

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293354 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.12(22) Дата подачи заявки
2021.05.13(51) Int. Cl. A61K 38/28 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)(54) АЦИЛИРОВАННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ИНСУЛИНА ПРОЛОНГИРОВАННОГО
ДЕЙСТВИЯ

(31) 63/025,463

(32) 2020.05.15

(33) US

(86) PCT/US2021/032144

(87) WO 2021/231676 2021.11.18

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Бреннан Симус Патрик, Флора Дэвид
Бенджамин, Кисселев Валдислав, Лю
Вэнь, Валензуэла Франсиско Алсидес
(US)

(74) Представитель:

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

(57) Описанные в изобретении соединения относятся к лечению диабета I типа и/или II типа, и/или гипергликемии. В частности, описанные соединения относятся к ацилированным соединениям инсулина пролонгированного действия, снижающим уровень глюкозы в крови, к фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения, к терапевтическому применению таких соединений и к промежуточному соединению, применяемому для получения указанных ацилированных соединений инсулина.

A1

202293354

202293354

A1

Ацилированные соединения инсулина пролонгированного действия

Настоящее изобретение относится к области лечения диабета и/или гипергликемии. В частности, настоящее изобретение относится к соединениям, снижающим уровень

5 глюкозы в крови, к фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения, и к терапевтическому применению таких соединений.

Заместительная инсулиноterapia для лечения больных диабетом в идеале должна максимально соответствовать профилю эндогенной секреции инсулина у здоровых людей. Физиологическую потребность в инсулине можно разделить на две фазы: (а) фаза

10 всасывания питательных веществ, требующая импульсного поступления инсулина для устранения всплеска глюкозы в крови, связанного с приемом пищи, который также известен как «прандиальный» инсулин, и (b) фаза после всасывания, требующая пролонгированной доставки инсулина для регулирования выработки глюкозы печенью для поддержания оптимального уровня глюкозы в крови натощак, который также известен

15 как «базальный» инсулин.

Эффективная инсулиноterapia для людей с диабетом обычно может включать комбинированное применение двух типов экзогенных препаратов инсулина: быстродействующего прандиального инсулина во время приема пищи и базального

20 инсулина более длительного действия, который вводят один раз или два раза в сутки для контроля уровней глюкозы в крови между приемами пищи. Одна или более характеристик эндогенного инсулина, которые может быть желательно имитировать, включают связывающую аффинность к инсулиновым рецепторам человека, предпочтительное связывание с инсулиновыми рецепторами человека по сравнению с рецептором IGF-1 человека, фосфорилирование инсулиновых рецепторов человека и снижение уровня

25 глюкозы в крови.

Подходящий экзогенный базальный инсулин также должен обеспечивать пролонгированное действие, т. е. он должен обеспечивать контроль уровней глюкозы в крови в течение по меньшей мере 24 часов или более, и наиболее предпочтительно в течение 168 часов или более без существенного риска гипогликемии. Некоторые

30 препараты базального инсулина имеют продолжительность действия 24 часа или более. Соединение с пролонгированным профилем действия, без существенного изменения эффективности в течение этого времени, может снижать риск ночной гипогликемии и обеспечивать возможность более свободного изменения времени ежедневного введения доз без увеличения риска гипогликемии у пациента. Поэтому крайне желательно

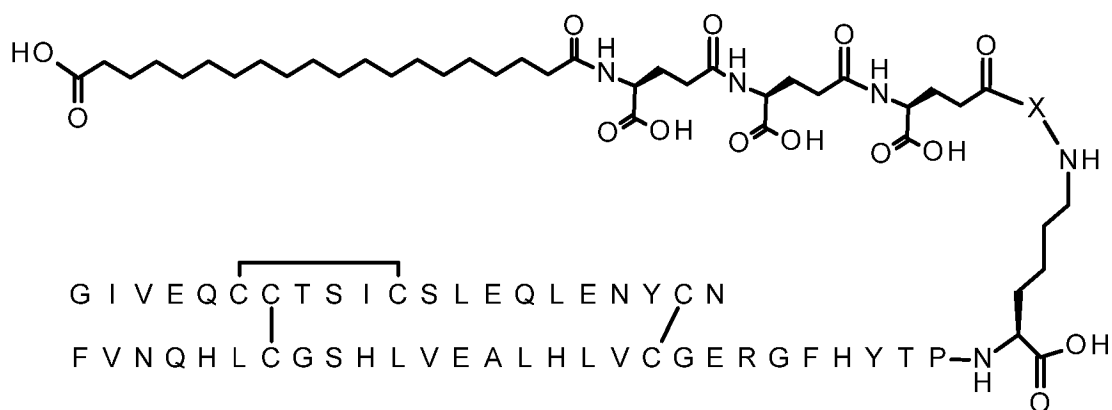
35 еженедельное введение. Характеристики экзогенного базального инсулина, которые могут

быть желательными, включают ослабленное связывание с рецептором, что может приводить к снижению скорости выведения из кровотока, и/или химическую стабильность при различных концентрациях, что может способствовать увеличению стабильности при хранении и/или стабильности в концентрированном препарате, что дало бы возможность использовать его в многодозовых устройствах.

Существует потребность в альтернативных способах лечения диабета и/или гипергликемии у пациентов. Известны некоторые ацилированные соединения инсулина, см., например, патент США № 7615532, патенты США № 10400021, 9045560, 9018161, но сохраняется потребность в дополнительных альтернативных способах лечения.

Настоящее изобретение относится к ацилированным соединениям инсулина пролонгированного действия, пригодным для лечения диабета, снижения уровня гемоглобина A1c и/или снижения уровней глюкозы в крови у нуждающихся в этом пациентов. Соединения согласно настоящему изобретению обладают любой из следующих желательных характеристик: более медленная скорость выведения, чем у известных препаратов ацилированного инсулина (например, инсулина деглудек), повышенная биодоступность, более стабильный во времени фармакокинетический профиль у людей и/или увеличенная продолжительность действия соединения *in vivo*. Кроме того, соединения согласно настоящему изобретению демонстрируют низкую скорость химического разложения, что свидетельствует о том, что они обладают повышенной химической стабильностью и/или могут иметь больший срок годности, чем известные препараты ацилированного инсулина.

Изобретение относится к соединению формулы I:



где X выбран из группы, состоящей из -Lys-Gly-, -Lys-(2-[2-(2-аминоэтоксид)этоксид]уксусной кислоты)- и -eLys-Gly-; или его фармацевтически приемлемой соли.

