздела. Хотя это и не является количественным показателем, снижение межфазной комплексной вязкости ниже пределов обнаружения прибора указывает на то, что добавление MoNi₂₃% нарушает взаимодействие инсулин-инсулин на границе раздела.

Когда эта комплексная граница раздела подвергается межфазным напряжениям и встряхиванию, вполне вероятно, что эти ассоциации инсулин-инсулин могут вызывать образование амилоидных фибрилл и приводить к агрегации. В совокупности эксперименты по поверхностному натяжению и межфазной реологии указывают на механизм AC/DC-усиленной стабилизации инсулина, при котором преимущественная адсорбция вспомогательного вещества AC/DC на поверхности раздела воздух-вода нарушает взаимодействия инсулин-инсулин.

Вспомогательные вещества AC/DC для долгосрочной стабильности инсулина:

Оценивали способность вспомогательных веществ AC/DC MoNi₂₃%, поли(акрилоилморфолин₉₄%-со-фенилакриламид₆%) (MoPhe₆%) и поли(метоксипропилакриламид₉₂%-со-фенилакриламид₈%) (MrPhe₈%) действовать как простые «вставные» вспомогательные вещества для стабилизации HUMULIN® R в процессе стрессового выдерживания. Составы HUMULIN®, взятого отдельно, или HUMULIN® с добавленным вспомогательным веществом AC/DC готовили и выдерживали в течение 0, 2, 4 или 6 месяцев при 37 °C с постоянным перемешиванием (150 г/м на орбитальном шейкере). Приготовление составов проводили в шахматном порядке, чтобы все образцы достигли окончания периода своего выдерживания в одно и то же время. Для определения наличия агрегации инсулина применяли как визуальный осмотр, так и анализ пропускания (Фиг. 31). Агрегаты инсулина рассеивают свет, поэтому агрегация может быть определена как изменение пропускания более чем на 10%. HUMULIN®, взятый отдельно, начал агрегировать после 2 недель стрессового выдерживания. В отличие от этого, все составы инсулина, содержащие вспомогательные вещества AC/DC MoPhe₆%, MrPhe₈% и MoNi₂₃% в концентрациях 0,01, 0,1 или 0,5 мас. %, не продемонстрировали никаких признаков агрегации инсулина в течение 6 месяцев исследования, за исключением MrPhe₈% в концентрации 0,5 мас. % (Фиг. 31В и Фиг. 32). Таким образом, чтобы минимизировать количество сополимерного вспомогательного вещества в составе, для остальных исследований, описанных в данном документе, применяли только составы 0,01 мас. %.

Для дальнейшего подтверждения результатов пропускания, которые характеризовали только агрегацию инсулина, активность *in vitro* оценивали путем анализа фосфорилирования Ser⁴⁷³ на протеинкиназе В (АКТ) после стимуляции клеток C2C12 с помощью либо HUMULIN[®], либо HUMULIN[®], содержащим MoNi₂₃% (0,01% мас. %) как в момент времени 0 месяцев, так и в момент времени 6 месяцев (Фиг. 31C-31D). Свежие составы и выдержанный состав HUMULIN[®]+MoNi₂₃% продемонстрировали эквивалентную биологическую активность (HUMULIN[®] t=0 Log(EC₅₀) = 2,252 ± 0,158; MoNi₂₃%, t=0 Log(EC₅₀) = 2,448 ± 0,186; MoNi₂₃%, t=6 Log(EC₅₀) = 2,405 ± 0,158), тогда как выдержанный HUMULIN[®] R демонстрировал почти полную потерю биологической активности (HUMULIN[®] t=6 Log(EC₅₀) = 3,606 ± 0,139) (Фиг. 31C-31D).

Хотя эти результаты анализа АКТ *in vitro* подтверждают данные о пропускании, целостность состава инсулина дополнительно подтверждали с помощью кругового дихроизма для наблюдения за вторичной структурой инсулина для каждого момента времени состава (Фиг. 31E-31H). Составы, стабилизированные вспомогательными веществами AC/DC, не демонстрировали изменений вторичной структуры после стрессового выдерживания, тогда как HUMULIN[®], взятый отдельно, утратил все структурные характеристики через 1 месяц. Эти данные подтверждают данные как о пропускании, так и об активности *in vitro*.

Биоактивность выдержанного инсулина у крыс с диабетом. Чтобы проанализировать целостность выдержанных составов инсулина в функциональных условиях *in vivo*, оценивали активность составов у крыс с диабетом. Стрептозотоцин вводили для индукции инсулинозависимого диабета в когорте, состоящей из 32 самцов крыс. Этим крыс случайным образом распределяли в одну из четырех групп для получения составов: (i) HUMULIN[®] или HUMULIN[®], содержащий либо (ii) MoPhe₆%, (iii) MrPhe₈% или (iv) MoNi₂₃% в количестве 0,01 мас. %, и каждая крыса получала этот состав в каждый момент времени выдерживания (0, 2, 4, 6 месяцев). Приготовление препаратов было распределено так, чтобы все образцы достигли окончания периода своего выдерживания в одно и то же время, и все моменты времени выдерживания можно было сравнить в одной и той же когорте крыс. Инсулин вводили подкожно крысам натошак (1,5 ЕД/кг) и измеряли уровень глюкозы в крови каждые 30 минут. Активные составы приводили к отчетливому начальному снижению уровня глюкозы в крови от экстремальной гипергликемии, которая достигала минимума в диапазоне нормогликемии между 60-100 минутами после введения (Фиг. 33 и Фиг. 34). После этой фазы уровень глюкозы в крови начинал повышаться по мере выведения инсулина. Напротив, составы, которые агрегировали в анализах пропускания *in vitro* после выдерживания, не

демонстрировали этого отчетливого снижения уровня глюкозы, напоминающего действие инсулина, а вместо этого приводили к постепенному снижению уровня глюкозы. Постепенное снижение уровня глюкозы может свидетельствовать о том, что часть инсулина первоначально задерживается в обратимых агрегатах, а со временем эти агрегаты диссоциируют и приводят к эффекту медленно действующего инсулина. Максимальное отличие уровня глюкозы крови от исходного уровня до минимального уровня глюкозы наносили на график для каждого состава в качестве меры эффективности состава. Все составы, стабилизированные сополимером, не демонстрировали различий в активности между моментами времени выдерживания, но HUMULIN[®], взятый отдельно, продемонстрировал большую разницу между моментами времени выдерживания ($F_{3,21}=23,83$, $P<0,0001$), при этом апостериорный критерий Тьюки HSD показал, что HUMULIN[®] после 2, 4 и 6 месяцев выдерживания имели пониженную активность по сравнению со свежим HUMULIN[®] ($t=0$ месяцев). Эти наблюдения были подтверждены оценкой фармакокинетики инсулина, при которой не наблюдалось различий между свежим HUMULIN[®] R ($t=0$ месяцев) и изначально HUMULIN[®]+MoNi_{23%} ($t=0$ месяцев) и после 6 месяцев выдерживания, но снижение экспозиции наблюдалось для выдержанного HUMULIN[®] ($t=6$ месяцев) (Фиг. 33F и Фиг. 35). Эти данные свидетельствуют о том, что вспомогательные вещества AC/DC действуют как стабилизирующие ингредиенты для коммерческих препаратов, таких как HUMULIN[®] R, без изменения фармакокинетики или фармакодинамики инсулина.

Выдерживание составов инсулина при высокой температуре: Для определения способности вспомогательных веществ AC/DC улучшать устойчивость инсулина к холодной цепи, оценивали степень стабильности, обусловленную MoNi_{23%}, в экстремальных условиях изготовления и распространения (37 °C и 50 °C при постоянном перемешивании) (Фиг. 36). Температуры были выбраны таким образом, чтобы представлять температуру в жаркий летний день (37 °C), а также верхний температурный диапазон, которого может достичь грузовой контейнер или грузовик без охлаждения или изоляции в разгар лета (50 °C). HUMULIN[®] R можно приобрести в стеклянных флаконах объемом 10 мл, упакованных и отправляемых в картонных коробках (Фиг. 36 А и Фиг. 37). MoNi_{23%} (0,01 мас. %) добавляли в новые флаконы с HUMULIN[®] R с помощью шприца (разведение от 100 ЕД/мл до 95 ЕД/мл для добавления сополимера; контрольный флакон разбавляли водой), после чего флаконы помещали обратно в оригинальную картонную упаковку с вкладышем (Фиг. 37А). Картонную упаковку закрепляли на ротационном шейкере в инкубаторе с регулируемой температурой и перемешивали при 150 RPM (Фиг. 37В).

Визуальный осмотр в сочетании с анализом пропускания применяли в качестве первичных показателей целостности инсулина (Фиг. 36А). Эти анализы соответствовали полученным ранее результатам экспериментов, которые продемонстрировали, что показания пропускания хорошо коррелируют с результатами анализа функциональной активности *in vitro* и *in vivo*. При температуре 37 °С, HUMULIN[®], взятый отдельно, начал демонстрировать визуальные изменения помутнения в день 1 и стал полностью непрозрачным ко дню 2. Напротив, при составлении с MoNi_{23%}, инсулиновый состав не демонстрировал визуальных изменений помутнения до дня 56 и оставался ниже 10%-ного изменения светопропускания в течение 56 дней. При 50 °С, коммерческий HUMULIN[®] становился полностью непрозрачным в течение одного дня. В отличие от этого, состав с MoNi_{23%} сохранял стабильность в этих экстремальных условиях до 4 дней, прежде чем помутнел на день 5. Эти качественные наблюдения соответствовали количественным показателям пропускания (Фиг. 36В-36С).

Чтобы проверить функциональную активность инсулина после выдерживания при 50 °С *in vivo*, эти составы оценивали у крыс с диабетом. Способность (i) HUMULIN[®] (t = 0 дней), (ii) выдержанного HUMULIN[®] (t = 1 день), (iii) HUMULIN[®] с MoNi_{23%} (t = 0 дней) или (iv) выдержанного HUMULIN[®] с MoNi_{23%} (t = 4 дня) снижать уровень глюкозы измеряли у крыс с диабетом натощак. После подкожного введения составов (1,5 ЕД/кг) уровень глюкозы в крови измеряли каждые 30 минут (Фиг. 36D). HUMULIN[®] (t = 0 дней), HUMULIN[®] с MoNi_{23%} (t = 0 дней) и выдержанный HUMULIN[®] с MoNi_{23%} (t = 4 дня) продемонстрировали начальное снижение уровня глюкозы в крови, которое достигло минимума через 60-100 минут после введения. Эти результаты согласуются с результатами активных составов в более ранних экспериментах. Характерное падение уровня глюкозы отсутствовало у крыс, получавших выдержанный HUMULIN[®] (t = 1 день), что согласуется с результатами неактивных составов в более ранних экспериментах. Максимальное отличие уровня глюкозы от исходного уровня также наносили на график для каждого состава в качестве меры активности состава. (Фиг. 36Е).

Статистический анализ выявил разницу между активностью этих составов (F_{3, 18,18} = 10,71, P = 0,0003), при этом апостериорный критерий Тьюки HSD показал, что выдержанный HUMULIN[®], вводимый отдельно, имеет значительно сниженную активность по сравнению с другими составами. В отличие от этого, не было статистической разницы между невыдержанным HUMULIN[®], невыдержанным HUMULIN[®] с MoNi_{23%}, а также выдержанным HUMULIN[®] с MoNi_{23%} после стрессового выдерживания при 50 °С в течение 4 дней.

Разнообразные модификации изобретения, в дополнение к описанным в данном документе, будут очевидны квалифицированным специалистам в данной области техники из предыдущего описания. Такие модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сополимер на основе полиакриламида, содержащий:
водорастворимый мономер-носитель, выбранный из группы, состоящей из *N*-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), *N,N*-диметилакриламида (DMA), *N*-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM); и
функциональный акриламидный мономер-допант, выбранный из группы, состоящей из *N*-[трис(гидроксиметил)метил]акриламида (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой кислоты (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмония хлорида (TMA), *N*-изопропилакриламида (NIP), *N-трет*-бутилакриламида (TBA) и *N*-фенилакриламида (PHE).
2. Сополимер по п. 1, отличающийся тем, что:
водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из *N*-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM) и 4-акрилоилморфолина (MORPH); и
функциональный мономер-допант выбирают из группы, состоящей из *N*-изопропилакриламида (NIP) и *N*-фенилакриламида (PHE).
3. Сополимер по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что массовый процент водорастворимого мономера-носителя составляет от около 70 мас. % до около 98 мас. %, от около 75 мас. % до около 95 мас. % или от около 80 мас. % до около 95 мас. %.
4. Сополимер по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что массовый процент функционального мономера-допанта составляет от около 2 мас. % до около 30 мас. %, от около 5 мас. % до около 25 мас. % или от около 5 мас. % до около 20 мас. %.
5. Сополимер по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что функциональный мономер-допант представляет собой NIP и составляет от около 5% до около 30%, от около 10% до около 28%, от около 2% до около 30%, от около 5% до около 26% или от около 20% до около 26% по массе сополимера.
6. Сополимер по п. 5, отличающийся тем, что водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH.
7. Сополимер по п. 5, отличающийся тем, что водорастворимый мономер-носитель представляет собой MPAM.

8. Сополимер по п. 1, отличающийся тем, что функциональный мономер-допант выбран из группы, состоящей из АМР, ТМА, ТВА и РНЕ, и составляет от около 2% до около 16%, от около 12% до около 15%, от около 5% до около 15%. % или от около 6% до около 14% по массе сополимера.

9. Сополимер по п. 8, отличающийся тем, что водорастворимый мономер-носитель представляет собой MORPH.

10. Сополимер по п. 8, отличающийся тем, что водорастворимый мономер-носитель представляет собой МРАМ.

11. Сополимер по любому из пп. 8-10, отличающийся тем, что мономер-допант представляет собой РНЕ.

12. Сополимер по п. 1, отличающийся тем, что функциональный мономер-допант представляет собой TRI и составляет от около 3% до около 17%, от около 4% до около 6%, от около 7% до около 12% или от около 13% до около 17% по массе сополимера.

13. Сополимер по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что степень полимеризации составляет от около 10 до около 500, от около 20 до около 200 или около 50.

14. Сополимер по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что молекулярная масса сополимера составляет от около 1000 до около 40000 г/моль, от около 1000 до около 30000 г/моль, от около 2000 до около 10000 г/моль, от около 3000 до около 7000 г/моль или от около 4000 до около 6000 г/моль.

15. Сополимер по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что мономер-допант является гидрофобным.

16. Сополимер по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что сополимер является амфифильным.

17. Сополимер на основе полиакриламида, содержащий:
водорастворимый мономер-носитель, содержащий реагирующий с акриламидом фрагмент; а также

функциональный мономер-допант, содержащий реагирующий с акриламидом фрагмент; при этом:

массовый процент водорастворимого мономера-носителя составляет от около 70 мас. % до около 98 мас. %;

массовый процент функционального мономера-допанта составляет от около 2 мас. % до около 30 мас. %;

средняя молекулярная масса (M_n) сополимера на основе полиакриламида составляет от около 1000 г/моль до около 30000 г/моль; а также

степень полимеризации составляет от около 10 до около 250.

18. Сополимер по п. 17, отличающийся тем, что водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из *N*-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM), 4-акрилоилморфолина (MORPH), *N,N*-диметилакриламида (DMA), *N*-гидроксиэтилакриламида (HEAM) и акриламида (AM).

19. Сополимер по п. 18, отличающийся тем, что водорастворимый мономер-носитель выбирают из группы, состоящей из *N*-(3-метоксипропоил)акриламида (MPAM) и 4-акрилоилморфолина (MORPH).

20. Сополимер по любому из пп. 17-19, отличающийся тем, что функциональный акриламидный мономер-допант выбран из группы, состоящей из *N*-[трис(гидроксиметил)метил]акриламида (TRI), 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой кислоты (AMP), (3-акриламидопропил)триметиламмония хлорида (TMA), *N*-изопропилакриламида (NIP), *N*-*трет*-бутилакриламида (TBA) и *N*-фенилакриламида (PHE).

21. Сополимер по п. 20, отличающийся тем, что функциональный мономер-допант выбирают из группы, состоящей из *N*-изопропилакриламида (NIP) и *N*-фенилакриламида (PHE).

22. Композиция, содержащая сополимер на основе полиакриламида по любому из пп. 1-21 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

23. Композиция, включающая сополимер по любому из пп. 1-21, при этом указанная композиция представляет собой косметический продукт, продукт для волос, лосьон, пищевой продукт, ветеринарный продукт или диетический продукт.

24. Композиция, содержащая сополимер по любому из пп. 1-21 и белок.
25. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что указанный белок представляет собой белок, подверженный агрегации в водной среде.
26. Композиция по п. 24 или п. 25, отличающаяся тем, что указанный белок выбирают из группы, состоящей из антител и их фрагментов, цитокинов, хемокинов, гормонов, вакцинных антигенов, раковых антигенов, адъювантов и их комбинаций.
27. Композиция по любому из пп. 24-26, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит белок в концентрации по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза или по меньшей мере в пять раз больше, чем концентрация того же белка в композиции без сополимера.
28. Композиция по п. 26 или п. 27, отличающаяся тем, что указанный белок представляет собой моноклональное антитело.
29. Композиция по любому из пп. 24-28, отличающаяся тем, что белок представляет собой инсулин или его аналог.
30. Композиция по п. 29, отличающаяся тем, что инсулин или его аналог выбирают из группы, состоящей из свиного инсулина, бычьего инсулина, кошачьего инсулина, человеческого инсулина, рекомбинантного инсулина, инсулина лизпро, HUMALOG[®], инсулина гларгина, LANTUS[®], инсулина детемира, LEVEMIR[®], ACTRAPID[®], инсулина модерн, NOVORAPID[®], VELOSULIN[®], HUMULIN[®] M3, HYPURIN[®], INSUMAN[®], INSULATARD[®], MIXTARD[®] 30, MIXTARD[®] 40, MIXTARD[®] 50, инсулина аспарт, инсулина глулизина, инсулина изофана, инсулина деглудека, инсулина икодека, инсулина с цинком пролонгированного действия, NOVOLIN[®] R, HUMULIN[®] R, HUMULIN[®] R regular U-500, NOVOLIN[®] N, HUMULIN[®] N, RELION[®], AFREZZA[®], HUMULIN[®] 70/30, NOVOLIN[®] 70/30, NOVOLOG[®] 70/30, HUMULIN[®] 50/50, HUMALOG[®] mix 75/25, инсулина аспарт протамина-инсулина аспарт, инсулина лизпро протамина-инсулина лизпро, инсулина лизпро протамина-инсулина лизпро, человеческого инсулина NPH-человеческого обычного инсулина, инсулина деглудек-инсулина аспарт и их комбинаций.
31. Композиция по п. 30, отличающаяся тем, что инсулин или его аналог представляет собой человеческий инсулин или рекомбинантный человеческий инсулин.

32. Композиция по любому из пп. 29-31, отличающаяся тем, что инсулин или его аналог содержат около 50 % или более, около 60 % или более, около 70 % или более, около 80 % или более, около 90 % или более или около 99% или более инсулина, присутствующего в мономерной форме.

33. Композиция по любому из пп. 29-32, отличающаяся тем, что концентрация инсулина составляет от около 0,34 мг/мл (10 Ед/мл) до около 34 мг/мл (1000 Ед/мл), от около 1,7 мг/мл (50 Ед/мл) до около 17 мг/мл (500 Ед/мл), около 3,4 мг/мл (100 Ед/мл), около 6,8 мг/мл (200 Ед/мл) или около 10,2 мг/мл (300 Ед/мл).

34. Композиция по любому из пп. 24-33, отличающаяся тем, что концентрация сополимера составляет от около 0,0001% до около 5%, от около 0,001% до около 1% по массе, от около 0,005% до около 0,5% по массе, от около 0,005% до около 0,02% по массе, от около 0,01% до около 0,2% по массе, от около 0,1% до около 0,4% по массе, или от около 0,2% до около 0,3% по массе, около 0,005% по массе, около 0,01% по массе, около 0,05% по массе, около 0,1% по массе, или около 1% по массе композиции.

35. Композиция по любому из пп. 24-34, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит одно или большее количество из следующих компонентов: водный буфер, модификатор тоничности и консервант, а также их комбинации.

36. Композиция по любому из пп. 24-35, отличающаяся тем, что pH композиции составляет от около 4 до около 9 или около 7,4.

37. Композиция по любому из пп. 29-36, дополнительно содержащая глюкагон, агонист GLP-1, глюкозозависимый инсулиотропный полипептид (GIP) или двойной агонист GIP и GLP-1.

38. Композиция по п. 37, отличающаяся тем, что агонист GLP-1 выбирают из группы, состоящей из ликсисенатида, лираглутида, альбиглутида, дулаглутида, эксенатида, эксенатида с пролонгированным высвобождением и семаглутида.

39. Композиция по п. 37, отличающаяся тем, что двойной агонист GIP и GLP-1 представляет собой тирзепатид.

40. Композиция по любому из пп. 29-36, дополнительно содержащая амилин или его аналог.

41. Композиция по п. 40, отличающаяся тем, что аналог амилина представляет собой прамлинтид.

42. Композиция по п. 40 или п. 41, отличающаяся тем, что амилин или его аналог и инсулин или его аналог присутствуют в соотношении от около 1:1 до около 1:20, от около 1:1 до около 1:15, от около 1:1 до около 1:10, от около 1:1 до около 1:6 или около 1:20, около 1:15, около 1:10, около 1:9, около 1:8, около 1:7, около 1:6, около 1:5, около 1:4, около 1:3, около 1:2 или около 1:1.

43. Композиция по любому из пп. 24-42, подходящая для введения человеку или животному.