Таким образом, соединение формулы I представляет собой модифицированный инсулин человека, состоящий из:

последовательности цепи A SEQ ID NO:1, в которой нативный аминокислотный остаток тирозина в положении A14 мутирован в аминокислотный остаток глутаминовой кислоты,

и последовательности цепи B SEQ ID NO:2, в которой нативный аминокислотный остаток тирозина в положении B16 мутирован в аминокислотный остаток гистидина, нативный аминокислотный остаток фенилаланина в положении B25 мутирован в аминокислотный остаток гистидина, и нативный аминокислотный остаток треонина в положении B30 удален; где: между цистеином в положении 6 SEQ ID NO:1 и цистеином в положении 11

SEQ ID NO:1 существует дисульфидная связь, между цистеином в положении 7 SEQ ID NO:1 и цистеином в положении 7 SEQ ID NO:2 существует дисульфидная связь, и между цистеином в положении 20 SEQ ID NO:1 и цистеином в положении 19 SEQ ID NO:2 существует дисульфидная связь; и где

аминокислотный остаток лизина в положении B29 химически модифицирован путем

конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи лизина с $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\text{Lys}-\text{Gly}-$, $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\text{Lys}-(2-[2-(2-$

аминоэтокси)этокси]уксусной кислотой)- или $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\epsilon\text{Lys}-\text{Gly}-$; или его фармацевтически приемлемую соль.

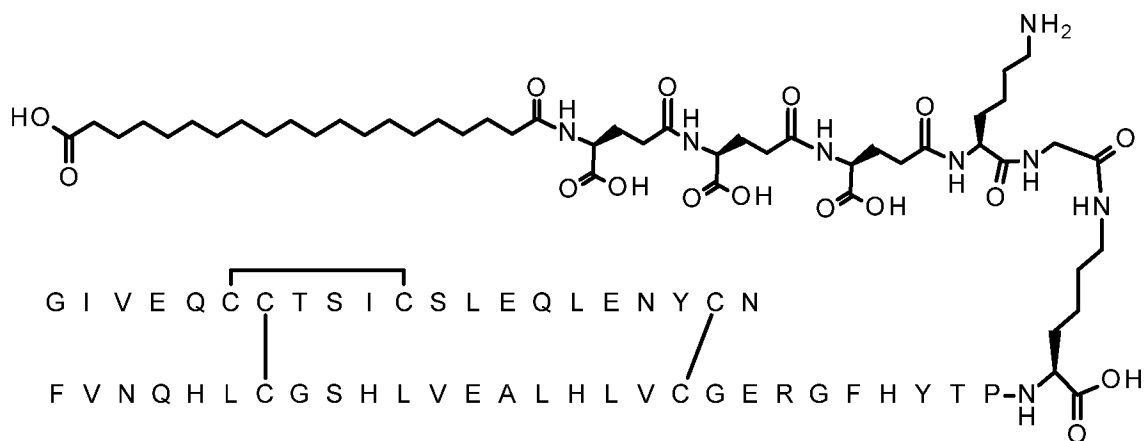
Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения X представляет собой $-\text{Lys}-\text{Gly}-$; или его фармацевтически приемлемая соль.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения X представляет собой $-\text{Lys}-(2-[2-(2\text{-аминоэтокси)этокси]уксусную кислоту})-$; или его фармацевтически приемлемая соль.

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения X представляет собой $-\epsilon\text{Lys}-\text{Gly}-$; или его фармацевтически приемлемая соль.

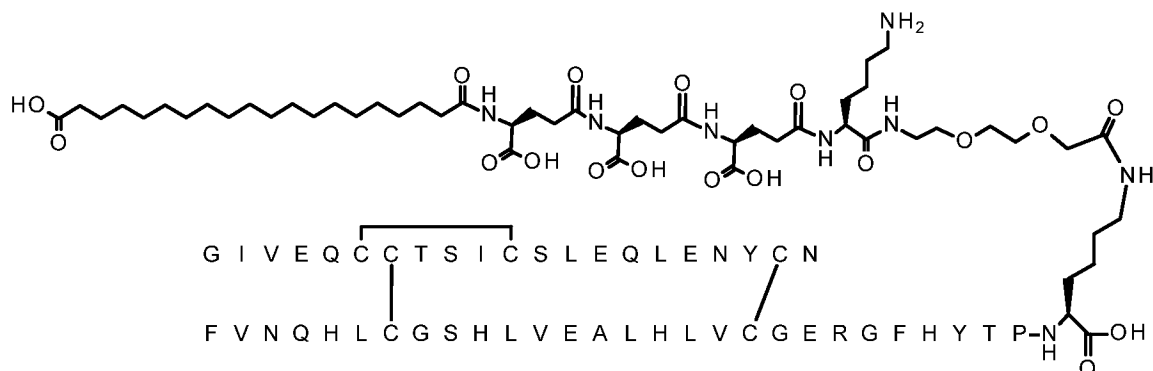
В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения X представляет собой $-\text{Lys}-\text{Gly}-$; или его фармацевтически приемлемая соль.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предложено соединение, представляющее собой:



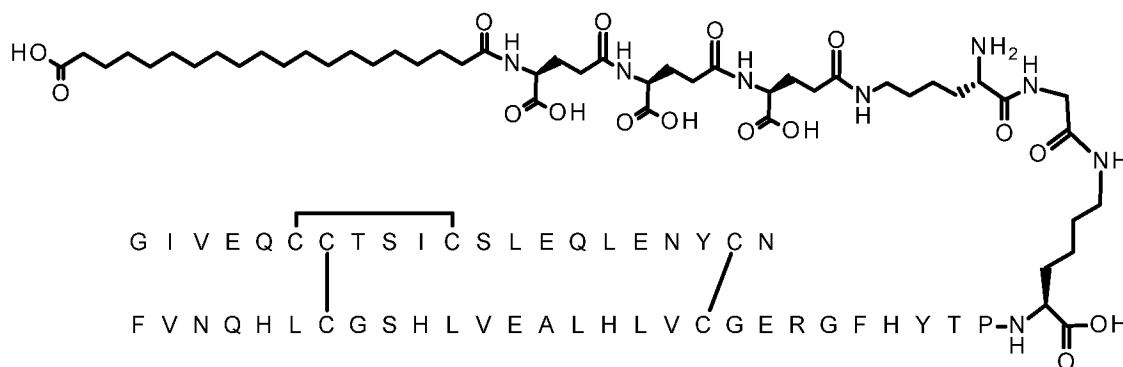
которое представляет собой соединение формулы I, состоящее из цепи А,
соответствующей SEQ ID NO:1, цепи В, соответствующей SEQ ID NO:3, где эpsilon-
аминогруппа боковой цепи лизина в положении 29 на цепи В химически модифицирована
5 путем конъюгации с HO₂C-(CH₂)₁₈-CO-γGlu-γGlu-γGlu-Lys-Gly-; или его фармацевтически
приемлемую соль.

Предпочтительно настоящее изобретение относится к соединению,
представляющему собой:



10 которое представляет собой соединение формулы I, состоящее из цепи А,
соответствующей SEQ ID NO:1, цепи В, соответствующей SEQ ID NO:4, где эpsilon-
аминогруппа боковой цепи лизина в положении 29 на цепи В химически модифицирована
путем конъюгации с HO₂C-(CH₂)₁₈-CO-γGlu-γGlu-γGlu-Lys-(2-[2-(2-
15 аминоэтокси)этокси]уксусной кислотой)-; или его фармацевтически приемлемую соль.

Предпочтительно настоящее изобретение включает соединение, представляющее
собой:



которое представляет собой соединение формулы I, состоящее из цепи А,
 соответствующей SEQ ID NO:1, цепи В, соответствующей SEQ ID NO:5, где эпислон-
 5 аминогруппа боковой цепи лизина в положении 29 на цепи В химически модифицирована
 путем конъюгации с $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\varepsilon\text{Lys}-\text{Gly}-$; или его
 фармацевтически приемлемую соль.