44. Композиция, содержащая:

около 0,01 мас. % сополимера на основе полиакриламида, содержащего:

от около 74% до около 80% по массе мономера-носителя MORPH; а также

от около 20% до около 26% по массе мономера-допанта NIP; а также

около 100 ЕД/мл инсулина или его аналога.

45. Композиция, содержащая:

около 0,01 мас. % сополимера на основе полиакриламида, содержащего:

от около 74% до около 80% по массе мономера-носителя MORPH; а также

от около 20% до около 26% по массе мономера-допанта NIP;

около 100 ЕД/мл инсулина или его аналога; а также

от около 0,5 мг/мл до около 0,6 мг/мл прамлинтида.

46. Композиция по п. 45, отличающаяся тем, что рН композиции составляет от около 6 до около 8.

47. Композиция по п. 45 или п. 46, отличающаяся тем, что инсулин или его аналог по существу присутствует в мономерной форме.

48. Композиция по любому из пп. 29-47, отличающаяся тем, что сополимер стабилизирует инсулин, так что инсулин проявляет повышенную стабильность при хранении при комнатной температуре по сравнению с такой же инсулиновой композицией, которая не содержит сополимер.

49. Композиция по п. 48, отличающаяся тем, что повышение стабильности составляет по меньшей мере 10-кратное, по меньшей мере 15-кратное, по меньшей мере

20-кратное, по меньшей мере 25-кратное, по меньшей мере 30-кратное, по меньшей мере 35-кратное, по меньшей мере 40-кратное, по меньшей мере 45-кратное, по меньшей мере 50-кратное повышение или более по сравнению с такой же инсулиновой композицией, которая не содержит сополимер.

50. Композиция по любому из пп. 29-49, отличающаяся тем, что инсулин или его аналог содержат около 60 % или более, около 70 % или более, около 80 % или более, около 90 % или более или около 99% или более инсулина в мономерной форме.

51. Композиция по любому из пп. 22-50, отличающаяся тем, что указанная композиция является водной.

52. Способ лечения повышенного уровня глюкозы у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 29-51, при этом повышенный уровень глюкозы ассоциирован с дефицитом инсулина у субъекта.

53. Способ контроля уровня глюкозы в крови у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 29-51.

54. Способ повышения термостабильности белкового состава, включающий добавление к указанному белковому составу от около 0,0005 мас. % до около 5 мас. % сополимера по любому из пп. 1-21.

55. Способ повышения стабильности белкового состава, включающий добавление к указанному белковому составу от около 0,005 мас. % до около 5 мас. % сополимера по любому из пп. 1-21.

56. Способ снижения скорости агрегации белка в водной композиции, включающий добавление к указанному белковому составу от около 0,005 мас. % до около 5 мас. % сополимера по любому из пп. 1-21.

57. Способ по любому из пп. 54-56, отличающийся тем, что белок представляет собой белок, который имеет тенденцию к агрегации в водной среде.

58. Способ по любому из пп. 54-57, отличающийся тем, что указанный белок выбирают из группы, состоящей из антител и их фрагментов, цитокинов, хемокинов, гормонов, вакцинных антигенов, раковых антигенов, адъювантов и их комбинаций.

59. Способ по любому из пп. 54-58, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой моноклональное антитело.

60. Способ по любому из пп. 54-58, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой вакцинный антиген.

61. Способ по любому из пп. 54-58, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой инсулин или его аналог.

62. Способ по п. 61, отличающийся тем, что инсулин или его аналог выбирают из группы, состоящей из свиного инсулина, бычьего инсулина, кошачьего инсулина, человеческого инсулина, рекомбинантного инсулина, инсулина лизпро, HUMALOG[®], инсулина гларгин, LANTUS[®], инсулина детемир, LEVEMIR[®], ACTRAPID[®], инсулина модерн, NOVORAPID[®], VELOSULIN[®], HUMULIN[®]M3, HYPURIN[®], INSUMAN[®], INSULATARD[®], MIXTARD[®] 30, MIXTARD[®] 40, MIXTARD[®] 50, инсулина аспарт, инсулина глулизин, инсулина изофан, инсулина деглудек, инсулина икодек, инсулина с цинком пролонгированного действия, NOVOLIN[®] R, HUMULIN[®] R, HUMULIN[®] R regular U-500, NOVOLIN[®] N, HUMULIN[®] N, RELION[®], AFREZZA[®], HUMULIN[®] 70/30, NOVOLIN[®] 70/30, NOVOLOG[®] 70/30, HUMULIN[®] 50/50, HUMALOG[®] mix 75/25, инсулина аспарт протамина-инсулина аспарт, инсулина лизпро протамина-инсулина лизпро, человеческого инсулина NPH-человеческого обычного инсулина, инсулина деглудек-инсулина аспарт и их комбинаций.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что инсулин или его аналог представляет собой человеческий инсулин или рекомбинантный человеческий инсулин.

64. Способ по любому из пп. 61-63, отличающийся тем, что инсулин представляет собой человеческий инсулин.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что сополимер увеличивает время до агрегации состава человеческого инсулина по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 35 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 45 раз или по

меньшей мере в 50 раз при хранении при температуре 37 °С, как определено с помощью анализа пропускания, по сравнению с составом человеческого инсулина, который не содержит сополимер.

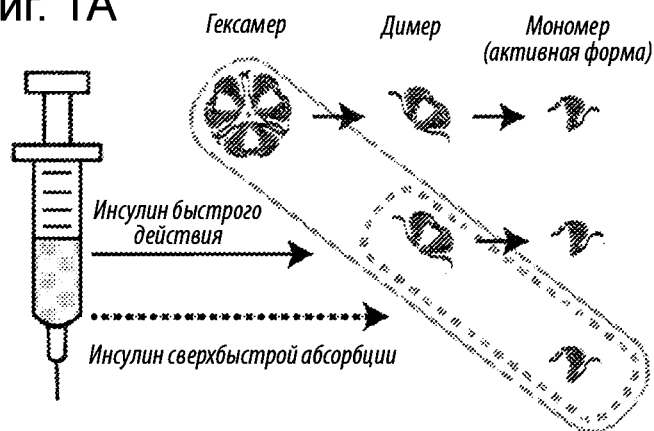
66. Способ по п. 64 или п. 65, отличающийся тем, что сополимер увеличивает время до агрегации состава человеческого инсулина по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 35 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 45 раз или по меньшей мере в 50 раз при хранении при температуре 50 °С, как определено с помощью анализа пропускания, по сравнению с составом человеческого инсулина, который не содержит сополимер.

67. Способ по любому из пп. 64-66, отличающийся тем, что добавление сополимера поддерживает биологическую активность *in vitro* состава человеческого инсулина в течение по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев или по меньшей мере 6 месяцев.

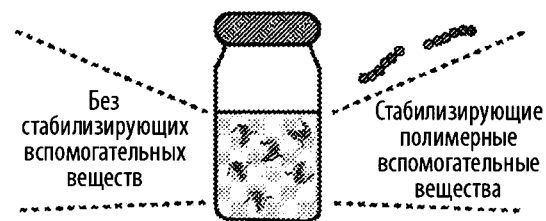
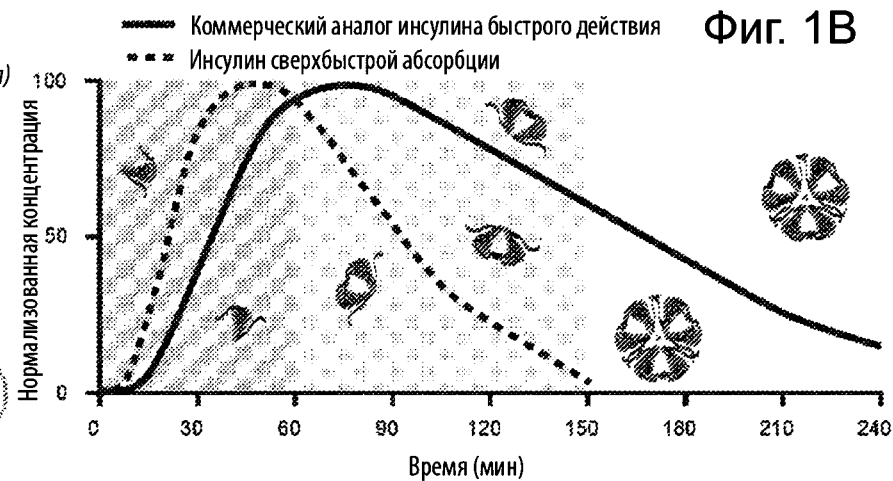
68. Способ по любому из пп. 52-67, отличающийся тем, что указанная композиция является водной.

69. Способ по любому из пп. 52-68, отличающийся тем, что композицию вводят с помощью инфузионных помп или системы искусственной поджелудочной железы с замкнутым циклом.

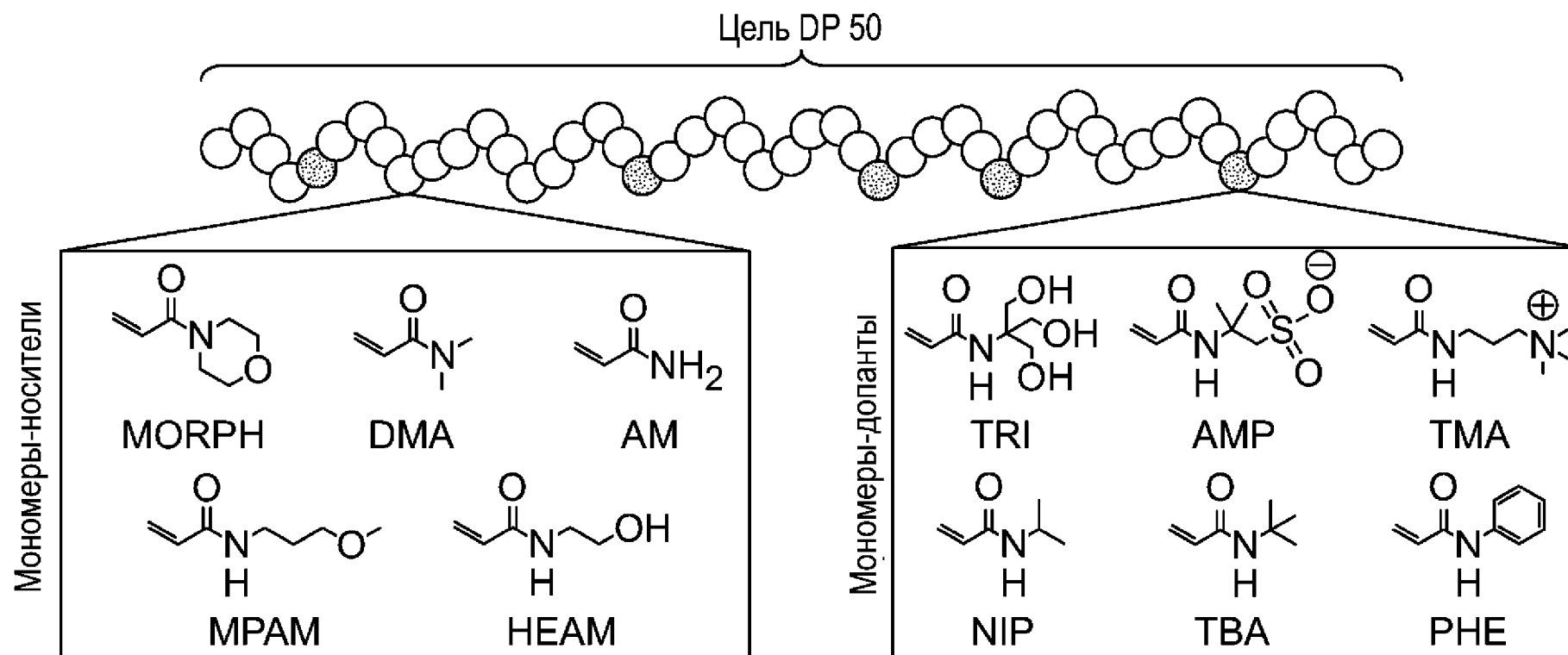
Фиг. 1А



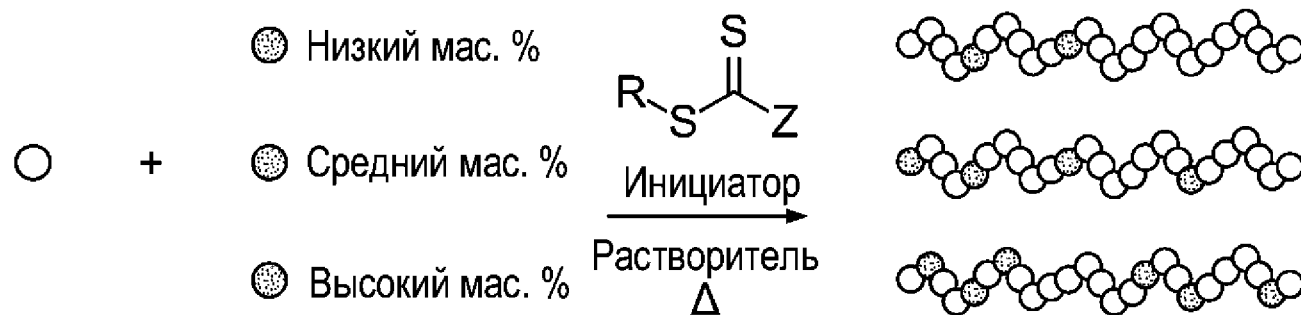
Фиг. 1В



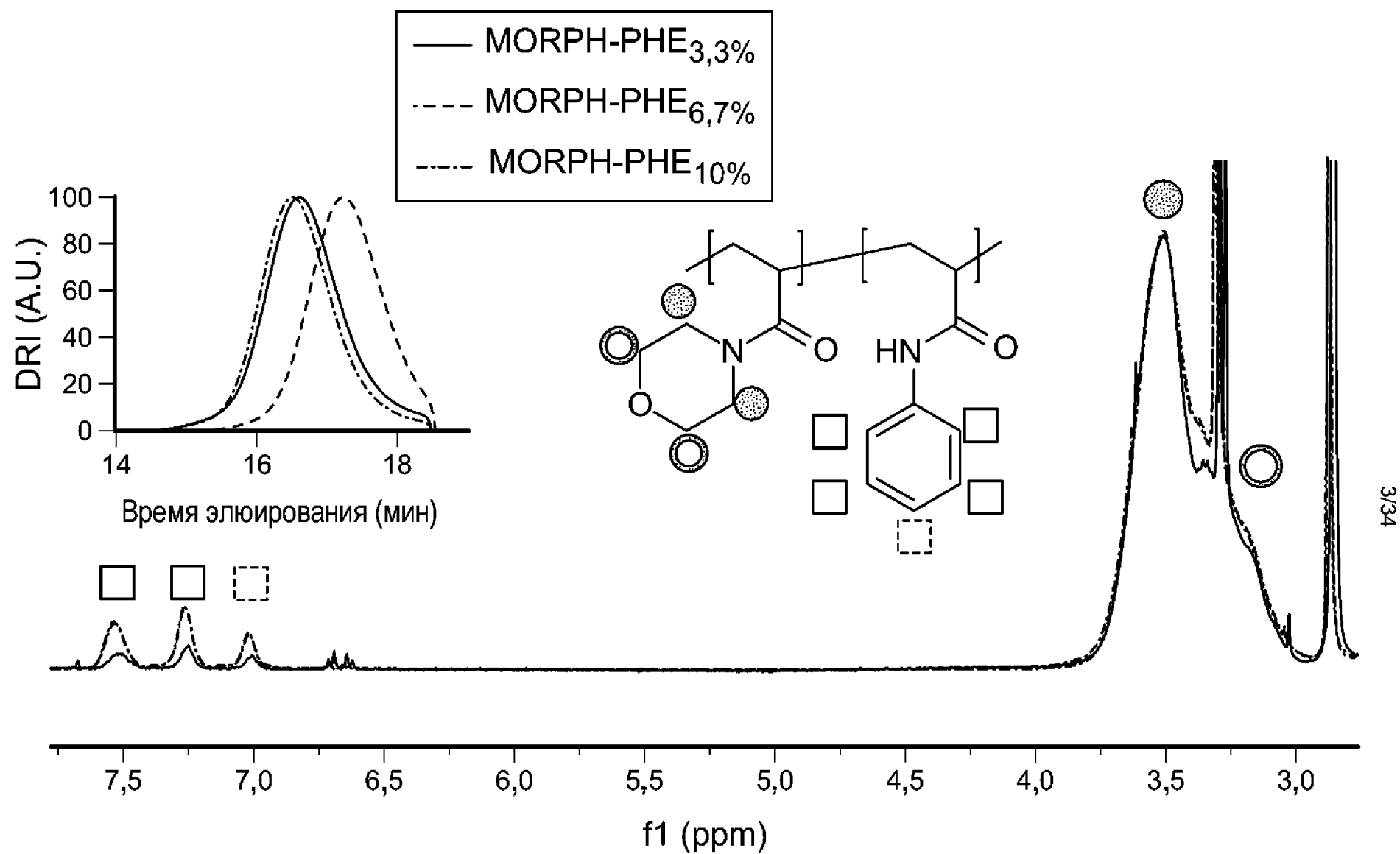
Фиг. 1С



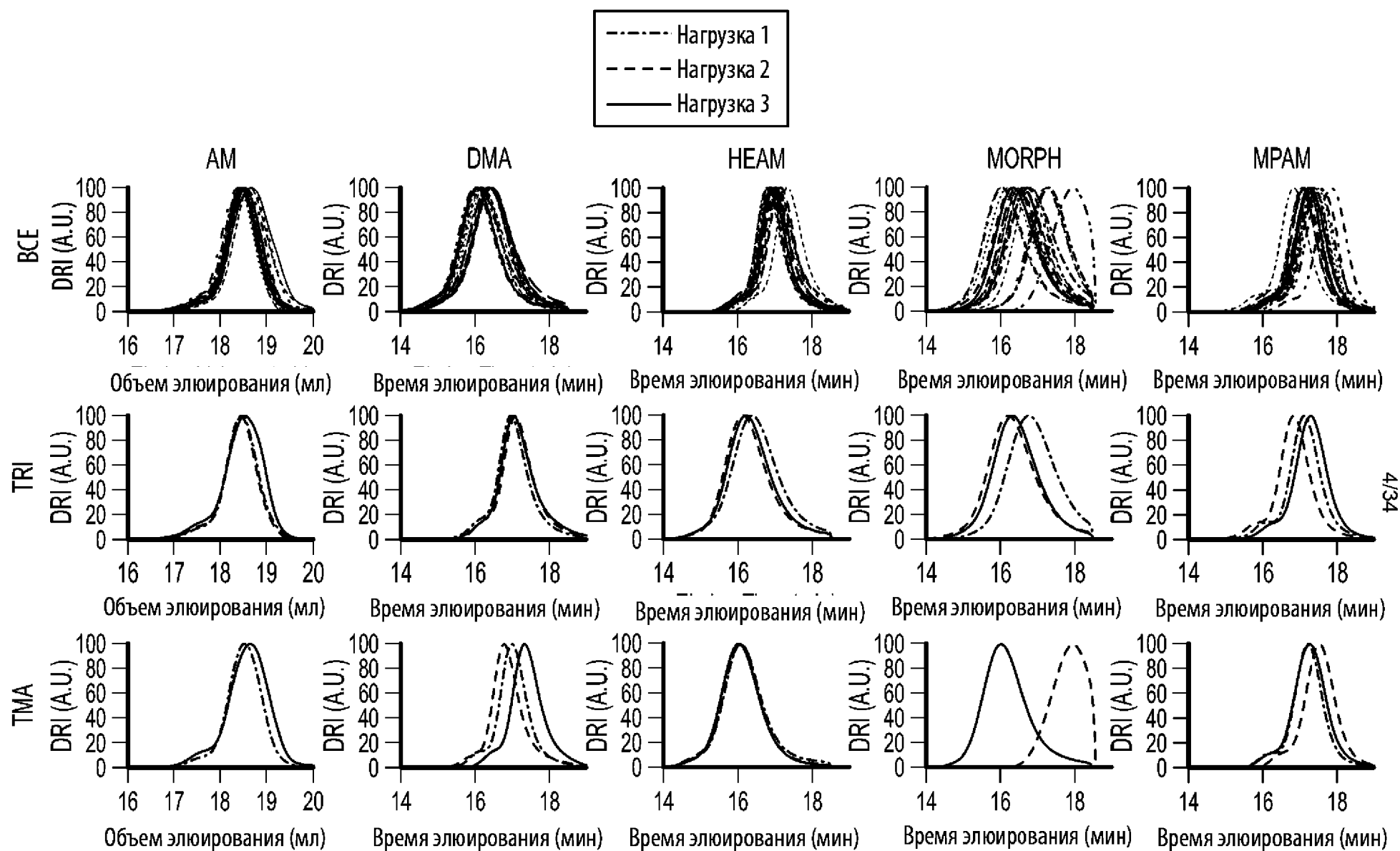
Комбинаторная RAFT полимеризация



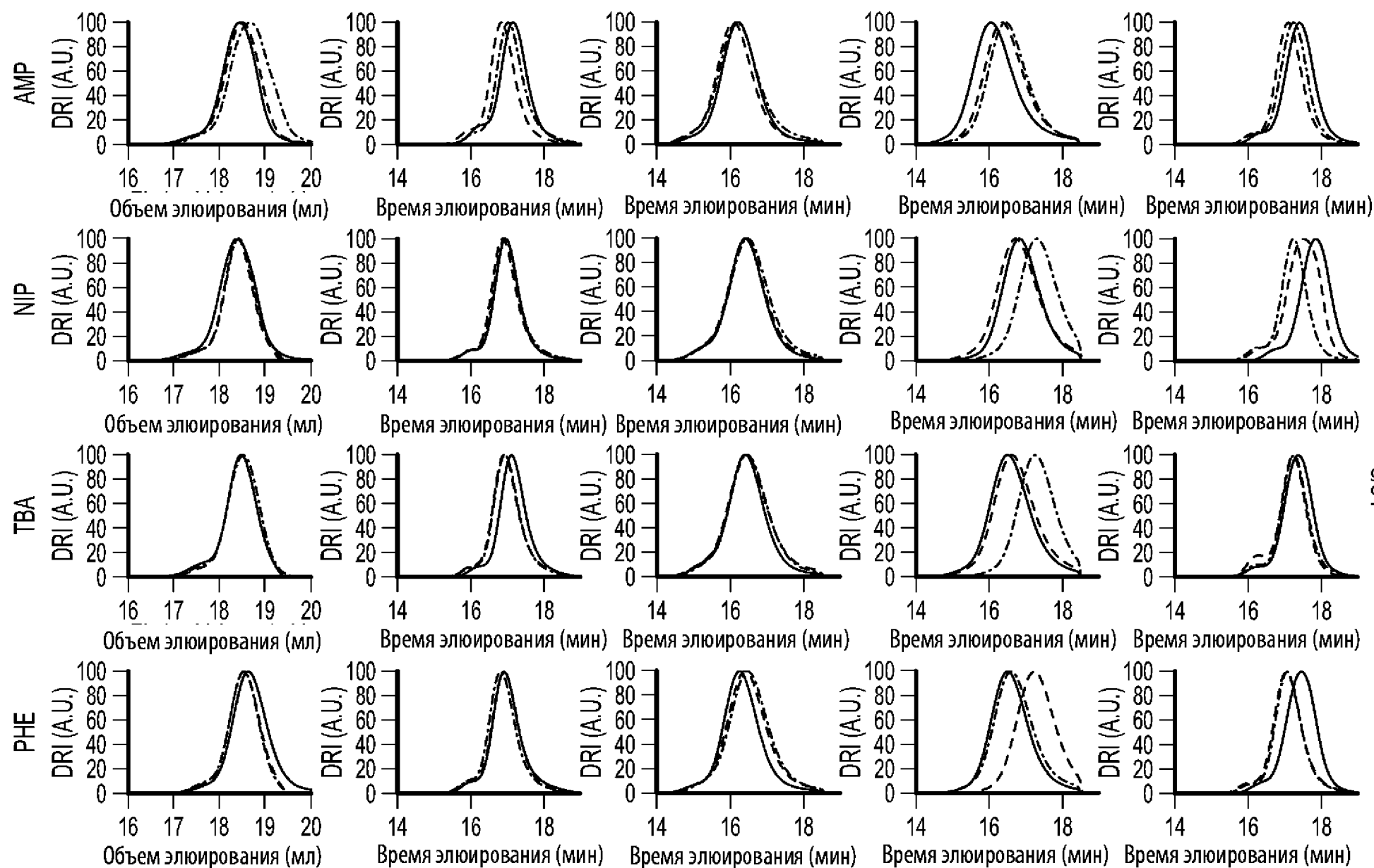
Фиг. 2



Фиг. 3

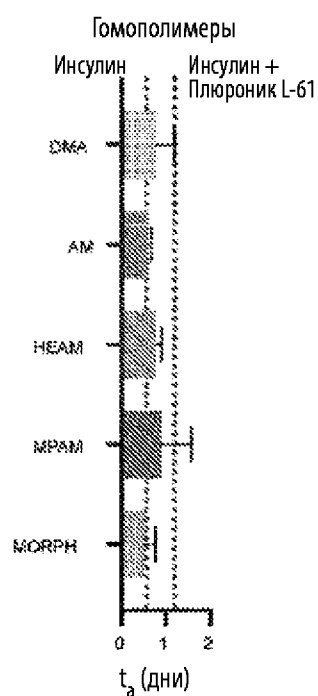


Фиг. 4

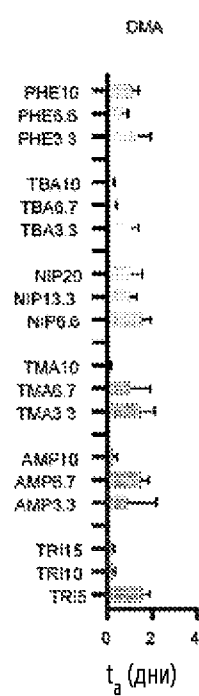


Фиг. 4 (Продолжение)

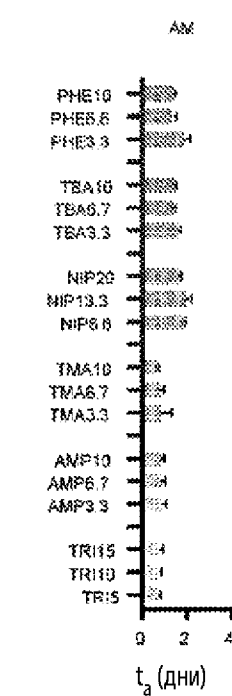
Фиг. 5А



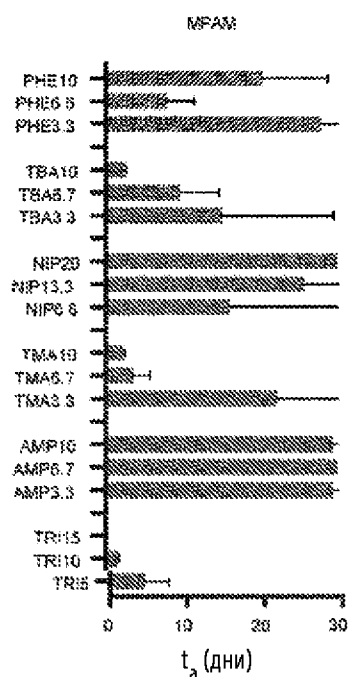
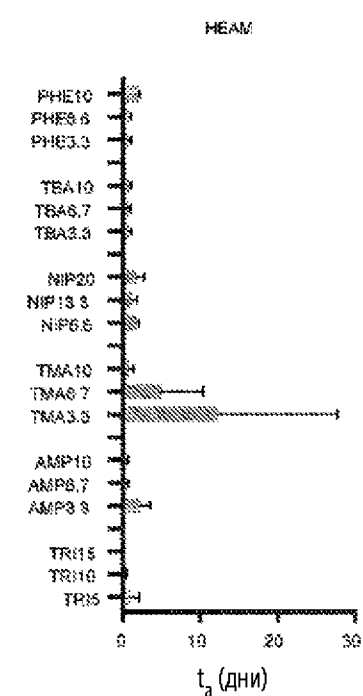
Фиг. 5В



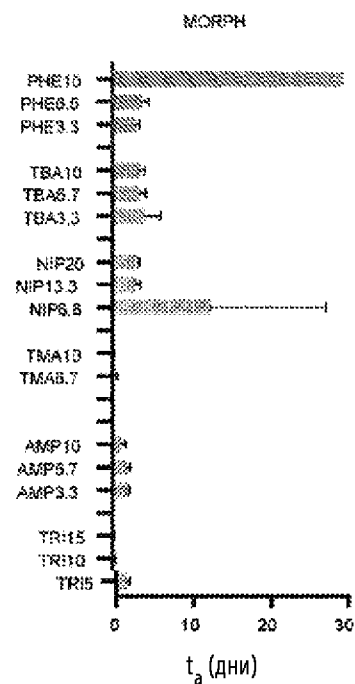
Фиг. 5С



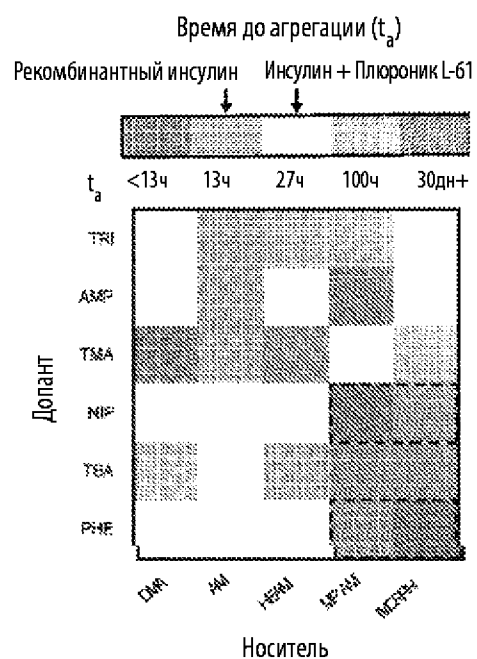
Фиг. 5D



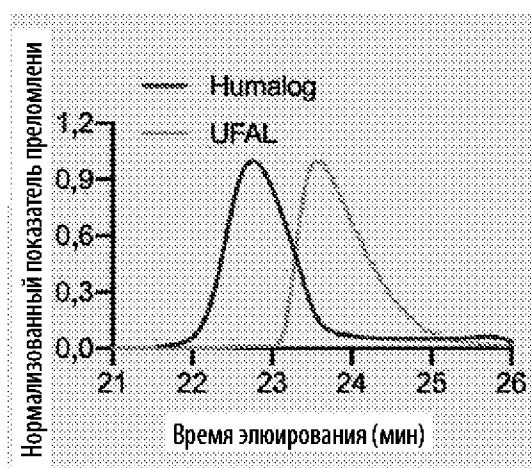
Фиг. 5Е



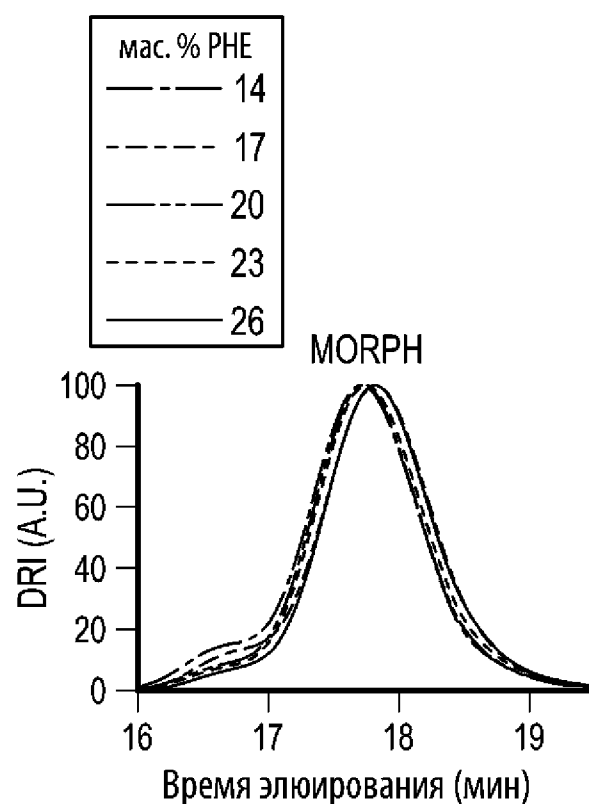
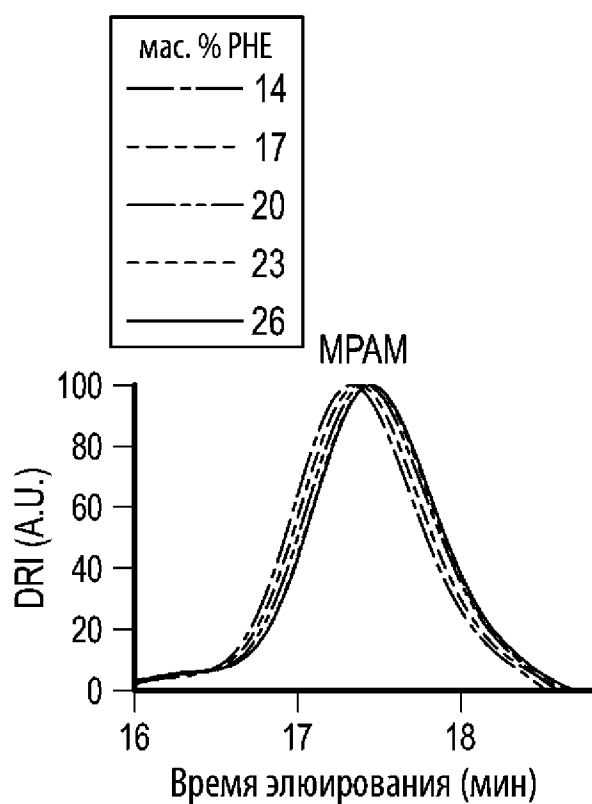
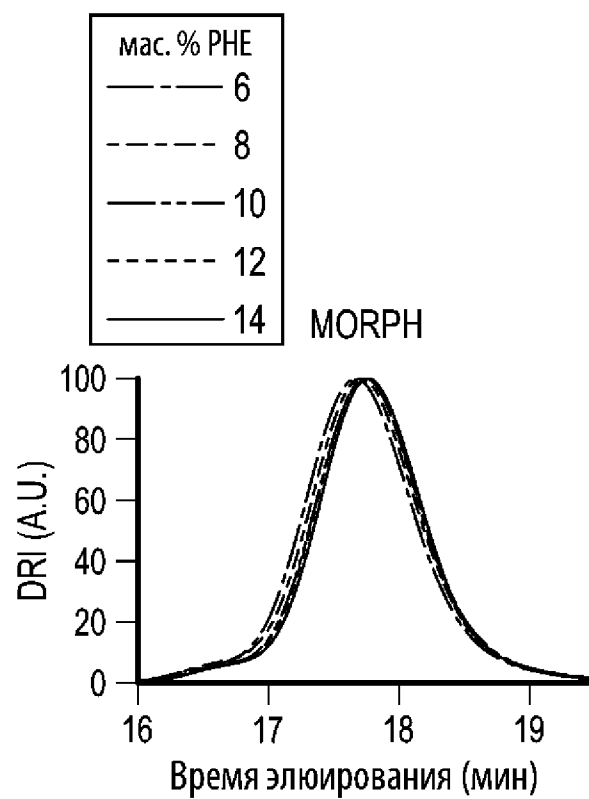
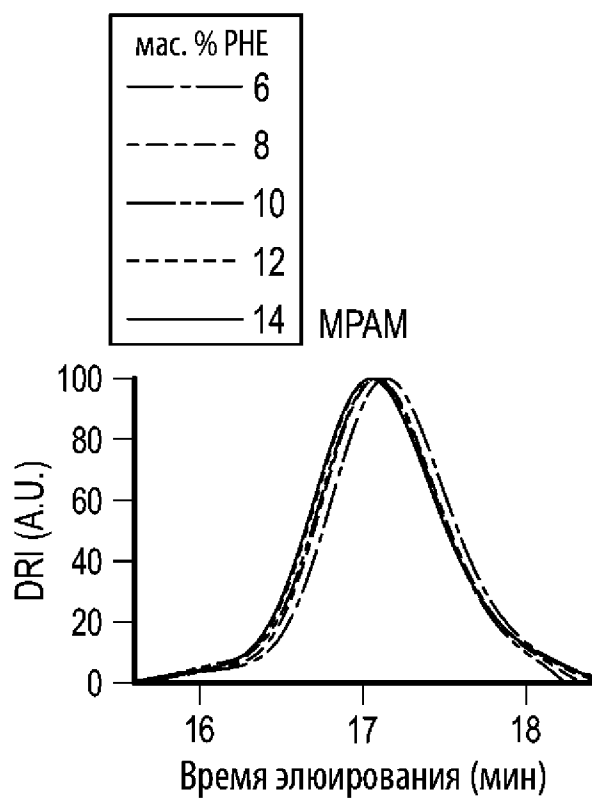
Фиг. 5F

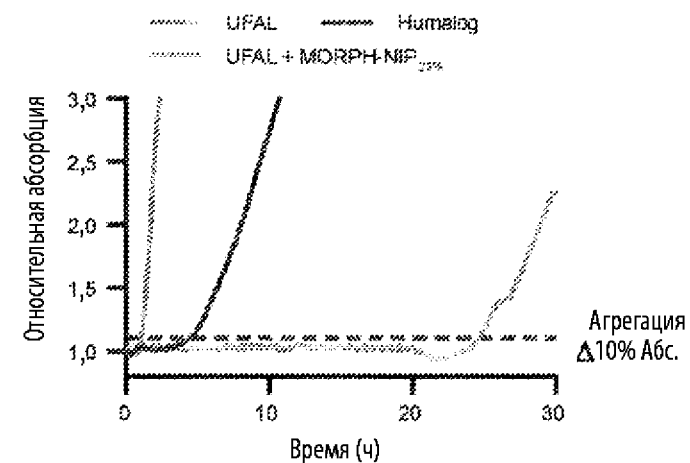
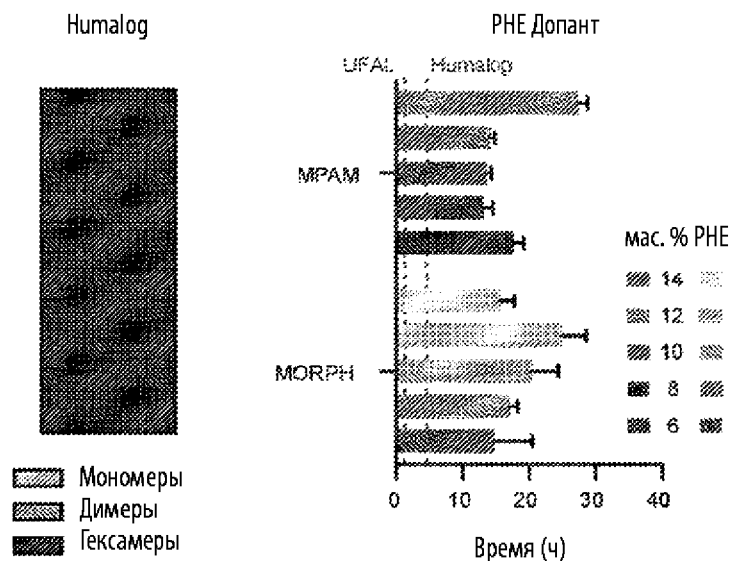