Согласно другому аспекту настоящей заявки предложена фармацевтическая
 композиция, содержащая соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую
 10 соль и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

В другом аспекте настоящей заявки предложен способ лечения диабета I типа
 и/или II типа у пациента, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту
 эффективного количества соединения формулы I согласно настоящему изобретению, или
 его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей
 15 соединение формулы I.

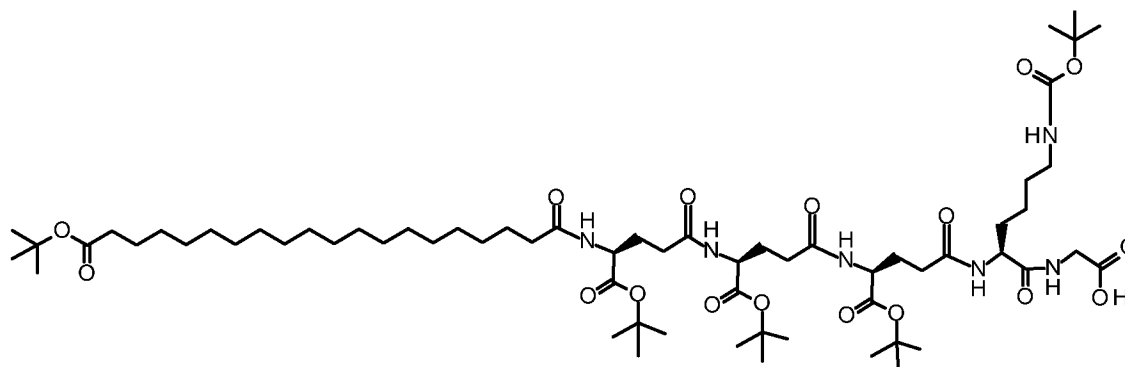
В еще одном аспекте настоящей заявки предложен способ лечения гипергликемии
 у пациента, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного
 количества соединения формулы I согласно настоящему изобретению, или его
 фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей
 20 соединение формулы I.

В другом аспекте настоящей заявки предложено соединение формулы I или его
 фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

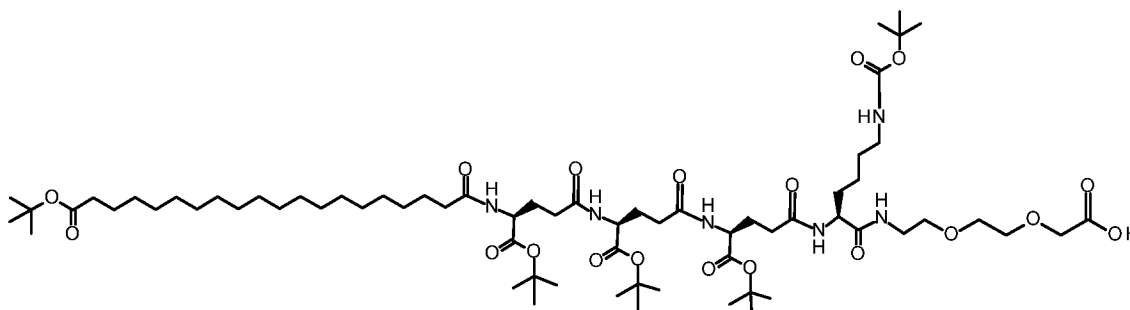
Также в настоящей заявке предложено соединение формулы I или его
 фармацевтически приемлемая соль для применения для лечения диабета и/или лечения
 25 гипергликемии.

Соединения согласно настоящему изобретению получают с применением новых
 промежуточных соединений, описанных ниже.

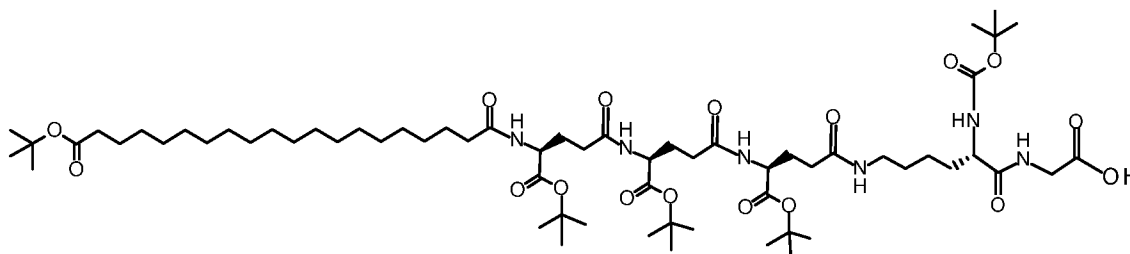
Согласно еще одному аспекту настоящей заявки предложено соединение А, имеющее формулу:



5 В настоящей заявке также предложено соединение В, имеющее формулу:



В настоящей заявке также предложено соединение С, имеющее формулу:



10 В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения соединения формулы I с применением соединения, выбранного из любого из соединений А, В и С.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено применение любого из соединений формулы I или их фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения диабета I типа и/или II типа, и/или гипергликемии.

15 В настоящей заявке также предложено применение любого из соединений А, В или С для получения или производства соединений формулы I или их фармацевтически приемлемой соли.

Термин «лечить» или «лечение» в настоящем документе относится к тактике ведения и уходу за пациентом с диабетом или гипергликемией или другим патологическим состоянием, при котором показано введение инсулина с целью борьбы с или облегчения симптомов и осложнений указанных патологических состояний. Пациент, подлежащий лечению, представляет собой животное, и предпочтительно человека.

В настоящем документе термин «эффективное количество» относится к такому количеству или дозе соединения согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей соединение согласно настоящему изобретению, которое при однократном или многократном введении доз пациенту или субъекту обеспечивает биологический или медицинский ответ, или требуемый терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, который требуется исследователю, ветеринару, врачу или другому клиницисту. Доза может включать в себя более высокую начальную нагрузочную дозу с последующей более низкой дозой.

Термины «пациент», «субъект» и «индивидуум» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к животному. Предпочтительно указанные термины относятся к людям. В отдельных вариантах осуществления пациент, предпочтительно человек, дополнительно характеризуется заболеванием, или расстройством, или патологическим состоянием, при котором снижение уровней глюкозы в крови оказало бы положительный эффект.

Фармацевтические композиции, содержащие соединение согласно настоящему изобретению, могут быть введены парентерально пациентам, нуждающимся в таком лечении. Парентеральное введение может осуществляться путем подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции с помощью шприца, необязательно шприца-ручки, или механического инжектора. В качестве альтернативы, парентеральное введение может быть осуществлено с помощью инфузионного насоса.

В вариантах осуществления настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, пригодные для введения, предпочтительно еженедельного введения, пациенту, включающего введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению и одного или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Такие фармацевтические композиции могут быть получены любым из множества способов с применением общепринятых вспомогательных веществ для фармацевтических препаратов, которые хорошо известны в данной области техники. (Remington's

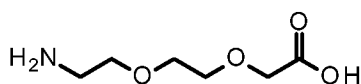
Pharmaceutical Sciences, 21st Edition, University of the Sciences in Philadelphia, Philadelphia, PA, USA (2006)).