Фиг. 5G

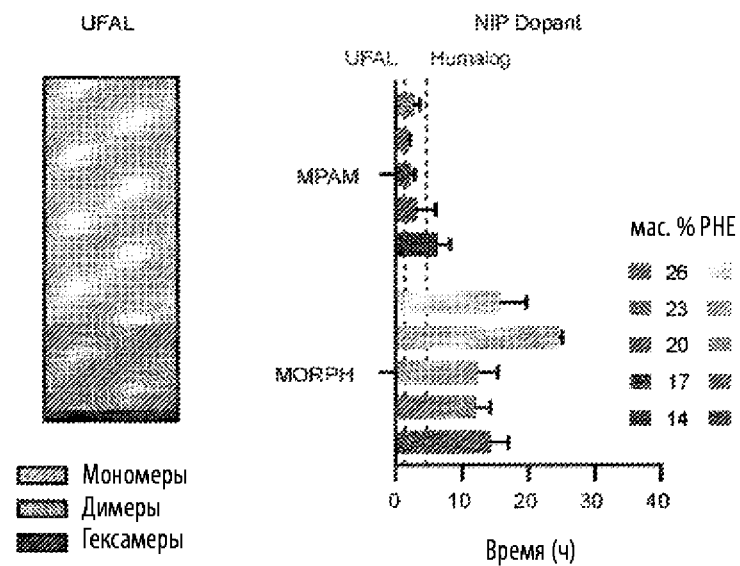


Фиг. 6



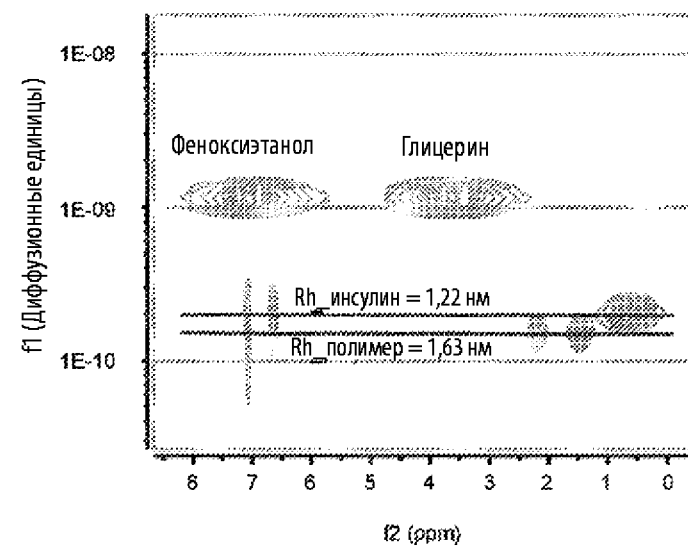


Фиг. 8С

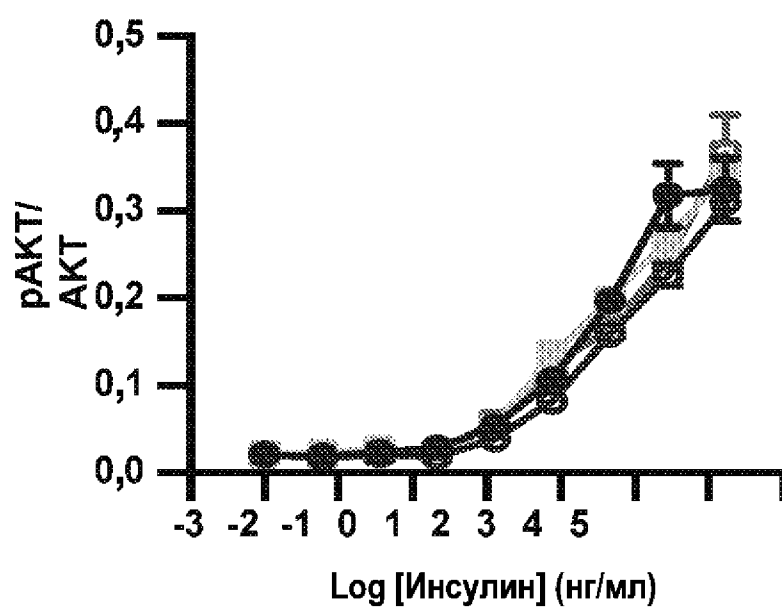


Фиг. 8А

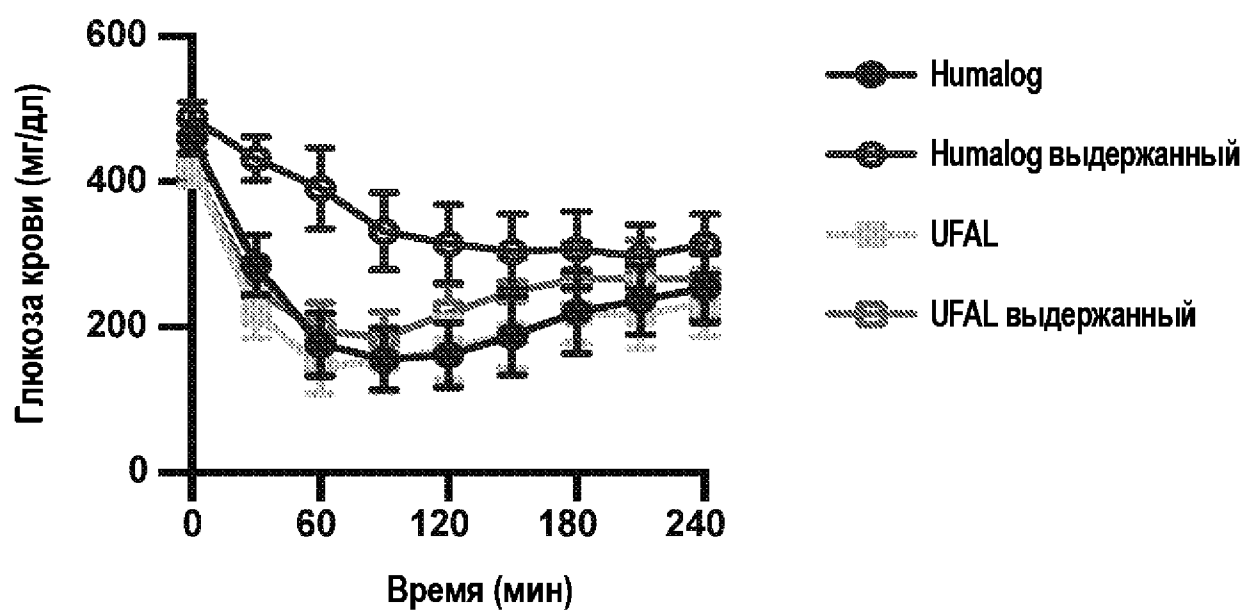
Фиг. 8В



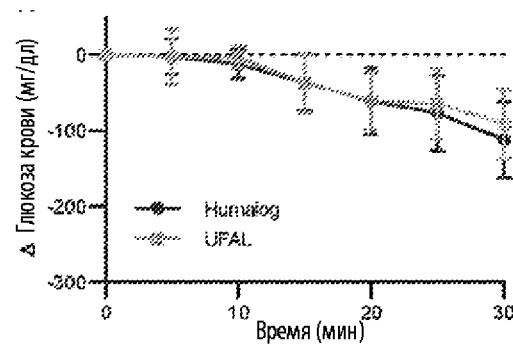
Фиг. 8D



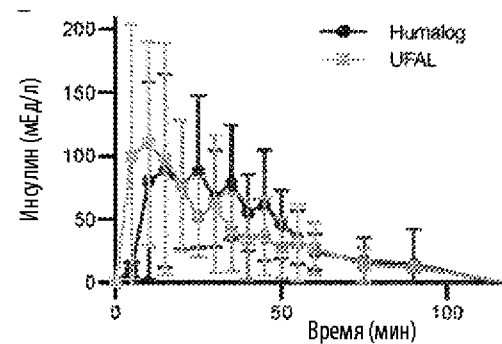
Фиг. 9А



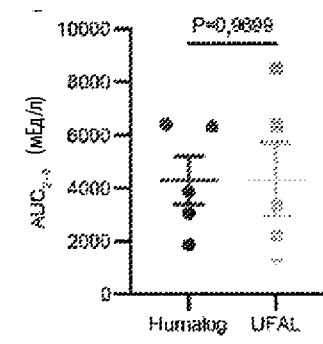
Фиг. 9В



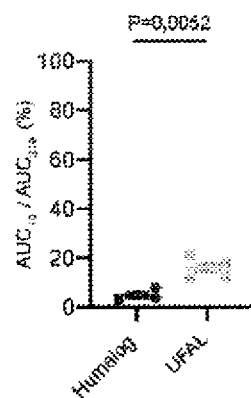
Фиг. 10А



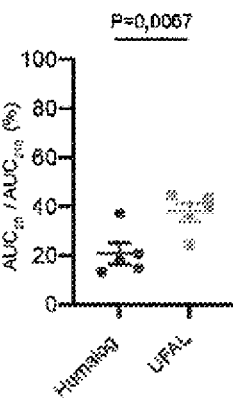
Фиг. 10В



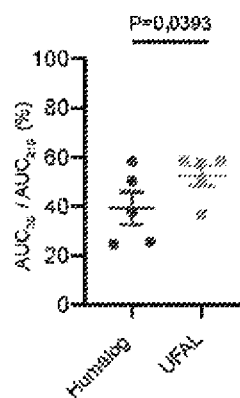
Фиг. 10С



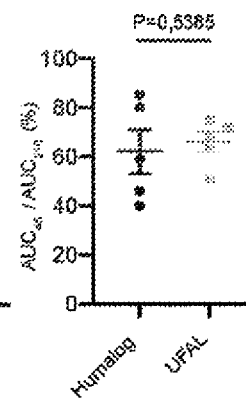
Фиг. 10D



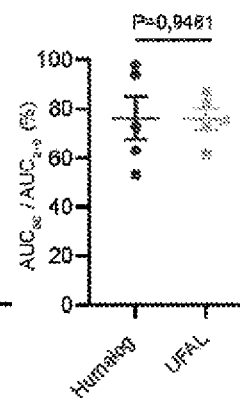
Фиг. 10Е



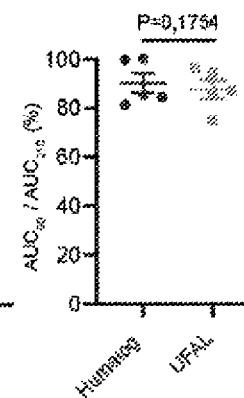
Фиг. 10F



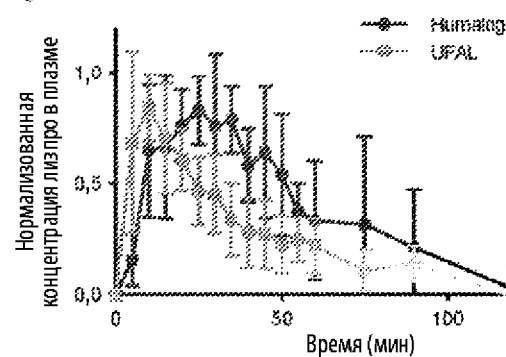
Фиг. 10G



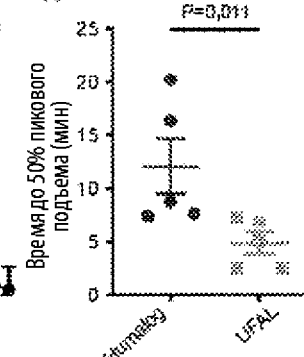
Фиг. 10H



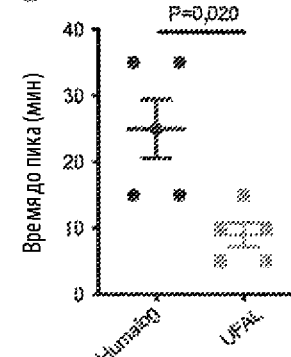
Фиг. 10I



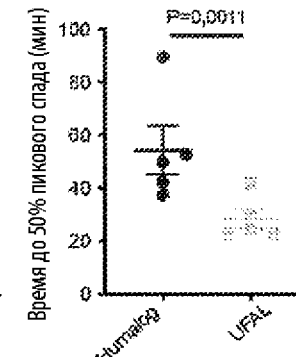
Фиг. 10J



Фиг. 10K

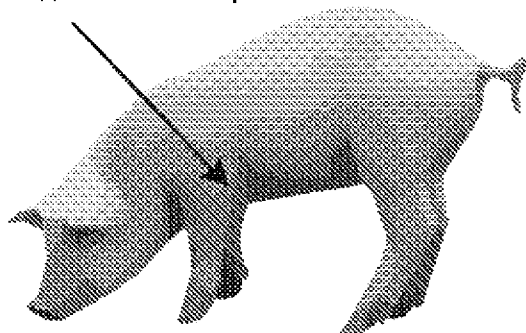


Фиг. 10L

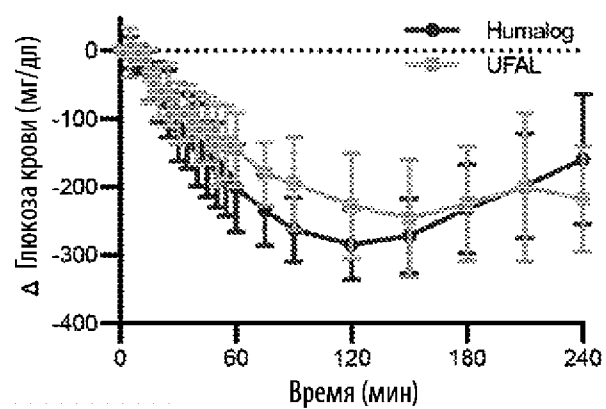


Фиг. 10M

подкожная инъекция



Фиг. 11А

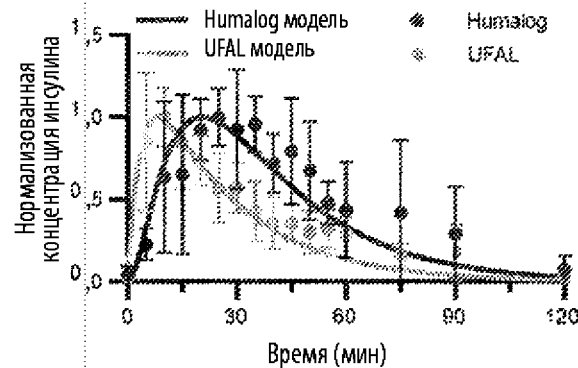


Фиг. 11В

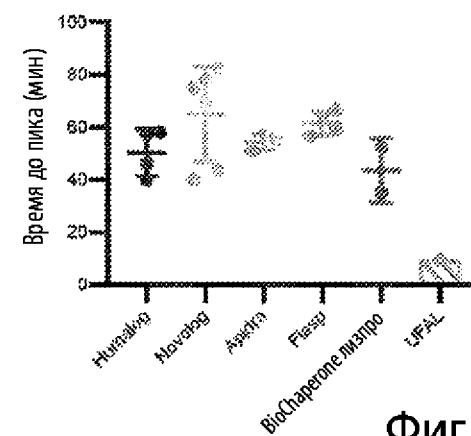
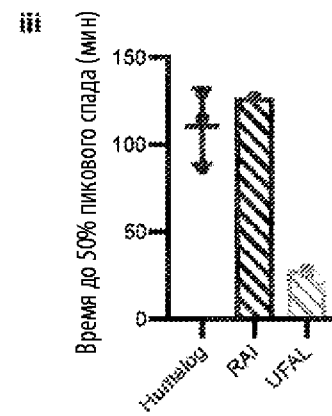
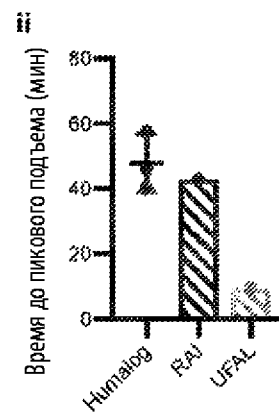
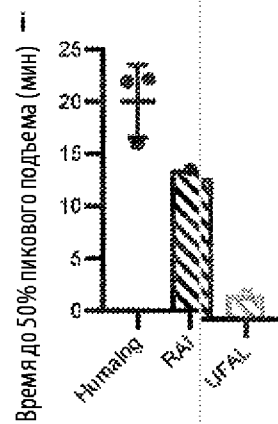
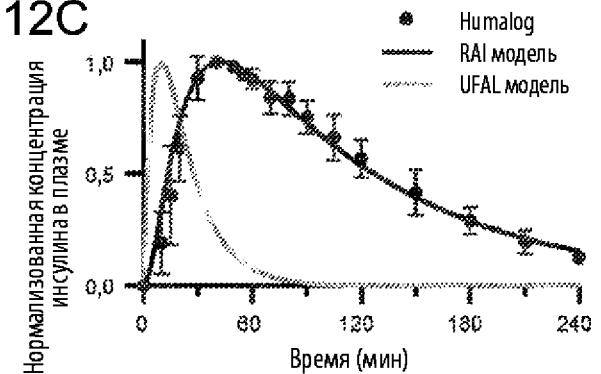
Фиг. 12А



Фиг. 12В

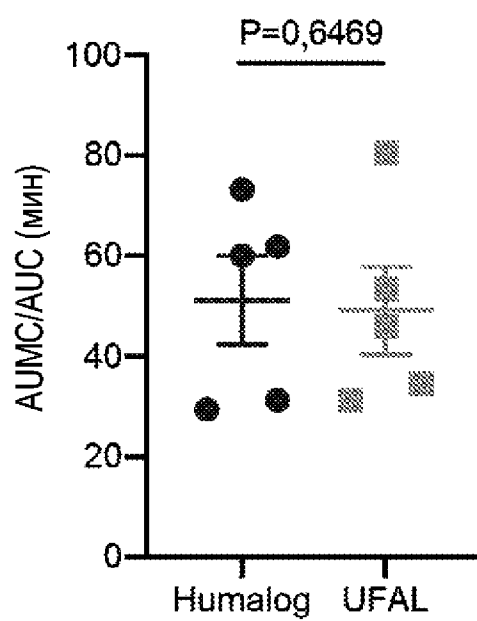


Фиг. 12С

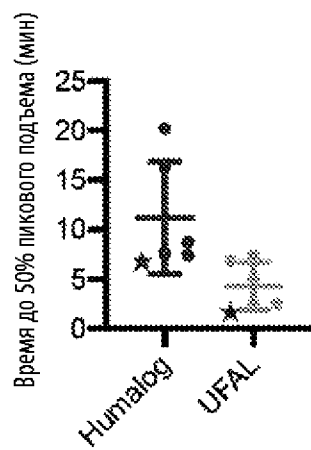


Фиг. 12D

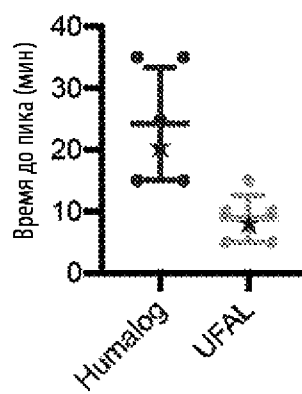
Фиг. 12Е



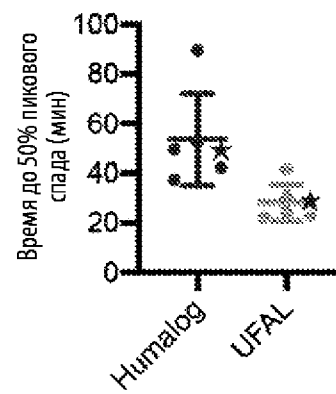
Фиг. 13



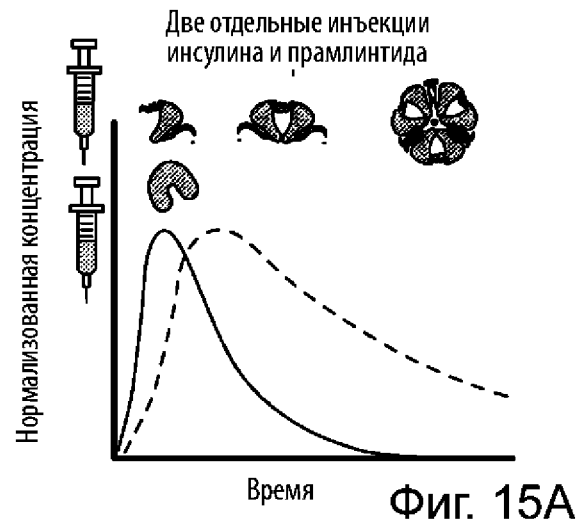
Фиг. 14А



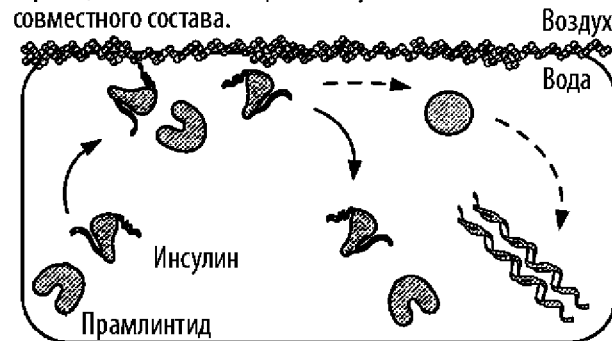
Фиг. 14В



Фиг. 14С

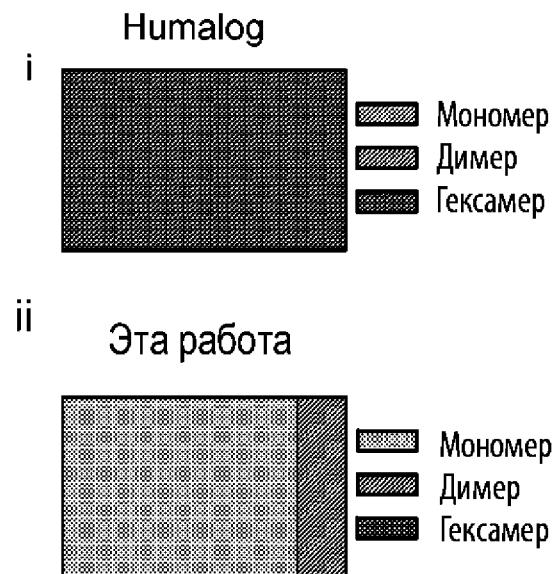


Акриламидные сополимерные вспомогательные вещества предотвращают поверхностную агрегацию и повышают физическую стабильность совместного состава.