Заявленные соединения могут применяться в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, пригодными для лечения диабета и/или патологических состояний, связанных с диабетом. Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических агентов, которые могут применяться в комбинации с заявленными соединениями, включают: инсулин или аналоги инсулина; бигуаниды; сульфонилмочевины; тиазолидиндионы; ингибиторы дипептидилпептидазы-4 («DPP-4»); ингибиторы натрий-зависимого транспортера глюкозы (SGLT2); соединения инкретина, такие как глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1) или аналоги GLP-1, желудочный ингибиторный полипептид (GIP) или аналоги GIP, оксинтомодулин или аналоги оксинтомодулина; или комбинации любых из вышеуказанных агентов. Заявленные соединения и дополнительный терапевтический агент (агенты) могут быть либо введены вместе при помощи одного и того же способа и устройства доставки, например, одного драже, капсулы, таблетки или инъекционной лекарственной формы; либо введены по отдельности в одно и то же время при помощи отдельных устройств или способов доставки, или последовательно.

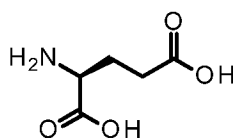
В настоящем документе термин «ВНН» означает биосинтетический инсулин человека, «ТФА» означает трифторуксусную кислоту, «Вос» означает трет-бутилоксикарбонил, «tBu» означает трет-бутил, «РуВор» означает бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфоний гексафторфосфат, «ДМФА» означает диметилформамид, «DIEA» означает диизопропилэтиламин, «ДХМ» означает дихлорметан, «HFIP» означает гексафторизопропанол, «ACN» означает ацетонитрил, «Fmoc» означает флуоренилметилоксикарбонил, «ДМСО» означает диметилсульфоксид, «ТСИ» означает двухцепочечный инсулин, «SCI» означает одноцепочечный инсулин, «TIS» означает триизопропилсилан, «TSTU» означает (O-(N-сукцинимидил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний тетрафторборат, «Su» означает сукцинимидил, «СрВ» означает карбоксипептидазу В, «ОФ-ВЭЖХ» означает обращенно-фазовую ВЭЖХ, «ч» означает час, «мин» означает минуту, «ЭДТА» означает этилендиаминтетрауксусную кислоту, «BSA» означает бычий сывороточный альбумин, «HSA» означает человеческий сывороточный альбумин, «C20-ОН» означает эйкозандиовую кислоту, «γGlu» означает L-глутаминовую кислоту, связанную через гамма-карбоксильную группу ее боковой цепи, «Lys» означает L-лизин, «εLys» означает L-лизин, связанный через эпсилон-аминогруппу его боковой цепи, и Gly означает глицин.

Формула I содержит стандартные однобуквенные обозначения аминокислот для аминокислотных остатков цепи А и цепи В инсулина, за исключением остатка 29 цепи В, который представляет собой лизин, и структура данного аминокислотного остатка пояснена. C20-OtBu представляет собой CO-(CH₂)₁₈-CO₂-трет-бутил, а также называется 20-трет-бутоксиг-20-оксо-эйкозановой кислотой, γ Glu(OtBu) представляет собой α -трет-бутиловый эфир L-глутаминовой кислоты, Lys(Boc) представляет собой эпсилон-амино-трет-бутоксикарбонил-L-лизин. A14E, B16H, B25H, desB30-двухцепочечный инсулин человека (TCI; A14E, B16H, B25H, desB30-BHI) относится к модифицированному инсулину человека, в котором аминокислотный остаток тирозина в положении 14 цепи А мутирован в аминокислотный остаток глутаминовой кислоты, нативный аминокислотный остаток тирозина в положении 16 цепи В мутирован в аминокислотный остаток гистидина, нативный аминокислотный остаток фенилаланина в положении 25 цепи В мутирован в аминокислотный остаток гистидина, и нативный аминокислотный остаток треонина в положении B30 удален.

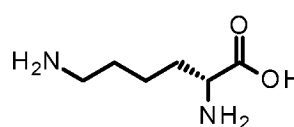
Структуры 2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]уксусной кислоты, γ Glu и ϵ Lys.



2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота



γ -Glu



ϵ -Lys

Пример 1 представляет собой соединение формулы I, которое может быть получено путем селективного ацилирования эпсилон-аминогруппы лизина в положении 29 цепи В промежуточным соединением линкер-жирная кислота: C20-OtBu- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Gly-OH, где C20-OtBu представляет собой 20-трет-бутоксиг-20-оксо-эйкозановую кислоту, γ Glu(OtBu) представляет собой α -трет-бутиловый эфир L-глутаминовой кислоты, связанный через гамма-карбоксильную группу его боковой цепи, Lys(Boc) представляет собой эпсилон-амино-трет-бутоксикарбонил L-лизина, и Gly представляет собой глицин.

Пример 2 представляет собой соединение формулы I, которое может быть получено путем селективного ацилирования эпсилон-аминогруппы лизина в положении 29 цепи В промежуточным соединением линкер-жирная кислота: C20-OtBu- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)-Lys(Boc)-(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота)-OH, где C20-OtBu представляет собой 20-трет-бутоксиг-20-оксо-эйкозановую кислоту, γ Glu(OtBu)

представляет собой α -трет-бутиловый эфир L-глутаминовой кислоты, связанный через гамма-карбоксильную группу его боковой цепи, Lys(Boc) представляет собой эпсилон-амино-трет-бутоксикарбонил-L-лизин.

Пример 3 представляет собой соединение формулы I, которое может быть получено путем селективного ацилирования эпсилон-аминогруппы лизина в положении 29 цепи В промежуточным соединением линкер-жирная кислота: C20-OtBu- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)- ϵ Lys(Boc)-Gly-OH, где C20-OtBu представляет собой 20-трет-бутокси-20-оксо-эйкозановую кислоту, γ Glu(OtBu) представляет собой α -трет-бутиловый эфир L-глутаминовой кислоты, связанный через гамма-карбоксильную группу его боковой цепи, ϵ Lys(Boc) представляет собой альфа-амино-трет-бутоксикарбонил-L-лизин, связанный через эпсилон-аминогруппу его боковой цепи, и Gly представляет собой глицин, с последующим удалением кислотоллабильных защитных групп Boc и tBu.

Получение соединения формулы I может быть осуществлено в три основных этапа: 1) получение A14E, B16H, B25H, desB30-BHI, 2) синтез промежуточного соединения линкер-жирная кислота и 3) ацилирование, снятие защиты, очистка и обмен солями для выделения соединения формулы I.

Инсулиновая часть предложенных соединений может быть получена различными способами, известными специалистам в данной области техники, например, через получение молекулы белка-предшественника с использованием технологий рекомбинантных ДНК. ДНК, включая кДНК и синтетическую ДНК, может быть двухцепочечной или одноцепочечной. Кодировующие последовательности, которые кодируют молекулу белка-предшественника, описанную в настоящем документе, могут варьироваться в результате избыточности или вырожденности генетического кода. ДНК может быть введена в клетку-хозяина для получения белка-предшественника согласно настоящему изобретению. Подходящую клетку-хозяина временно или стабильно трансфицируют или трансформируют системой экспрессии для продуцирования белка-предшественника. Клетки-хозяева могут представлять собой бактериальные клетки, такие как штаммы K12 или B *Escherichia coli*, клетки грибов, такие как дрожжевые клетки, или клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка («CHO»).

Векторы экспрессии, как правило, реплицируются в организмах-хозяевах либо в виде эписомы, либо в составе хромосомной ДНК хозяина. Как правило, векторы экспрессии содержат маркеры отбора, например, тетрациклин, неомицин и

дигидрофолатредуктазу, для обеспечения возможности отбора клеток, трансформированных требуемыми последовательностями ДНК.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть получены различными методами, известными в данной области техники, а также способами, описанными ниже.

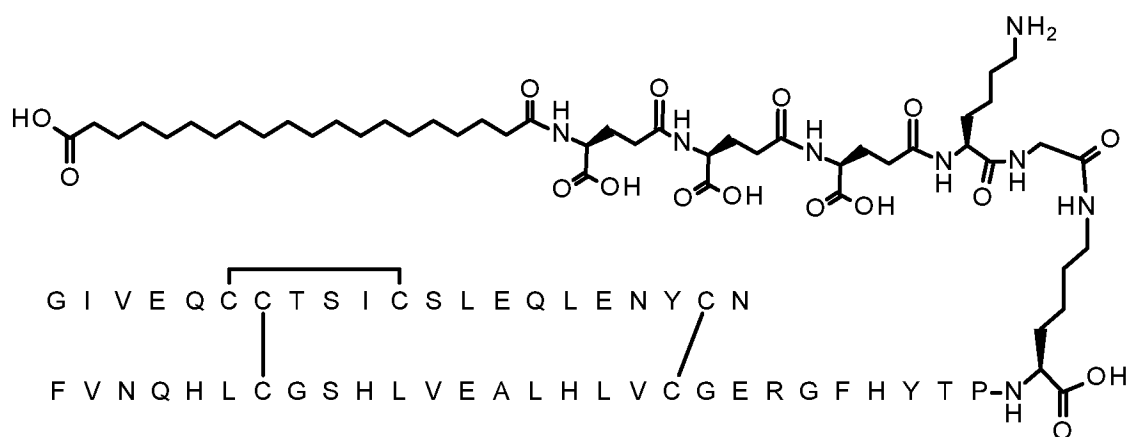
- 5 Конкретные этапы синтеза для каждого из описанных путей можно объединять различным образом для получения соединений, описанных в настоящем документе.

Примеры 2 и 3 получают аналогично Примеру 1.

Получение ацилированного инсулина формулы I

10

Пример 1



Пример 1 представляет собой соединение формулы I, состоящее из цепи А, соответствующей SEQ ID NO:1, цепи В, соответствующей SEQ ID NO:3, где Lys в положении 29 цепи В химически модифицирован путем конъюгации с $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\text{Lys}-\text{Gly}-$.

15

Обзор синтеза Примера 1: Пример 1 получают селективным ацилированием эpsilon-аминогруппы лизина в положении 29 цепи В зрелого биосинтетического A14E, B16H, B25H, desB30-двухцепочечного инсулина человека (TCI; A14E, B16H, B25H, desB30-BHI) или прямым ацилированием аналогичной эpsilon-аминогруппы лизина в положении 29 цепи В конструкции одноцепочечного инсулина (SCI; препроинсулин A14E, B16H, B25H, desB30-BHI) промежуточным соединением линкер-жирная кислота, обозначенным как соединение А ($\text{C}_{20}\text{-OtBu}-\gamma\text{Glu}(\text{OtBu})-\gamma\text{Glu}(\text{OtBu})-\gamma\text{Glu}(\text{OtBu})-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Gly}-\text{OH}$).

20

Предпочтительным способом является ацилирование конструкции препроинсулина SCI.

25

Этот способ обеспечивает более высокую эффективность ацилирования эpsilon-аминогруппы лизина в положении 29 цепи В, поскольку аминоконцы A1 и B1 молекулы

инсулина блокируются С-пептидом и лидерной последовательностью соответственно.

Полностью зрелый двухцепочечный продукт Примера 1 получают путем

ферментативного расщепления с помощью СрВ и трипсина с последующими этапами ацилирования и снятия защиты посредством TFA. Хотя ацилирование N-конца

- 5 конструкции SCI и происходит, что приводит к дважды ацилированному побочному продукту, ферментативное удаление лидерной последовательности также превращает это вещество в требуемый продукт.

Получение молекулы происходит в три основных этапа:

- 1) Экспрессия *E. coli* и очистка одноцепочечной конструкции препроинсулина (SCI): она может быть использована для предпочтительного способа ацилирования или она может быть ферментативно превращена в зрелый двухцепочечный аналог инсулина (TCI, A14E, B16H, B25H, desB30-BHI);
- 10

2) синтез промежуточного соединения линкер-жирная кислота (соединение А); и

- 3а) ацилирование, снятие защиты с TCI или 3б) ацилирование, снятие защиты и ферментативное расщепление SCI с последующей очисткой и обменом солями с получением Примера 1.
- 15

Разработан новый вектор экспрессии, который используется в ферментации посредством *E. coli* для создания конструкции инсулина SCI; он состоит из следующей последовательности (SEQ ID NO:7):

20 MNNNNNNHQAIFVLQGSGLDQDPEFENLYFQIEGGRFVNQHL CGSHLVEALH
1 10 20 30 40 50
LVCGERGFHYTPKRREAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQRGIV
60 70 80 90 100
EQCCTSI CSL EQLENYCN
25 110 118

где остатки 1-34 составляют лидерный пептид, остатки 35-63 составляют цепь В (desB30T), остатки 64-97 составляют модифицированный С-пептид (des64K согласно системе нумерации нативного проинсулина), а остатки 98-118 составляют цепь А.

Дисульфидные связи соответствуют природным дисульфидным связям инсулина.

- 30 Дисульфидные связи находятся между C41 и C104; C53 и C117; и C103 и C108. При ферментативном расщеплении СрВ и трипсином образуется полностью зрелый аналог TCI:

GIVEQCCTSI CSLEQLENYC N (SEQ ID NO:1)

10 20
 FVNQHLCGSH LVEALHLVCG ERGFHYTPK (SEQ ID NO:8)
 10 20 29

Дисульфидные связи находятся между C7 (SEQ ID NO:1) и C7 (SEQ ID NO:8); C20
 5 (SEQ ID NO:1) и C19 (SEQ ID NO:8); и C6 (SEQ ID NO:1) и C11 (SEQ ID NO:1). Следует
 отметить, что обе конструкции SCI и TCI пропускают через стандартные колонки для ОФ-
 ВЭЖХ для очистки и лиофилизируют в виде твердых солей TFA перед проведением
 реакций ацилирования. Молекулу линкера-жирной кислоты получают с помощью
 твердофазного синтеза. Эта молекула может быть получена с использованием только
 10 жидкофазных методов или в сочетании с твердофазными методами.