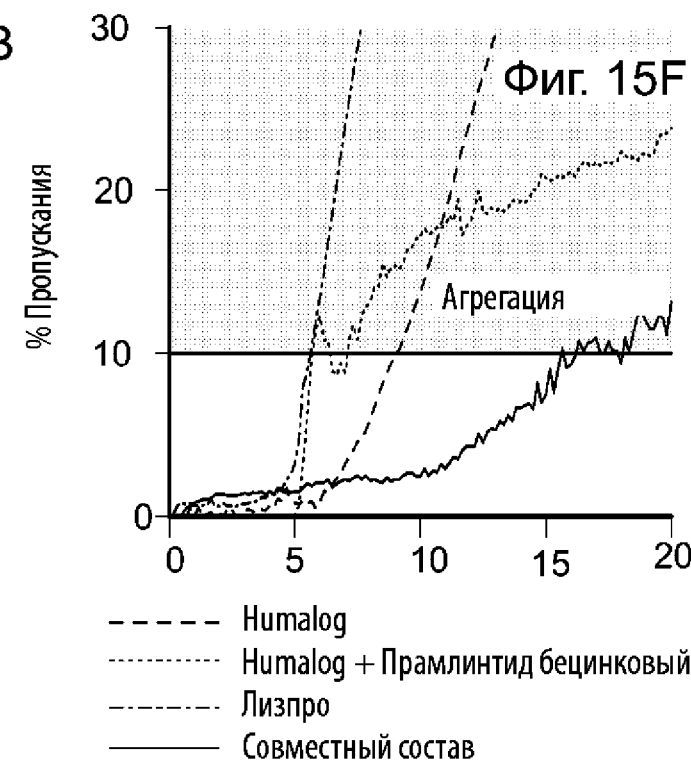


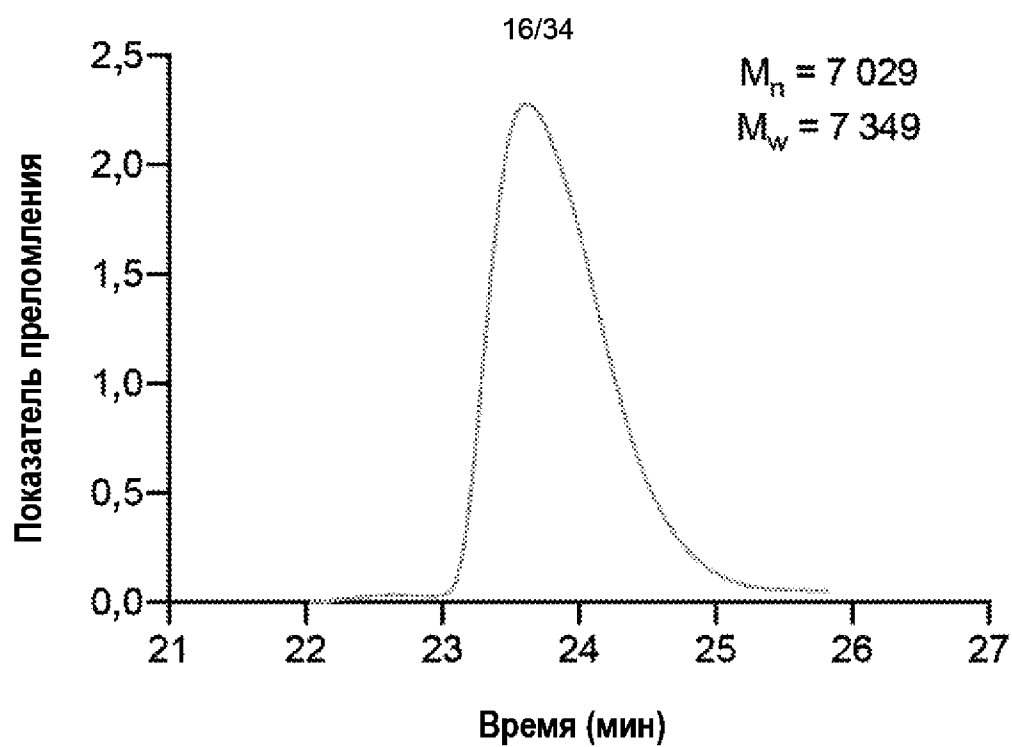
Фиг. 15С

- Компоненты совместного состава
- Безцинковый лизпро (100 ЕД/мл)
 - Прамлинтид (1:6 прамлинтид:лизпро)
 - МоNi23% (Стабильность: 0,1 мг/мл)
 - Феноксиэтанол (консервант: 0,85 мас. %)
 - Глицерин (Тоничность: 2,6 мас. %)

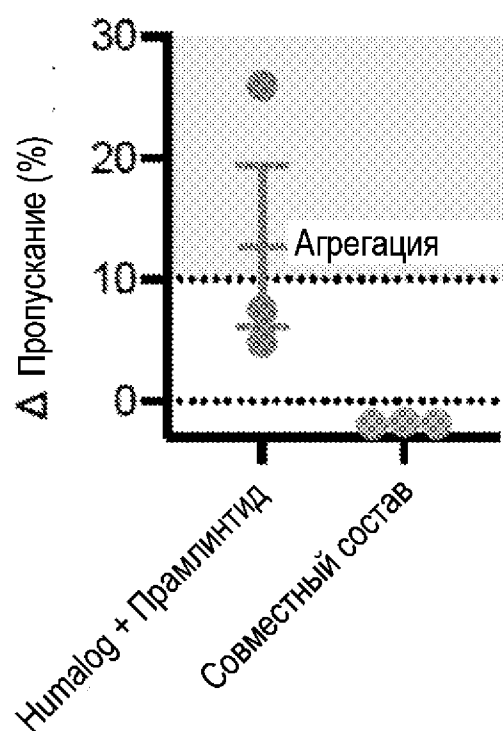


Фиг. 15Е

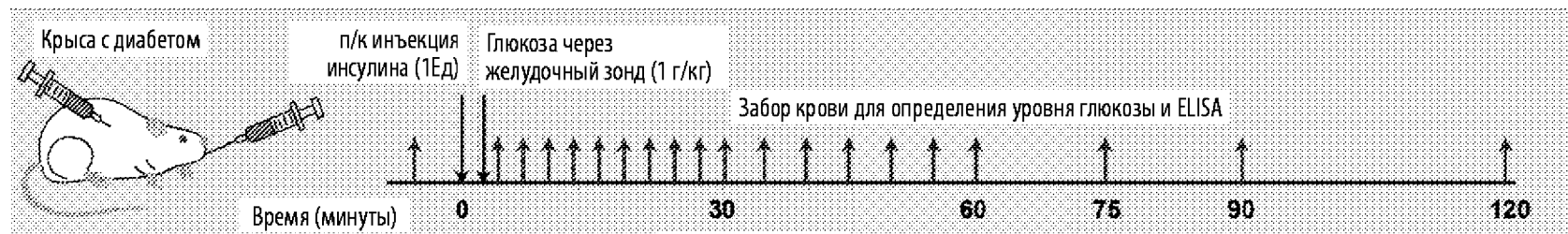




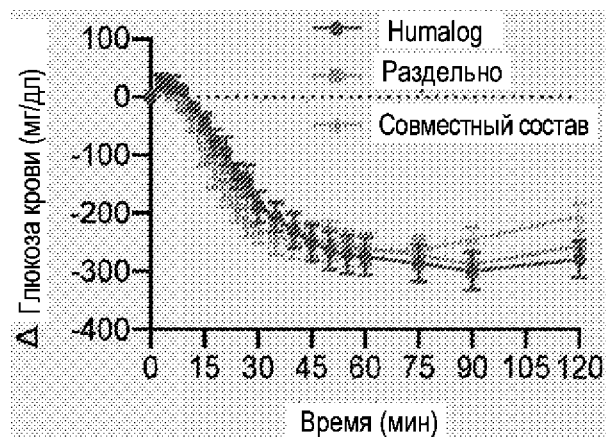
Фиг. 16



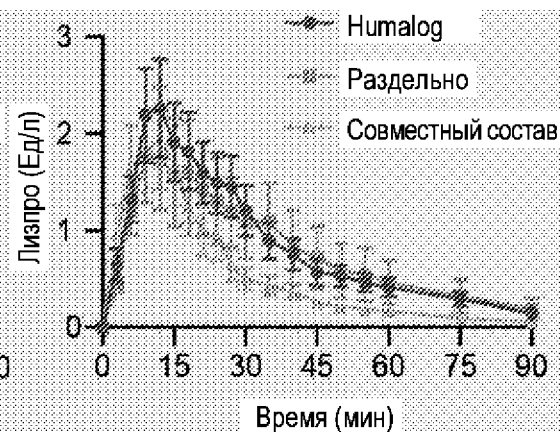
Фиг. 17



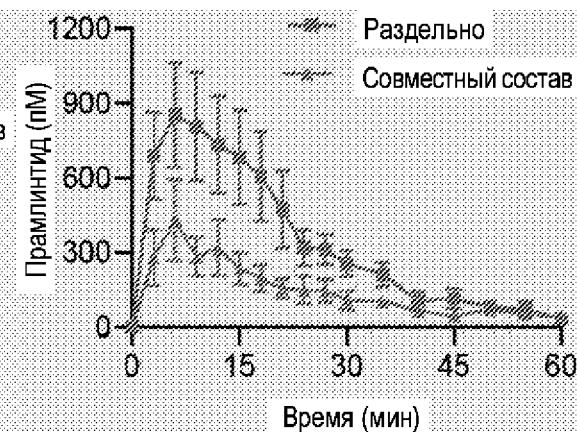
Фиг. 18А



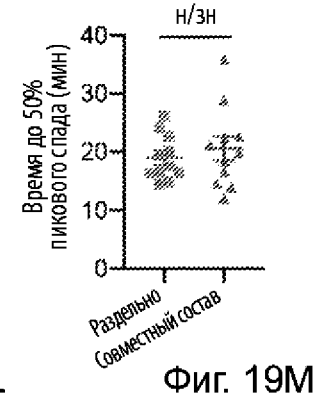
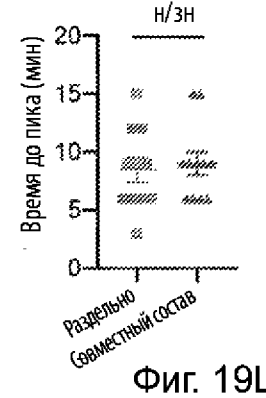
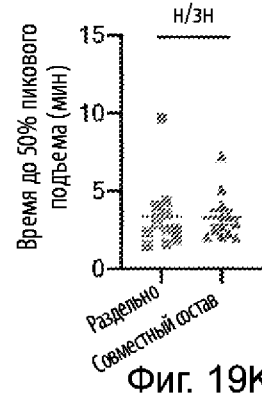
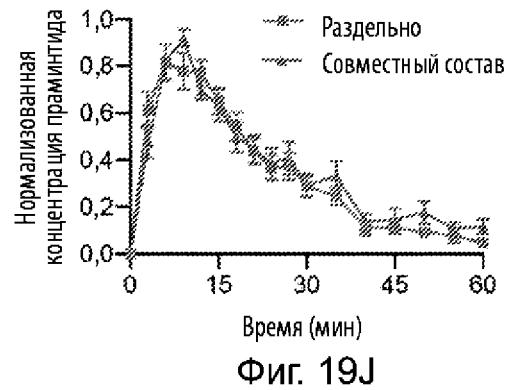
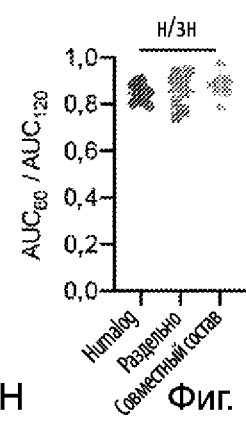
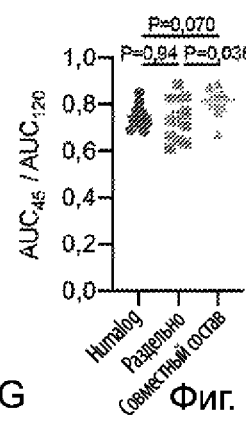
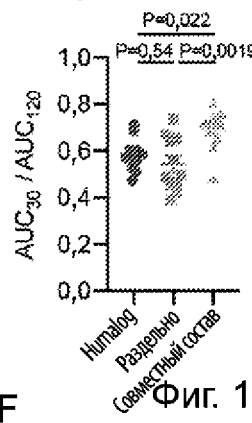
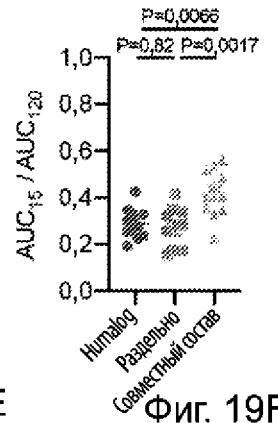
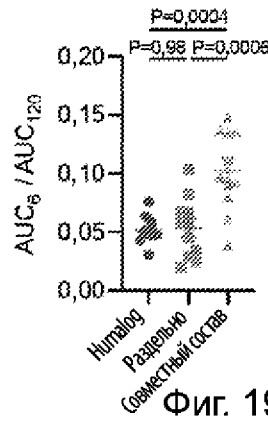
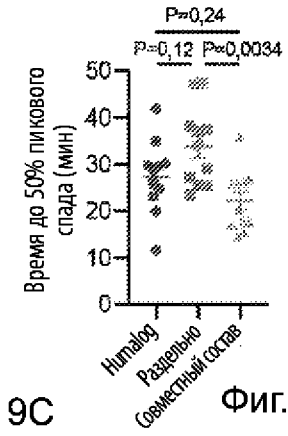
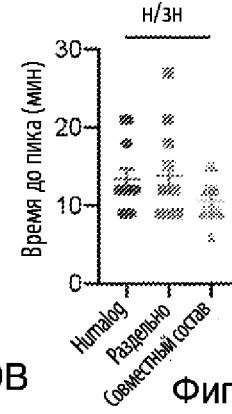
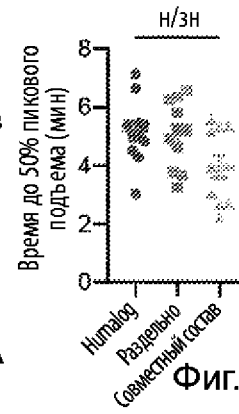
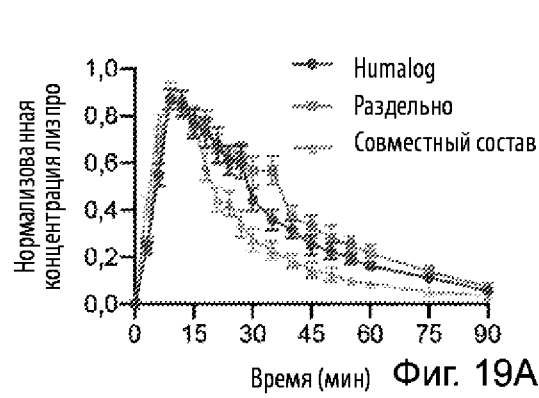
Фиг. 18В

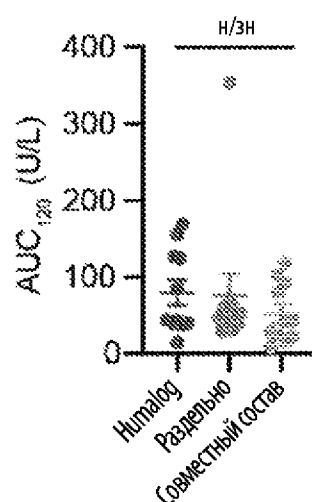


Фиг. 18С

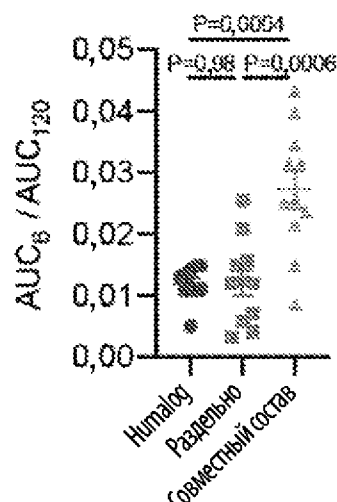


Фиг. 18D

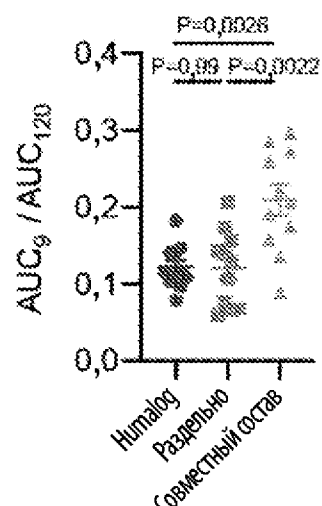




Фиг. 20А



Фиг. 20В

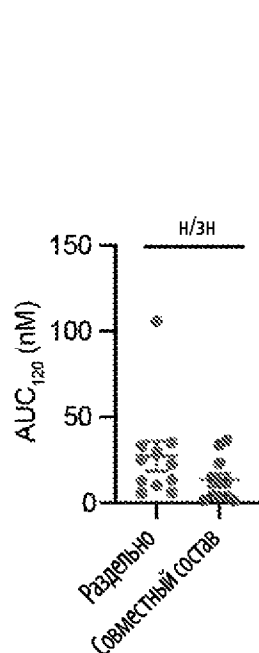


Фиг. 20С

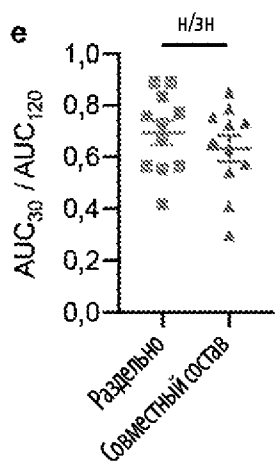
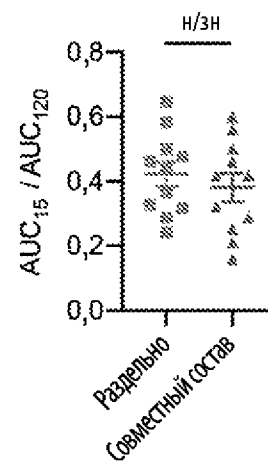
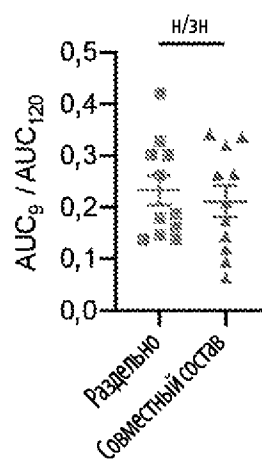
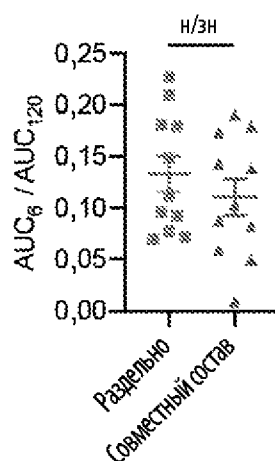
Фиг. 21В