Конъюгацию линкера-жирной кислоты с TCI или SCI A14E, B16H, B25H, desB30-
 ВНІ проводят в сухом органическом растворителе (ДМСО) ввиду растворимости линкера-
 жирной кислоты на основе Вос/tBu-защитенной аминокислоты. Однако могут быть
 разработаны альтернативные схемы защиты/снятия защиты для обеспечения
 15 растворимости линкера-жирной кислоты в водном растворе для минимизации
 использования органических растворителей. Аналогичным образом, химическое
 превращение в кислых условиях для удаления защитных групп Вос/tBu с использованием
 трифторуксусной кислоты (TFA) может быть достигнуто альтернативными способами.

20 **Получение молекулы линкер-жирная кислота, соединения А, с помощью твердофазного синтеза**

Соединение А, (C20-OtBu)-γGlu(OtBu)-γGlu(OtBu)-γGlu(OtBu)-Lys(Boc)-Gly-OH,
 получали с помощью твердофазного пептидного синтеза. Fmoc-Lys(Boc)-OH (769 мг, 1,6
 ммоль, 1,5 экв. по отношению к смоле) смешивали с PyBop (849 мг, 1,6 ммоль, 1,49 экв. по
 отношению к смоле) и DIEA (1520 мкл, 8,7 ммоль, 8 экв.) в 10 мл ДМФА в течение 2
 25 минут, а затем переносили в реакционный сосуд, содержащий H-Gly-2-хлортритил-
 хлоридную смолу (1,1 г, 0,99 ммоль/г, 1,1 ммоль; Peptides International RHG-1160-PI),
 которая предварительно была подвергнута набуханию в ДХМ и предварительно промыта
 ДМФА. Суспензию перемешивали в течение 1,5 часов, фильтровали и затем тщательно
 промывали смолу ДМФА (тест Кайзера – отрицательный). Защитную группу Fmoc
 30 удаляли обработкой смолы 20% пиперидином/ДМФА (10 мл, 30 мин). После промывки
 смолы ДМФА (40 мл) тест Кайзера был положительным, получали H-Lys(Boc)-Gly-2-
 хлортритил-хлоридную смолу (теоретически 1,1 ммоль).

Fmoc-Glu-OtBu (701 мг, 1,6 ммоль, 1,5 экв.) предварительно активировали (2 мин) с
 помощью PyBop (845 мг, 1,6 ммоль, 1,49 экв.), используя DIEA в качестве основания

(1520 мкл, 8,7 ммоль, 8,0 экв.), в 10 мл ДМФА, и переносили на смолу. Суспензию перемешивали в течение 3 часов, фильтровали и тщательно промывали смолу ДМФА (тест Кайзера – отрицательный). Защитную группу Fmoc удаляли обработкой смолы 20% пиперидином/ДМФА (10 мл, 30 мин) с последующей промывкой смолы ДМФА (40 мл, тест Кайзера – положительный). Второй и третий остатки Fmoc-Glu-OtBu связывали со смолкой, повторяя условия, описанные выше, и используя время связывания 1,5 часа.

После удаления последней защитной группы Fmoc 20-трет-бутокси-20-оксо-эйкозановую кислоту (660 г, 1,60 ммоль, 1,5 экв.) предварительно активировали (2 мин) с помощью PyBop (845 г, 1,6 ммоль, 1,49 экв.), используя DIEA в качестве основания (1520 мкл, 8,7 ммоль, 8,0 экв.), в 10 мл ДМФА, и переносили на смолу. Суспензию перемешивали в течение 3 часов, фильтровали и тщательно промывали смолу ДМФА (тест Кайзера – отрицательный). Отщепление от смолы: защищенное соединение линкер-жирная кислота отщепляли от смолы, смешивая его с 30% HFIP/ДХМ (20 мл) на 1 час. Смолу отфильтровывали и тщательно промывали ДХМ. Объединенные фильтраты упаривали до получения масла в вакууме. Остаточное масло разбавляли ACN (15-20 мл) и снова упаривали в вакууме до получения масла. Образец снова растворяли в ACN (15-20 мл) и упаривали в вакууме с получением масла. С помощью слабого потока азота выпаривали остаточный ацетонитрил с получением 2,3 г неочищенного аморфного твердого вещества (теоретический выход = 1,4 г).

Очистка: неочищенный образец растворяли в 2 мл ДМФА и 20 мл ACN (включая промывки колбы). Затем добавляли воду с получением 35 мл мутного раствора. После добавления еще 10 мл ACN получали прозрачный раствор (общий объем составлял 45 мл (33% в воде)). Очистку осуществляли, загружая образец на полупрепаративную циано-модифицированную колонку для ОФ-ВЭЖХ (SilaChrom XDB1-CN; 10 мкм, 100 Å; 2,1 x 25 см). Образец элюировали, используя 40-75% градиент В в течение 71 мин, 15 мл/мин, при 60 °C (буфер А = 0,15% TFA в воде и буфер В = ACN). Фракции, которые, по данным аналитической ОФ-ВЭЖХ, содержали требуемый продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением 696 г соединения А в виде белого аморфного твердого вещества (52% от теоретического; чистота по ОФ-ВЭЖХ 91%; набл. ММ (молекулярная масса) = 1239,6 дальтон; теоретическая ММ = 1239,65 дальтон).

Соединение В, (C20-OtBu)-γGlu(OtBu)-γGlu(OtBu)-γGlu(OtBu)-Lys(Boc)-(2-[2-(2-аминоэтоксид)этоксид]уксусная кислота)-ОН, получали по существу как описано в методике синтеза соединения А, но с заменой исходной смолы на H-(2-[2-(2-аминоэтоксид)этоксид]уксусная кислота)-2-хлортритил-хлоридную смолу (1,8 г, 0,62

ммоль/г, 1,1 ммоль; Peptides International RHX-11074-PI). Соединение В выделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ в виде белого аморфного твердого вещества. Набл. ММ = 1327,5 дальтон; теоретическая ММ = 1327,73 дальтон.

Соединение С, (C20-OtBu)- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)- ϵ Lys(Boc)-Gly-OH, получали по существу как описано в методике синтеза соединения А, но с заменой структурного блока Fmoc-Lys(Boc)-OH на Boc-L-Lys(Fmoc)-OH. Соединение С выделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ в виде белого аморфного твердого вещества. Набл. ММ = 1239,5 дальтон; теоретическая ММ = 1239,65 дальтон.

10 Ацилирование, снятие защиты, очистка и обмен солями для выделения Примера 1

Ацилирование: соединение А ((C20-OtBu)- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Gly-OH) (60,8 мг; 0,0437 ммоль; 1,2 экв.; синтез описан выше) и TSTU (12,04 мг 0,040 ммоль; 1,1 экв.) растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). К этому раствору добавляли диизопропилэтиламин (DIEA, 25,3 мкл; 0,145 ммоль; 4 экв.) и инкубировали полученную смесь при комнатной температуре в течение 30 минут с получением соединения А-OSu-эфира в ДМСО, который сразу же использовали.