Фиг. 21С

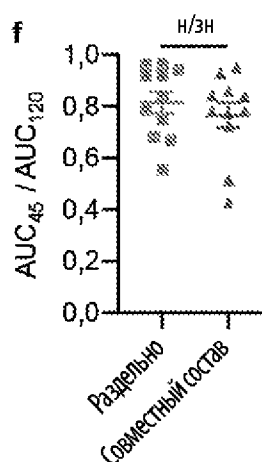
Фиг. 21D



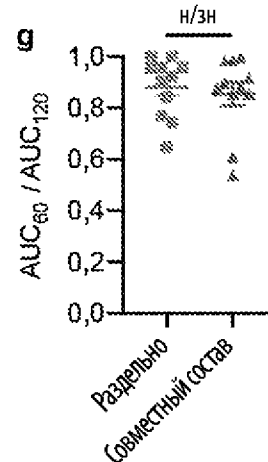
Фиг. 21А



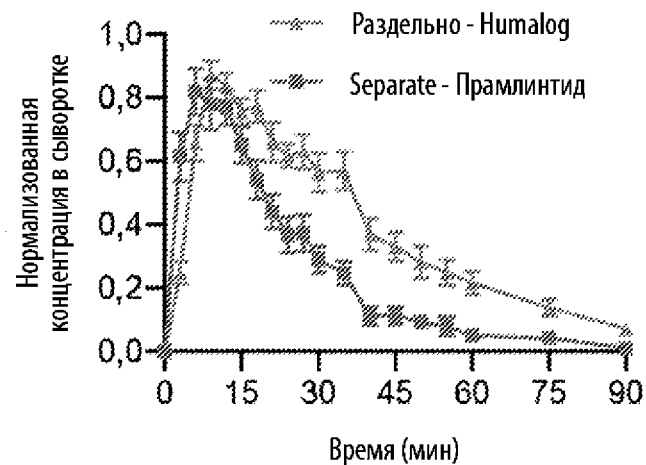
Фиг. 21Е



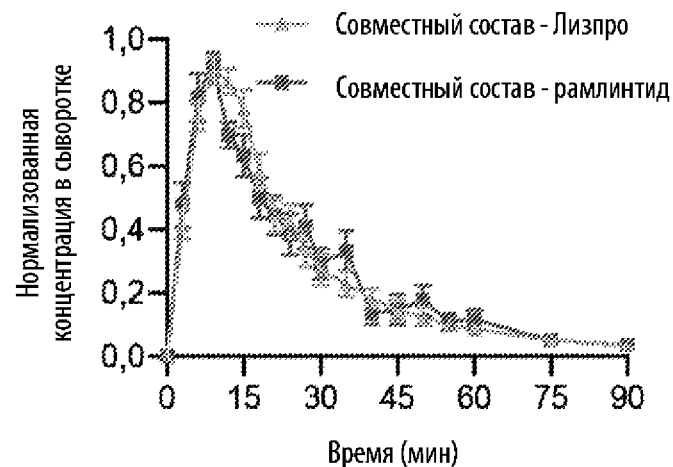
Фиг. 21F



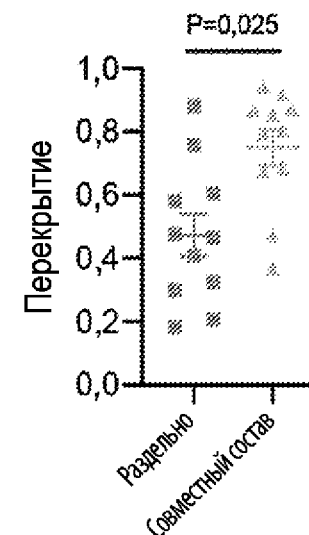
Фиг. 21G



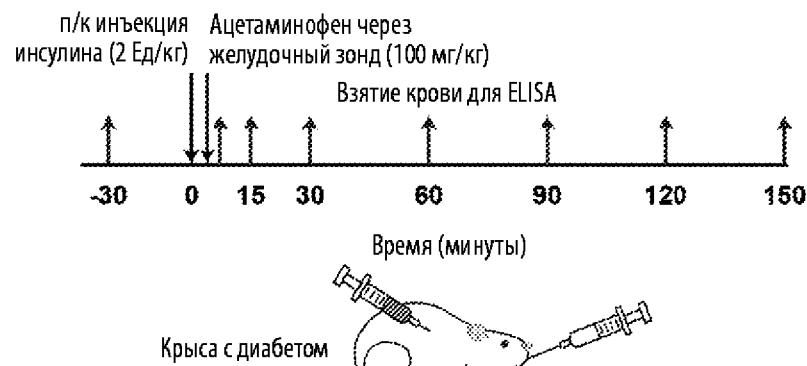
Фиг. 22А



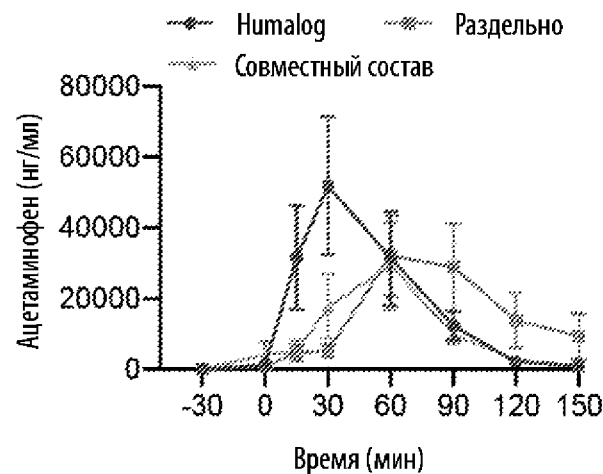
Фиг. 22В



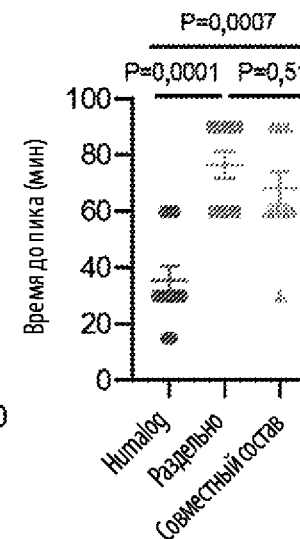
Фиг. 22С



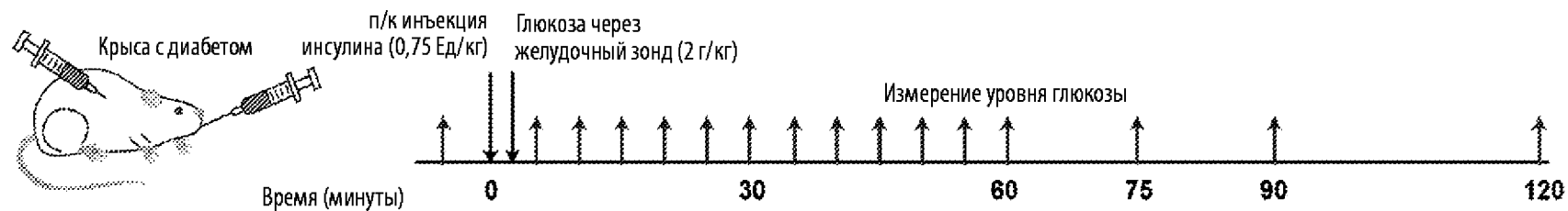
Фиг. 23А



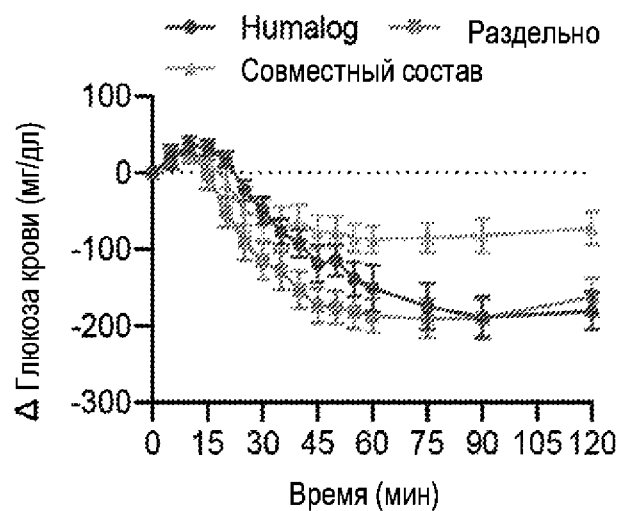
Фиг. 23В



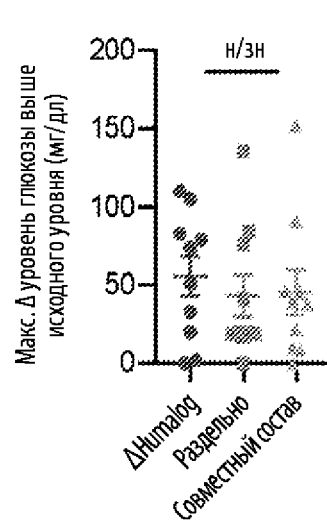
Фиг. 23С



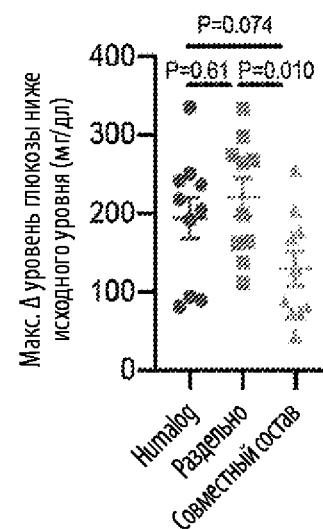
Фиг. 24А



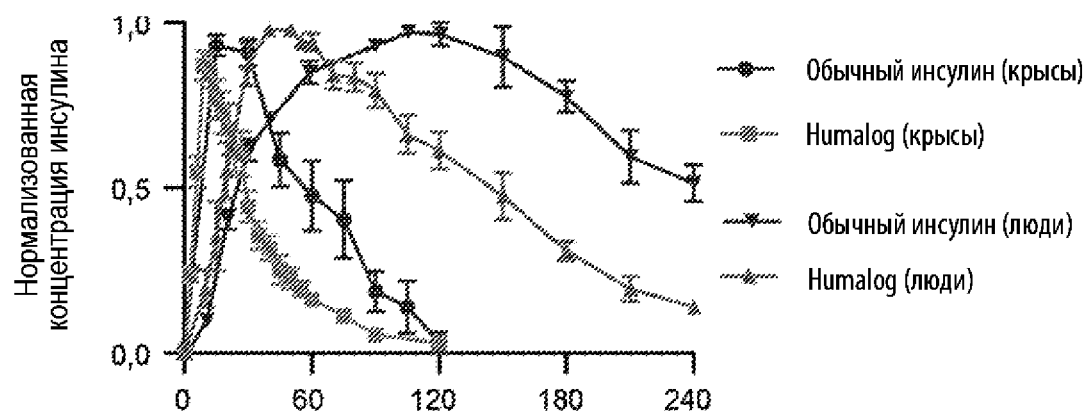
Фиг. 24В



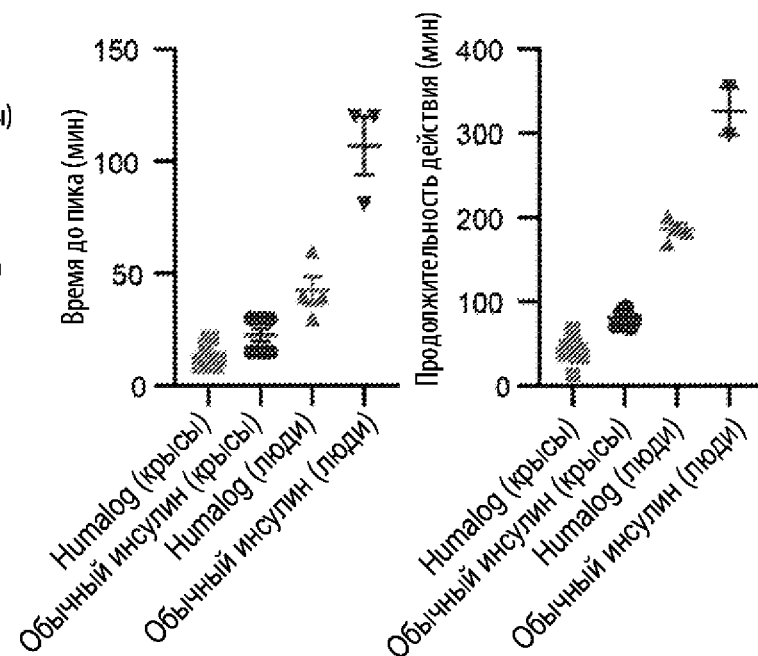
Фиг. 24С



Фиг. 24D



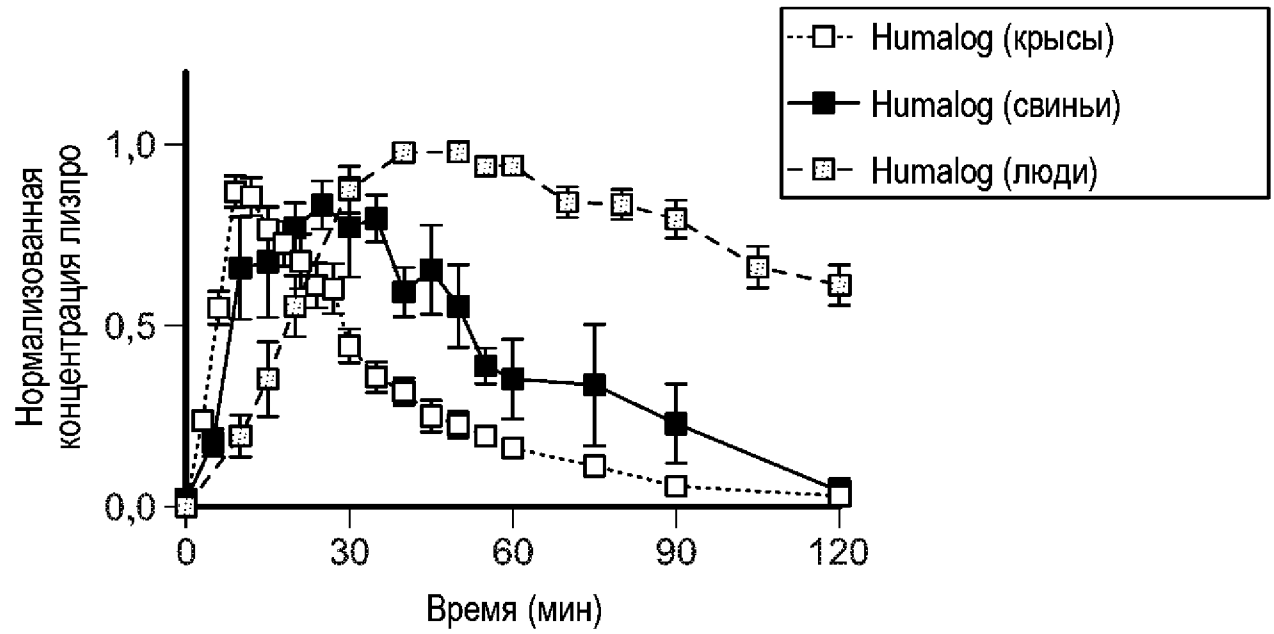
Фиг. 25А



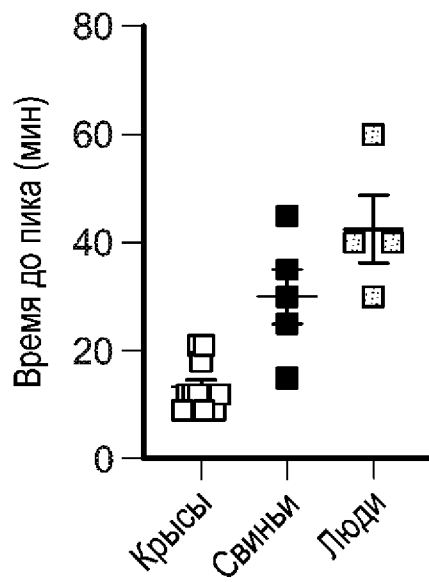
Фиг. 25В

Фиг. 25С

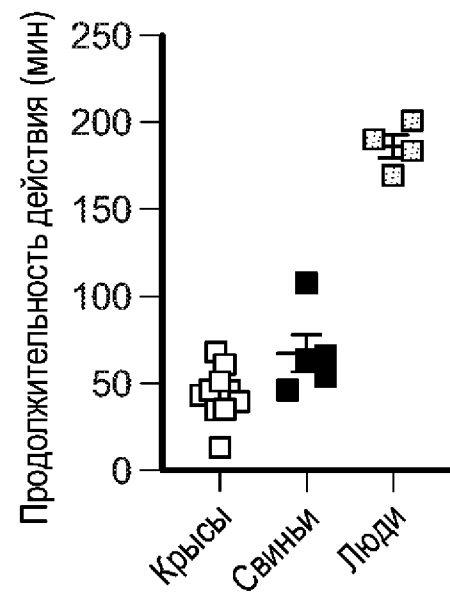
i



ii