К раствору двухцепочечного инсулина A14E, B16H, B25H, desB30-BHI (соль TFA; 205 мг; 0,0364 ммоль), растворенного в 2 мл сухого диметилсульфоксида (ДМСО), добавляли 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU; 81,6 мкл, 0,546 ммоль, 15 экв., кат. № Sigma-Aldrich 33482), после чего сразу же добавляли вышеупомянутый соединения А-OSu-эфир в сухом ДМСО. Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 12 минут и добавляли к смеси диэтиловый эфир/ДХМ/TFA (30:10:0,2 об./об.; объем 40 мл). Полученный белый осадок выделяли центрифугированием, а затем один раз растирали с диэтиловым эфиром.

Снятие защиты (удаление групп Boc и OtBu): вышеупомянутый смоченный простым эфиром белый осадок обрабатывали смесью TFA/триизопропилсилан (TIS)/вода (92,5:5,0:2,5 об./об.; 5 мл) в течение 20 минут. Добавляли диэтиловый эфир (40 мл) и собирали полученный осадок центрифугированием, один раз промывали простым эфиром и сушили. Анализ методом обращённо-фазовой (ОФ) ВЭЖХ показал, что стадия снятия защиты была завершена (9% непрореагировавшего A14E, B16H, B25H, desB30-BHI; 61% B29-ацилированного продукта; 13% A1, B29-бис-ацилированного продукта).

Очистка: вышеупомянутый неочищенный продукт растворяли в 20 mM трис-HCl, pH 8/ACN (60:40 об./об.; 15 мл). Измерение pH с помощью тест-полосок показало кислый pH от 2 до 3. Уровень регулировали добавлением 2 мл 1 M трис-HCl (pH 8), чтобы довести

раствор до pH 8. Проводили анионообменную хроматографию на анионообменной колонке GE Source 30Q (2,6 x 10 см) с использованием буфера А: 20 mM трис-HCl, pH 8/ACN (60/40 об./об.) и буфера В: 20 mM трис-HCl, pH 8, с 0,5 NaCl/ACN (60/40 об./об.) в качестве начальной стадии очистки. Образец загружали в колонку и промывали буфером А до тех пор, пока не был достигнут устойчивый исходный уровень УФ. Образец элюировали многоступенчатым градиентом: 0-8% В в течение 1 мин, затем 8-50% В в течение 59 мин и, наконец, удерживание 90% В в течение 12 мин. Скорость потока была установлена на уровне 10 мл/мин, с УФ-детектированием при 225 нм и 280 нм, а время сбора фракций было установлено на 0,5 минуты. Аналитическую ОФ-ВЭЖХ с колонкой Waters X Select CSH C18, 4,6x50 мм использовали для идентификации фракций, содержащих требуемый продукт. Нужные фракции объединяли (общий объем ~80 мл) и разбавляли до 200 мл водой milli-Q.

Очистка с помощью ОФ-ВЭЖХ: вышеупомянутые разбавленные фракции загружали в колонку Kromasil C18 (2,1x25 см) и дополнительно очищали с использованием стандартного градиента TFA/вода/ACN. Буфер А = 0,15% TFA/вода и буфер В = ACN. Образец элюировали многоступенчатым градиентом: 0-10% В в течение 1 мин, затем 10-45% В в течение 71 мин при скорости потока 15 мл/мин, время сбора фракции было установлено на 0,5 мин, и температура колонки составляла 50 °С. УФ-детектирование проводили при 225 нм и 280 нм. Аналитическую ОФ-ВЭЖХ с колонкой Waters X Select CSH C18, 4,6x50 мм использовали для идентификации фракций, содержащих требуемый продукт. Нужные фракции объединяли (общий объем ~113 мл; 99,8% по ОФ-ВЭЖХ).

Обмен солями, превращение в соль HCl: элюирующие буферы, использованные для превращения в соль HCl, представляли собой буфер А₁: 0,1 М водный раствор хлорида аммония и буфер А₂: 0,01% HCl с буфером В: ACN. Вышеупомянутые объединенные фракции разбавляли водой до 200 мл и повторно загружали в колонку Kromasil C18 (2,1x25 см) для ВЭЖХ. Колонку промывали тремя колоночными объемами буфера А₁, а затем тремя колоночными объемами буфера А₂. Образец элюировали с использованием градиента 0-10 % (А₂ – В) в течение 1 мин, затем 10-70% (А₂ – В) в течение 71 мин с УФ-детектированием при 225 нм и 280 нм. Фракции, содержащие желаемый продукт, идентифицировали с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ (колонка: Waters X Select CSH C18, 4,6x50 мм), объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением соединения Примера 1 в виде белого порошка (153 мг, 0,023 ммоль; общий выход 64%). Чистоту подтверждали аналитической ОФ-ВЭЖХ, и она составляла 98,9%.

Деконволюированный масс-спектр с электрораспылением (ESMS): набл. ММ: 6531,2 дальтон; теоретическая ММ: 6533,4 дальтон.

Альтернативный способ ацилирования SCI: соединение А ((C20-OtBu)- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)- γ Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Gly-OH) (584,6 мг; 0,424 ммоль; 3,5 экв.) и TSTU (125,6 мг, 0,417 ммоль; 3,4 экв.) растворяли в 1,0 мл сухого ДМСО. Добавляли DIEA (168,3 мкл; 0,966 ммоль; 8 экв.) и инкубировали полученную смесь при комнатной температуре в течение 30 минут с получением соединения А-О-(N-сукцинимидилового эфира (соединения А-OSu-эфира) в ДМСО, который сразу же использовали.

К раствору SCI-A14E, B16H, B25H, desB30-BHI (соль TFA; 1587 мг; 0,121 ммоль), растворенного в 16 мл сухого ДМСО, добавляли 1,8-дизабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU; 452 мкл, 3,02 ммоль, 25 экв., кат. № Sigma-Aldrich 33482) с последующим добавлением соединения А-OSu-эфира в ДМСО порциями (1,11 экв., 0,4 экв., 0,4 экв., 0,7 экв., 0,4 экв.) примерно с 10-минутными интервалами перед добавлением каждой порции. За ходом реакции следили с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ. После перемешивания реакционной смеси при температуре окружающей среды в течение в общей сложности 60 минут ее делили на две равные порции по 50 мл, заливали смесью диэтиловый эфир/ДХМ/TFA (30:10:0,2 об./об.; объем 40 мл). Образовавшийся белый осадок выделяли центрифугированием, промывали и дважды растирали с 30 мл диэтилового эфира.

Снятие защиты (удаление групп Boc и OtBu): каждый из вышеупомянутых смоченных простым эфиром белых осадков обрабатывали смесью TFA/триизопропилсилан (TIS; Aldrich)/вода (92,5:5,0:2,5 об./об.; 10 мл) в течение 30 минут. К каждой смеси добавляли диэтиловый эфир (40 мл) и собирали полученные осадки центрифугированием и один раз промывали простым эфиром. Собранные гранулы тщательно высушивали для удаления остаточного простого эфира и измельчали в мелкий порошок. Анализ методом ОФ-ВЭЖХ показал, что стадия снятия защиты была завершена (4% непрореагировавшего SCI-A14E, B16H, B25H, desB30-BHI; 51% B29-ацилированного продукта; 38% N-конец, B29 бис-ацилированного продукта).