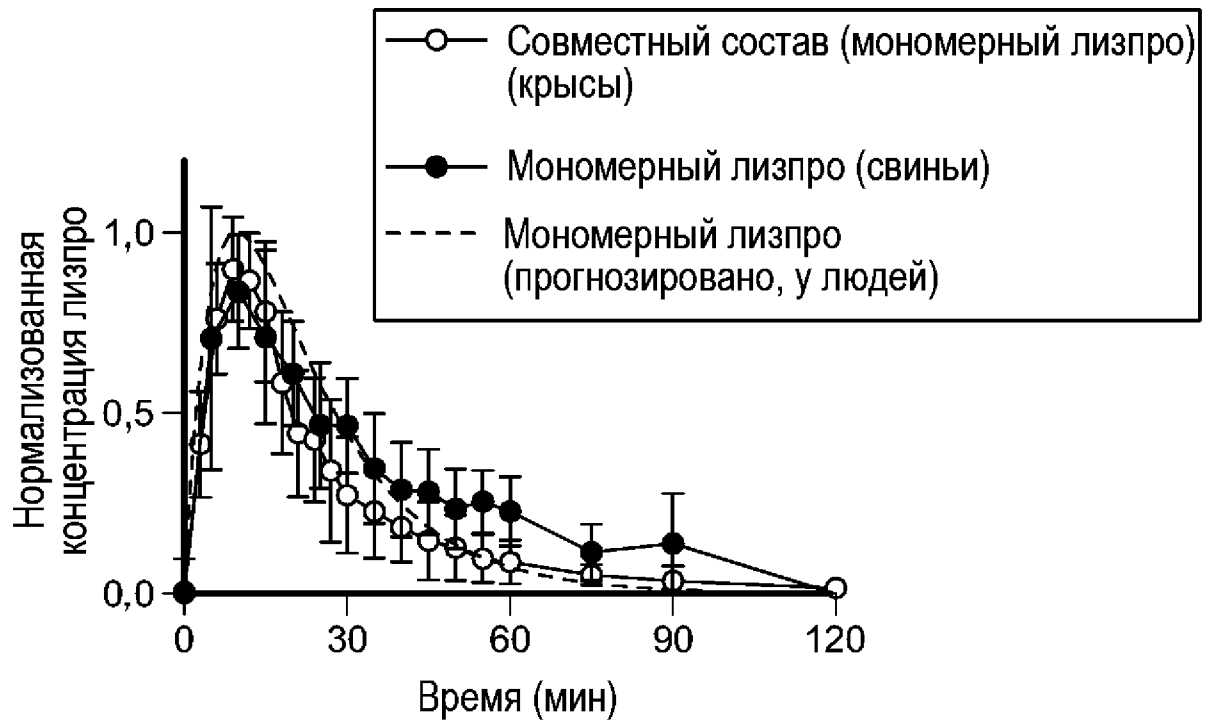


iii

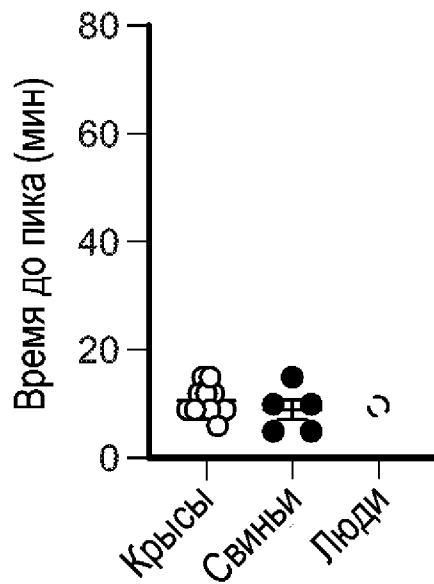


Фиг. 26А

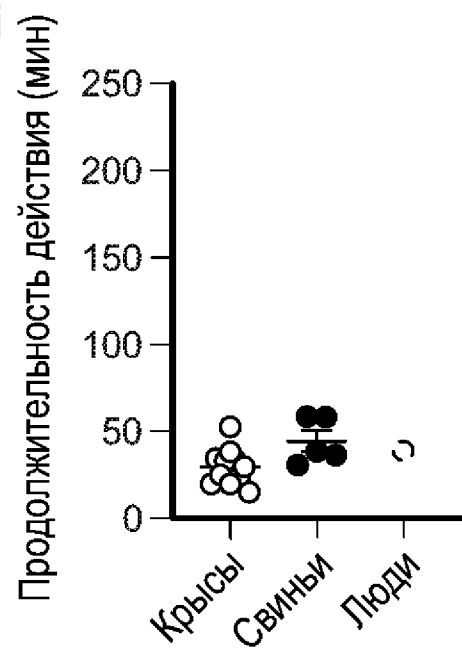
i



ii

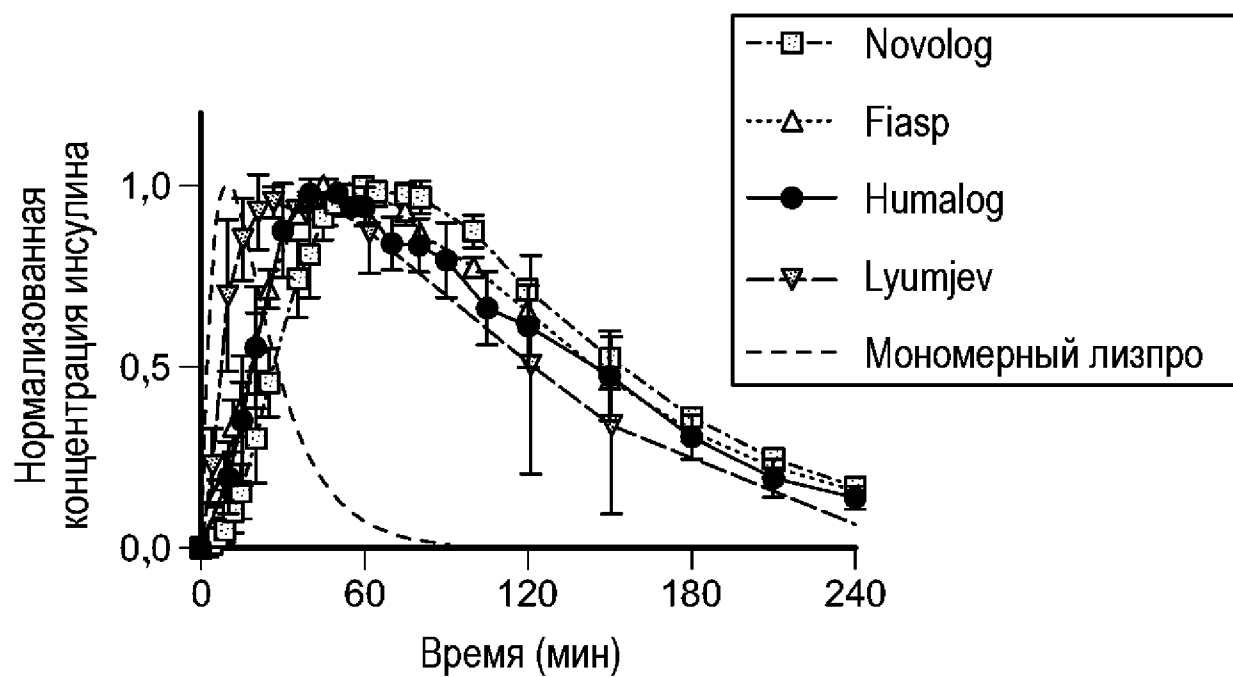


iii

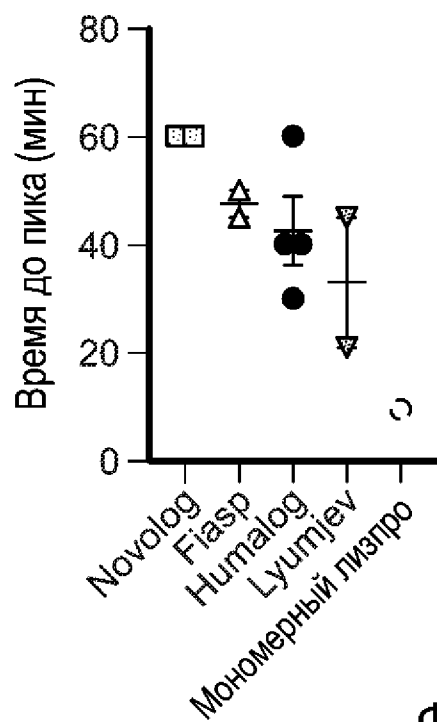


Фиг. 26В

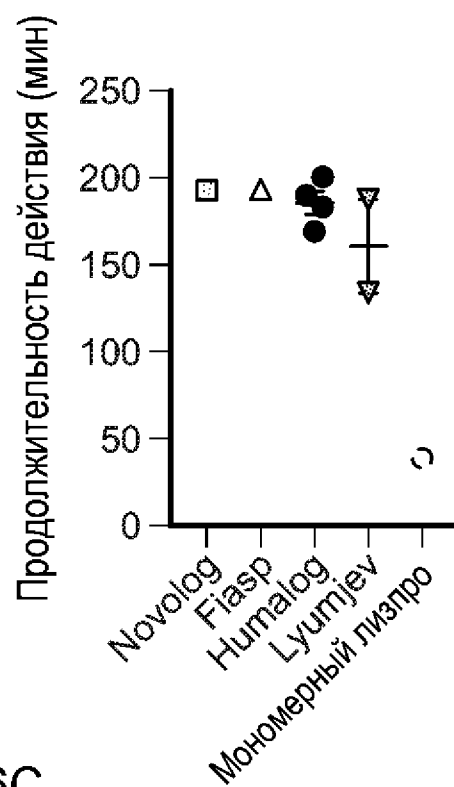
i



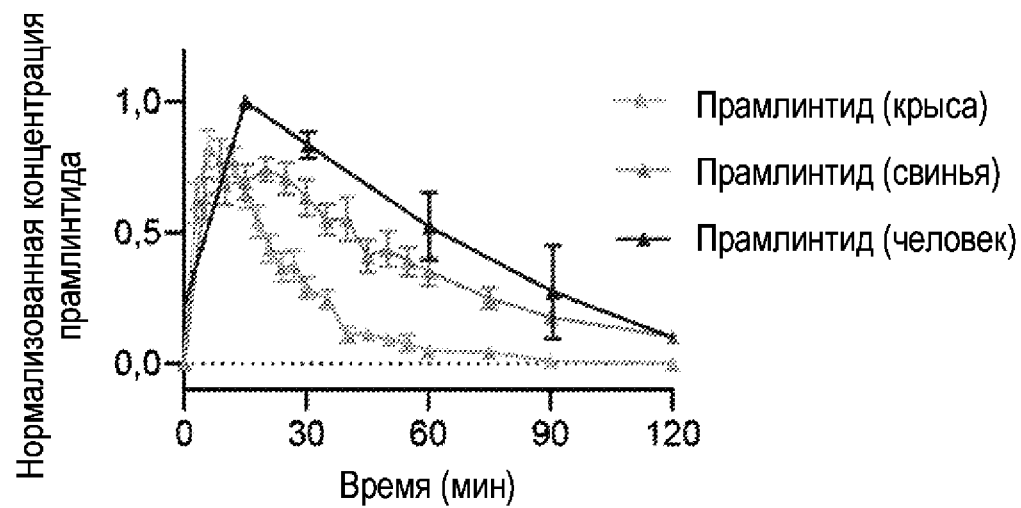
ii



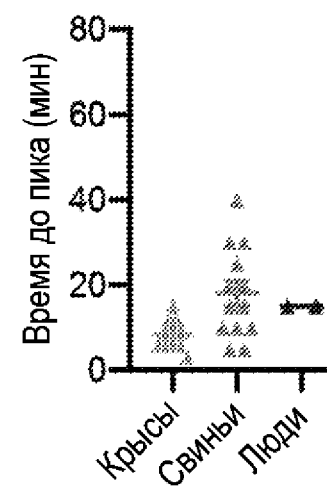
iii



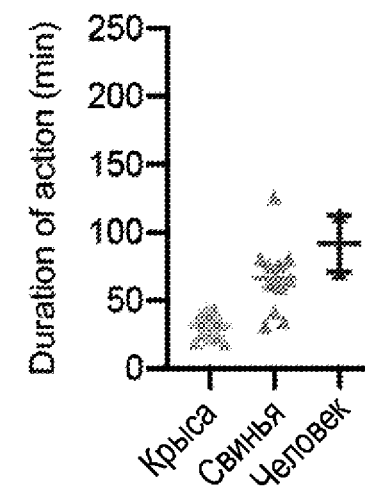
Фиг. 26С



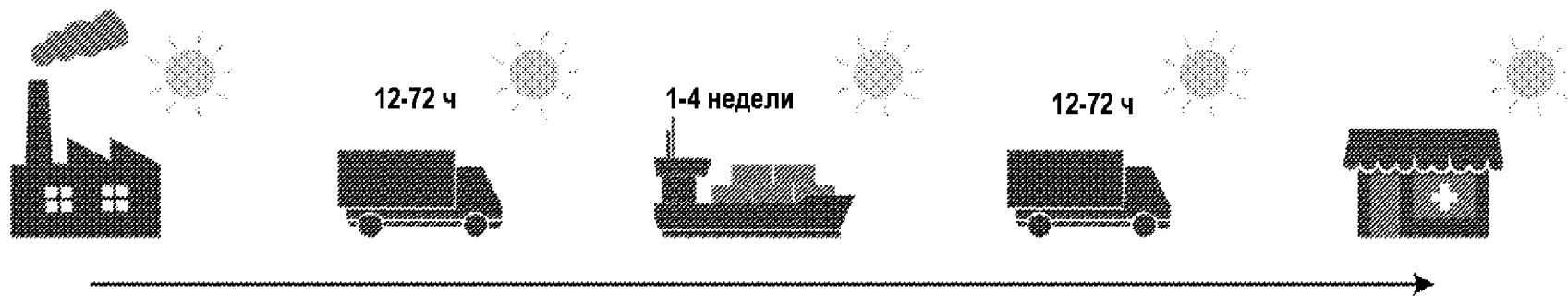
Фиг. 27А



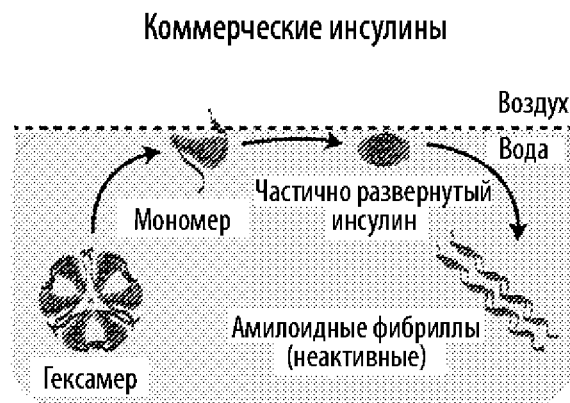
Фиг. 27В



Фиг. 27С

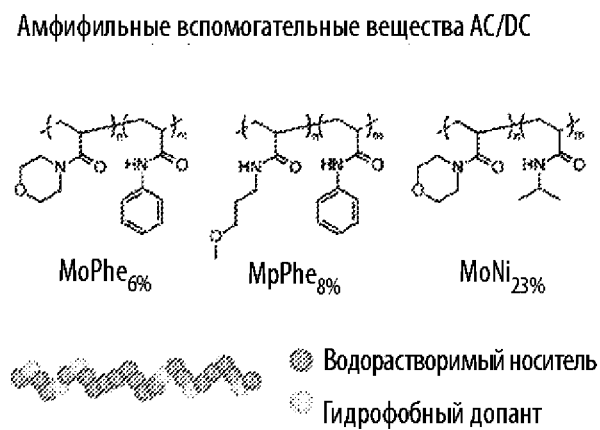


Фиг. 28А

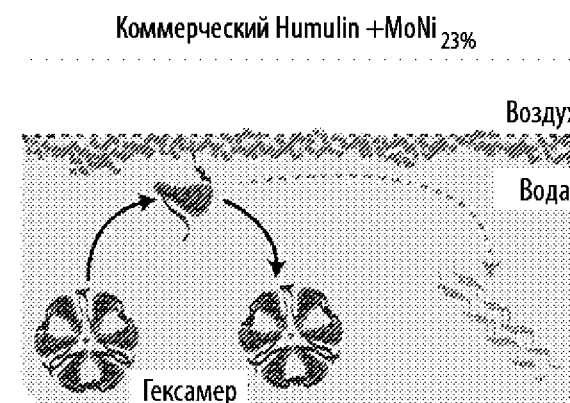


Взаимодействия инсулина на границе воздух-вода способствуют агрегации

Фиг. 28В

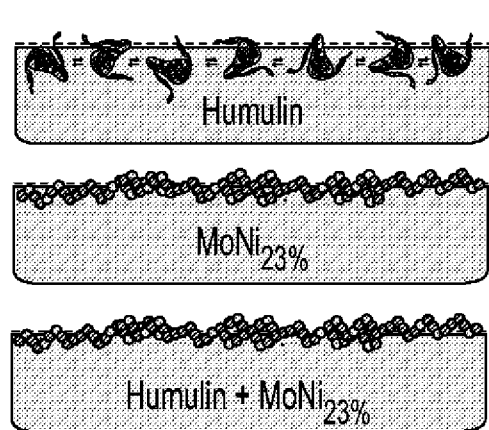


Фиг. 28С

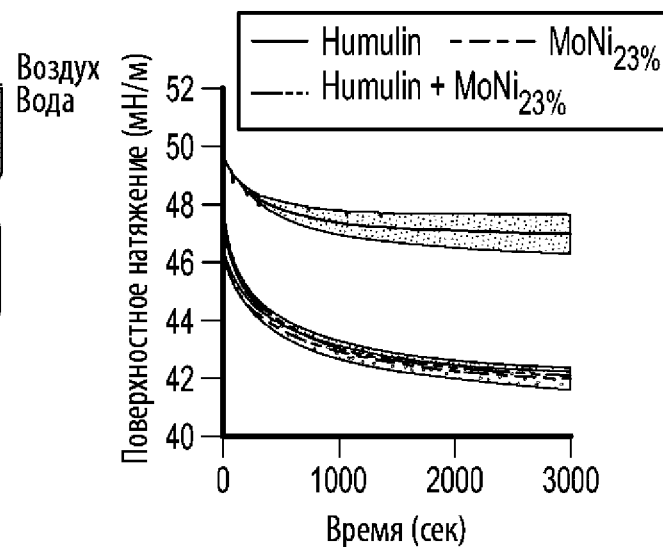


Полимерные вспомогательные вещества уменьшают взаимодействие с поверхностью и предотвращают агрегацию

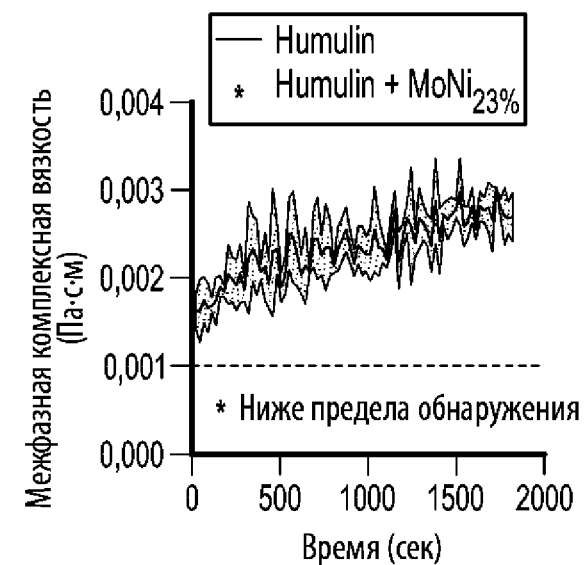
Фиг. 28D



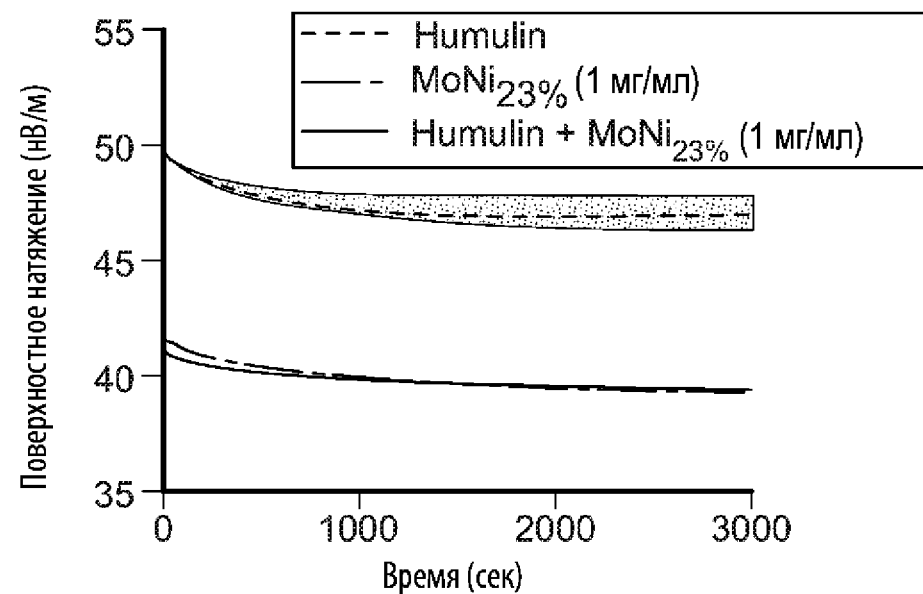
Фиг. 29А



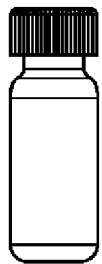
Фиг. 29В



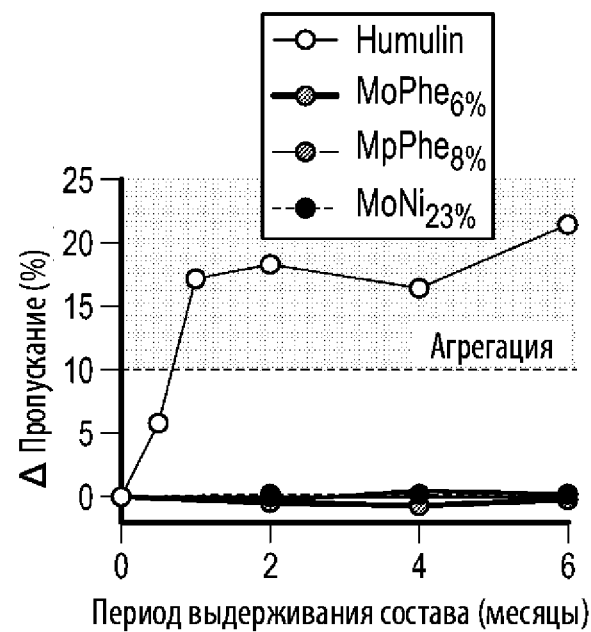
Фиг. 29С



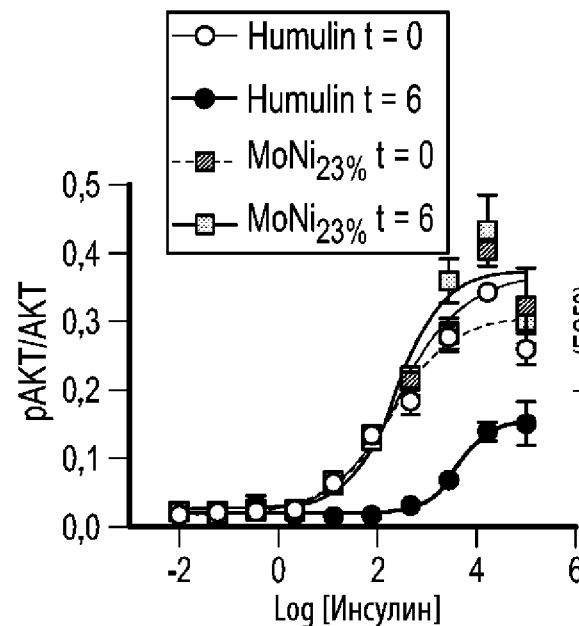
Фиг. 30



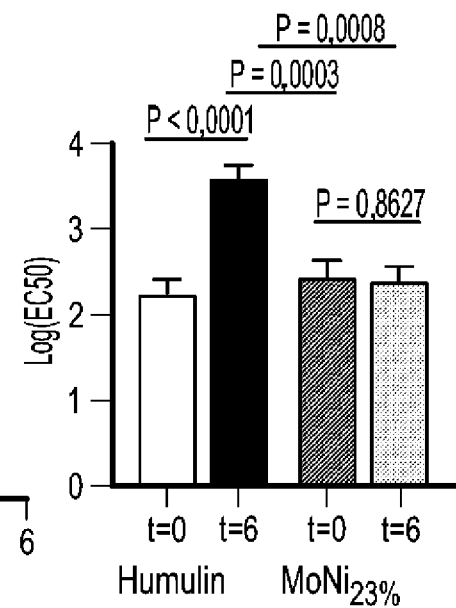
Фиг. 31А



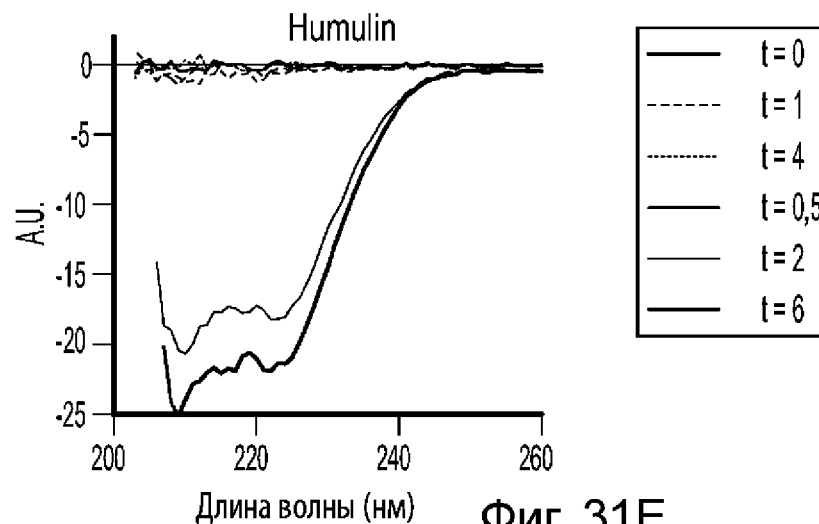
Фиг. 31В



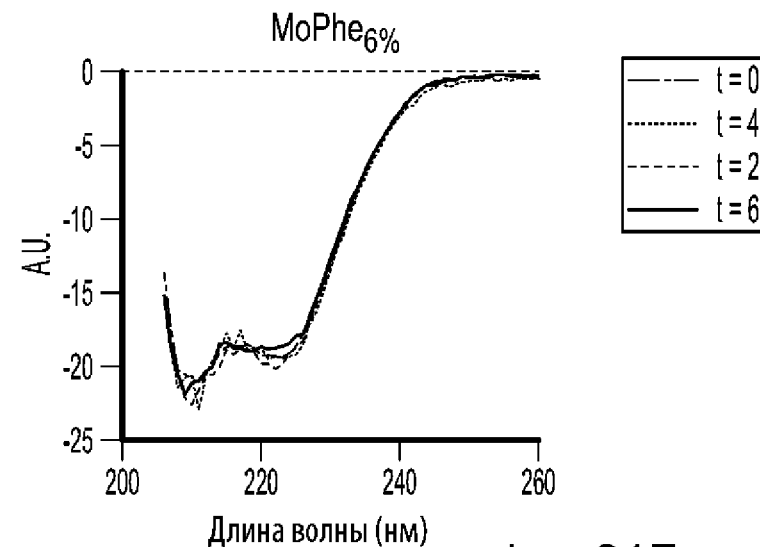
Фиг. 31С



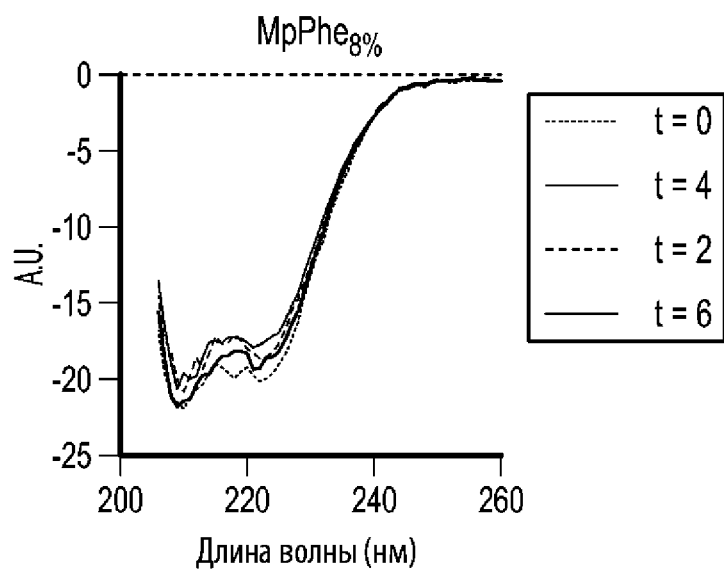
Фиг. 31D



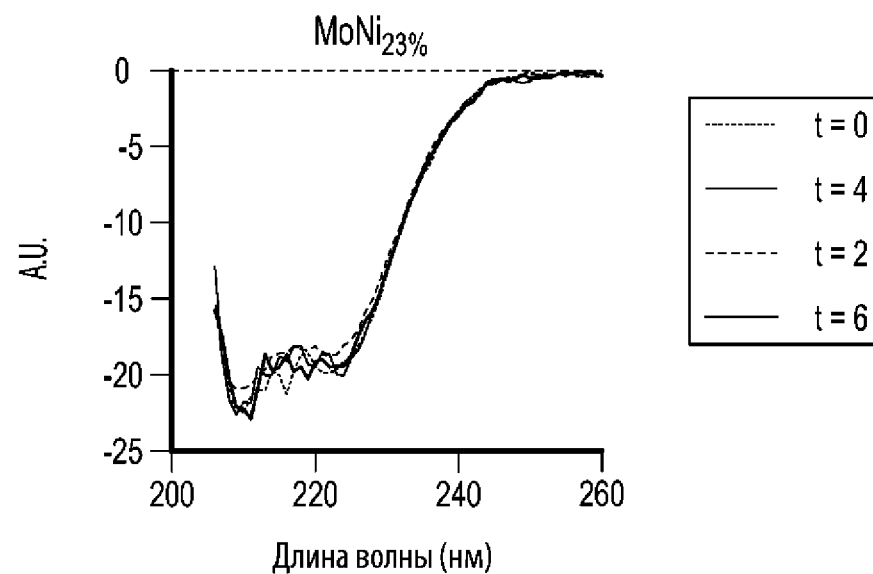
Фиг. 31Е



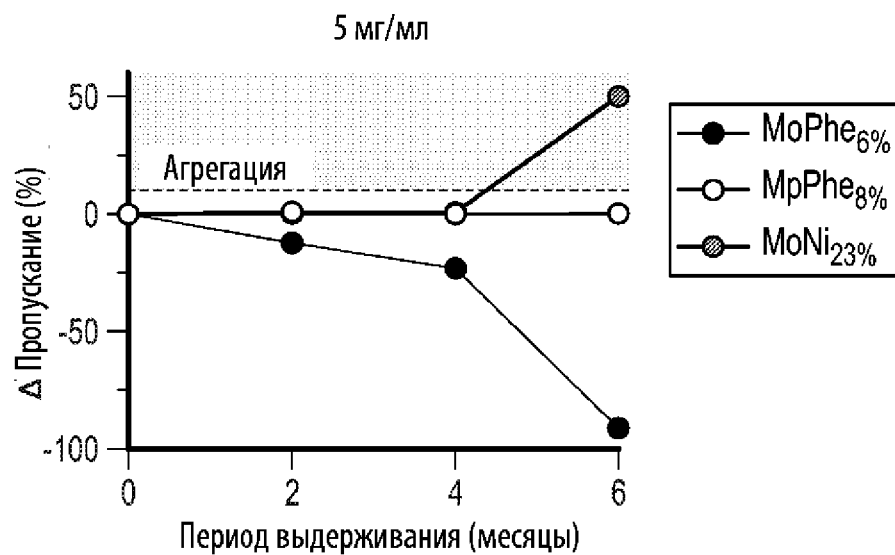
Фиг. 31F



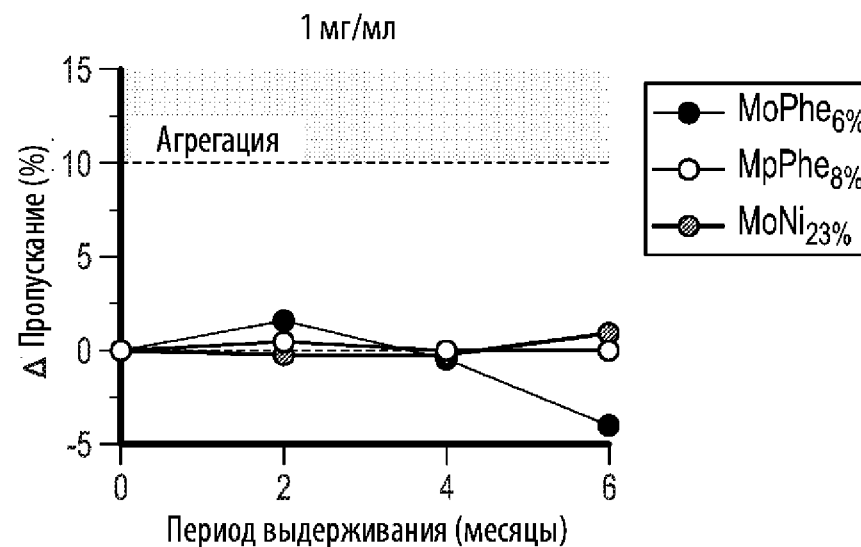
Фиг. 31Г



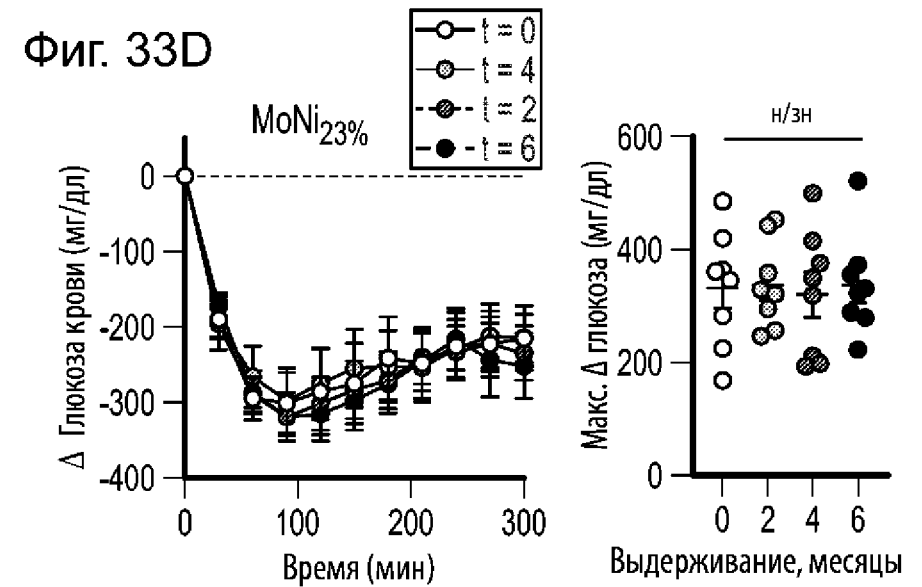
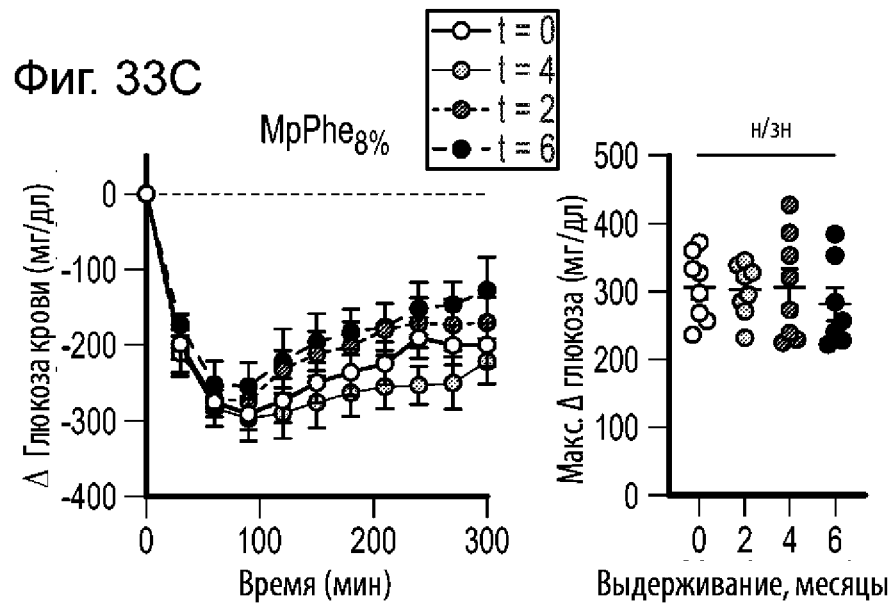
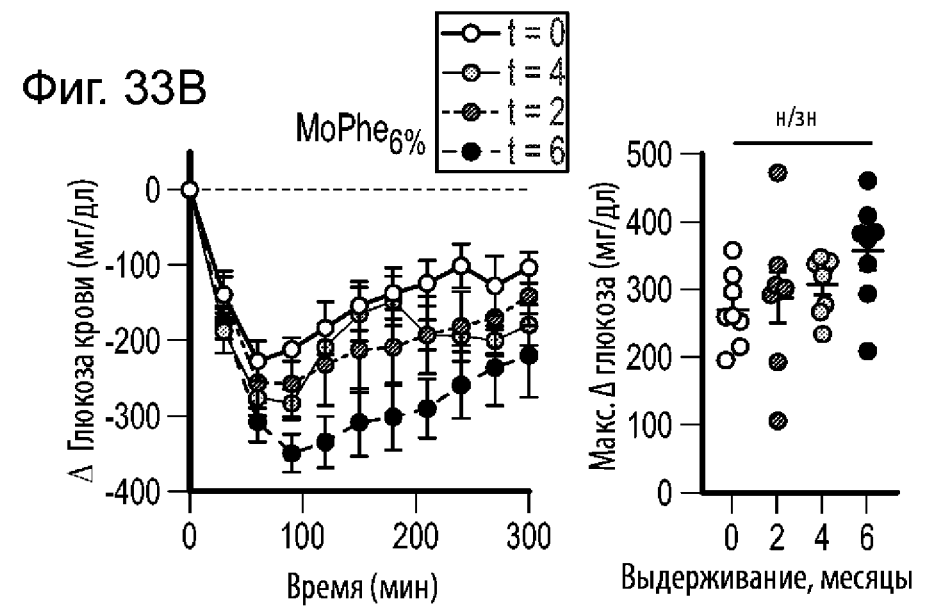
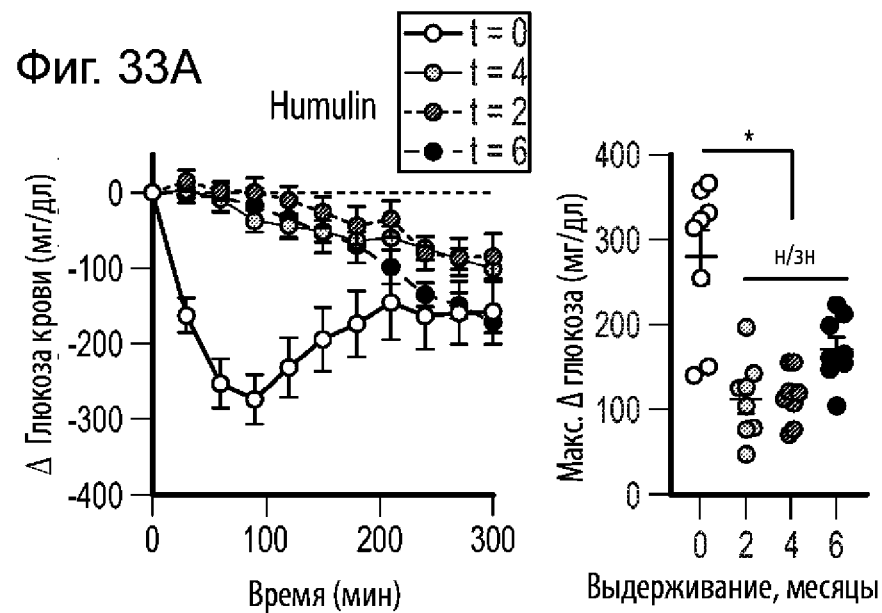
Фиг. 31Н



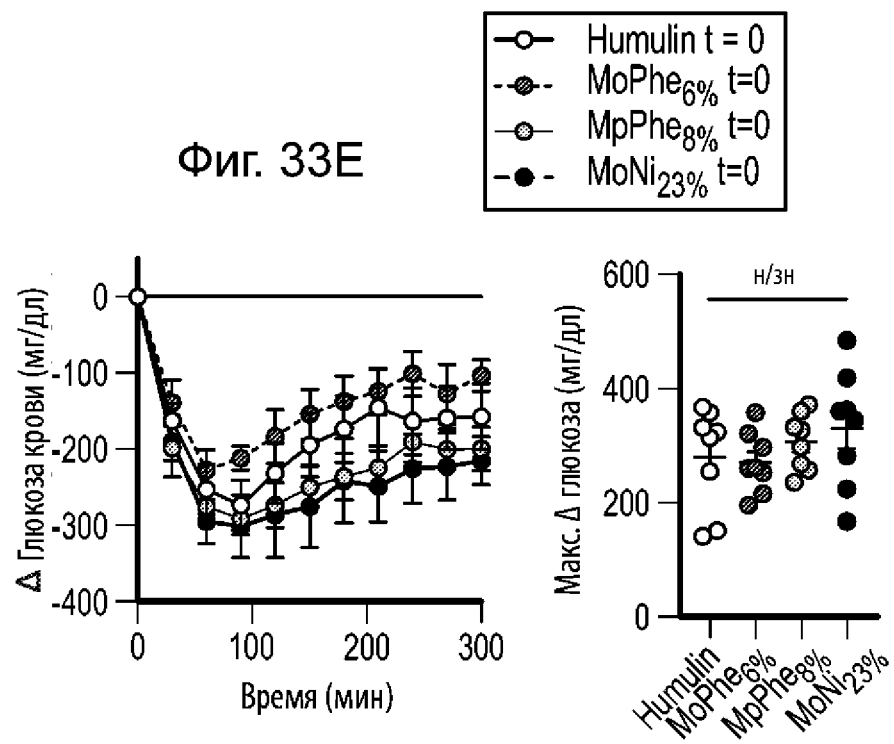
Фиг. 32А



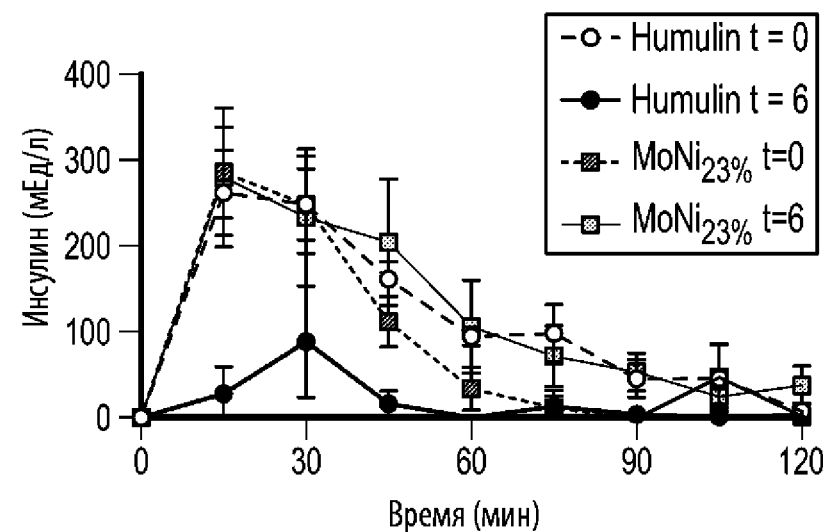
Фиг. 32В

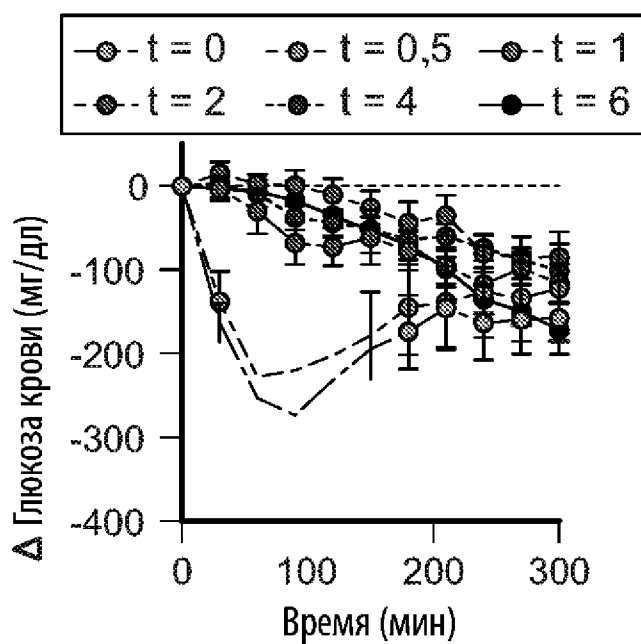


Фиг. 33Е

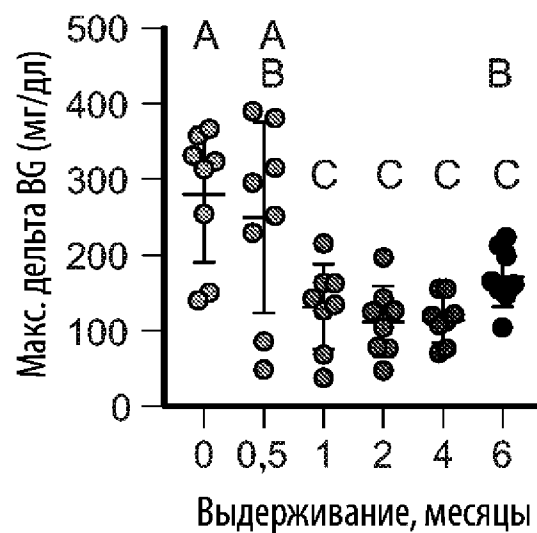


Фиг. 33F

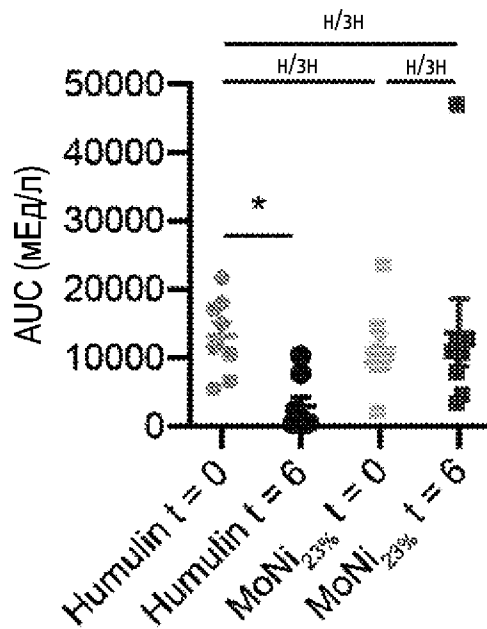




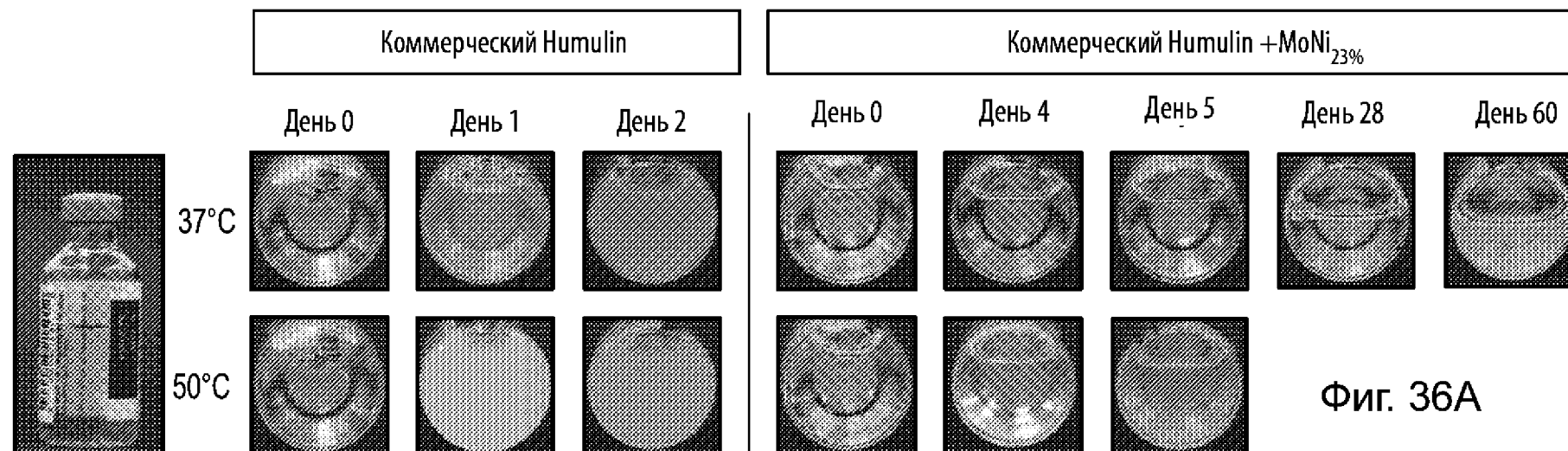
Фиг. 34А



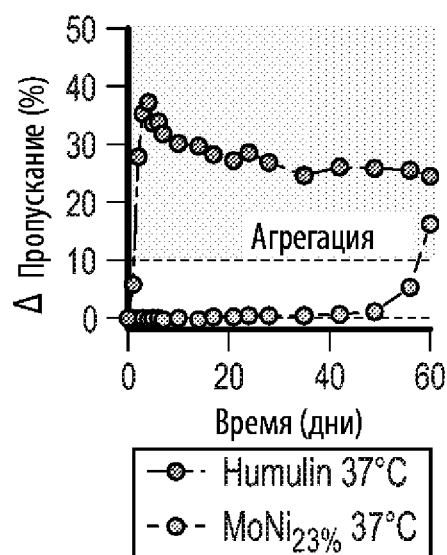
Фиг. 34В



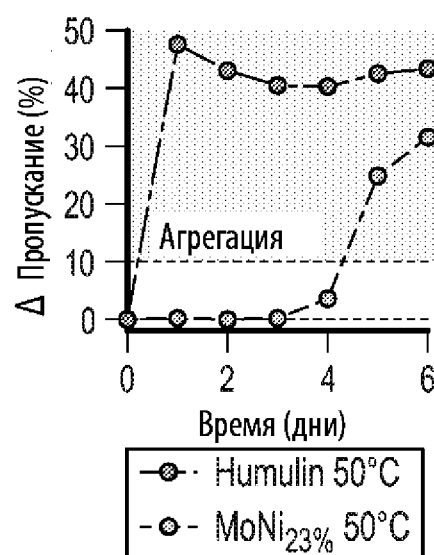
Фиг. 35



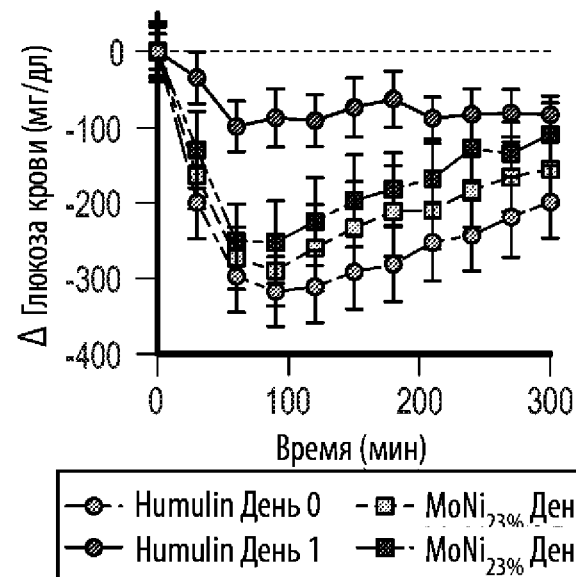
Фиг. 36А



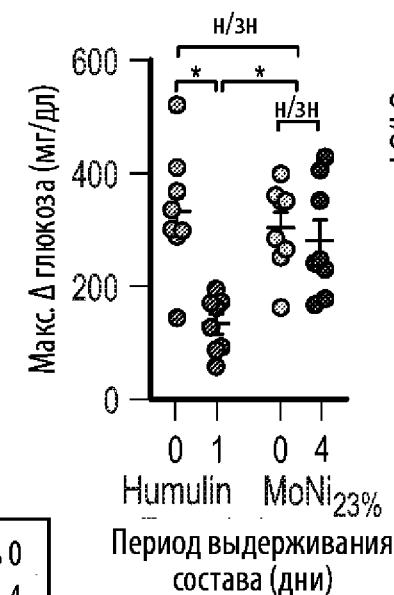
Фиг. 36В



Фиг. 36С



Фиг. 36D



Фиг. 36Е