Ферментативное расщепление (удаление лидерной последовательности и С-пептида): сухой порошкообразный неочищенный продукт полностью растворяли в 0,1 М трис-HCl, pH 8 (600 мл). К этому раствору добавляли 6,0 мл 0,1 М раствора CaCl₂, 6,363 мл исходного раствора карбоксипептидазы В (2,9 мг/мл в воде) и 1,587 мл исходного раствора трипсина (1,0 мг/мл в воде). Раствор инкубировали при комнатной температуре в течение 120 мин. Анализ методом аналитической ОФ-ВЭЖХ и ЖХ-МС подтвердил

полное образование зрелого соединения Примера 1 (IFA-197). Раствор подкисляли 45 мл ледяной уксусной кислоты (pH 2–3 по индикаторной бумаге).

Выделение расщепленного продукта с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ:

требуемый продукт, содержащийся в вышеупомянутом подкисленном растворе

- 5 гидролизата, выделяют в серии циклов очистки методом препаративной ОФ-ВЭЖХ. Как правило, требуемый продукт элюируют из колонки для ОФ-ВЭЖХ с использованием линейного градиента вода/ACN, содержащего 0,05% TFA, фракции, содержащие требуемый продукт, объединяют, замораживают и лиофилизируют. Если желаемая чистота достигается на этом этапе, анионообменную хроматографию (АЕХ) можно не
- 10 проводить.

Начальная стадия очистки с помощью препаративной АЕХ-хроматографии

(необязательная): Проводили АЕХ с анионообменной колонкой GE Source 30Q (2,6 x 11,5 см) с использованием буфера А: 20 mM Tris HCl, pH 8/ACN (60/40 об./об.) и буфера В: 20 mM трис-HCl, pH 8, с 0,5 NaCl/ACN (60/40 об./об.) для удаления любого оставшегося

15 С-пептида или лидерной последовательности. Две порции лиофилизированного порошка растворяли в 12 mM трис, pH 8/40% ACN (с дополнительным буфером 1 M трис-HCl, pH 8, чтобы довести pH до 8). Затем каждый раствор загружали в колонку для АЕХ, которую уравнивали 100% буфером А и промывали буфером А до тех пор, пока не был достигнут устойчивый исходный уровень УФ. Образцы элюировали линейным

20 градиентом 0-50% В в течение 60 мин и удерживали 100% В в течение 12 мин. Скорость потока была установлена на уровне 10 мл/мин, с УФ-детектированием при 225 нм и 280 нм, а время сбора фракций было установлено на 0,5 минуты.

- Аналитическую ОФ-ВЭЖХ с колонкой Waters XSelect CSH C18, 4,6x50 мм использовали для идентификации фракций, содержащих требуемый продукт. Нужные
- 25 фракции объединяли (общий объем 225 мл) и хранили при 4 °C до стадии обессоливания/превращения с HCl.

Обмен солями; превращение в соль HCl: обессоливание и превращение в форму

соли HCl достигалось одновременно с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ с

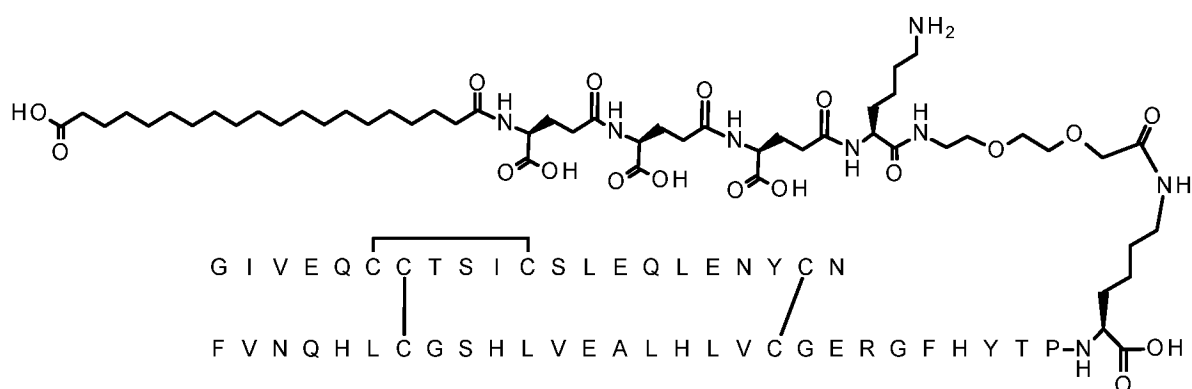
использованием колонки Phenomenex Luna C18(2) (2,1 x 25 см, 5 мкм, 100 Å) с буфером

- 30 А₁: 0,1 M водным раствором хлорида аммония и буфером А₂: 0,01% HCl с буфером В: ACN. Объединенный раствор со стадии очистки методом АЕХ делили на три равные части (по 75 мл каждая). Каждую часть разбавляли 75 мл воды milli-Q и 1,5 мл ледяной уксусной кислоты. Каждый раствор (~151 мл) загружали в колонку для ОФ-ВЭЖХ, уравниванную буфером А₁, промывали 2 колоночными объемами буфера А₁, 2

колоночными объемами буфера A₂. Образцы элюировали линейным градиентом 5-10 % (A₂–B) в течение 1 мин, затем 10–40 % (A₂–B) в течение 71 мин (15 мл/мин, при 55 °C). Фракции, содержащие требуемый продукт, идентифицировали с помощью ОФ-ВЭЖХ (колонок: Waters XSelect CSH C18, 4,6 x 50 мм), объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением соли HCl Примера 1 в виде белого аморфного порошка (354 мг, 0,054 ммоль; общий выход 45%). Чистоту подтверждали аналитической ОФ-ВЭЖХ, и она составляла 99%. ESMS: деконволюированный спектр: наблюдаемая ММ: 6531,2 дальтон; теоретическая ММ: 6533,4 дальтон.

10

Пример 2



Пример 2 представляет собой соединение формулы I, состоящее из цепи А, соответствующей SEQ ID NO:1, цепи В, соответствующей SEQ ID NO:4, где ε-аминогруппа боковой цепи Lys в положении 29 на цепи В химически модифицирована путем конъюгации с HO₂C-(CH₂)₁₈-CO-γGlu-γGlu-γGlu-Lys-(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]уксусной кислотой)-.

Пример 2 получали по существу как описано в методиках Примера 1, за исключением того, что на стадии ацилирования использовали ((C20-OtBu)-γGlu(OtBu)-γGlu(OtBu)-γGlu(OtBu)-Lys(Boc)-(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота)-OH) (соединение В). ESMS: деконволюированный спектр: наблюдаемая ММ: 6620,1 дальтон; теоретическая ММ: 6621,5 дальтон.

Пример 3

5

10

Аффинность к рецептору *in vitro*

15

20

25

Замороженные осадки клеток размораживали в ледяном буфере для гомогенизации/ресуспендирования (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5), содержащем одну таблетку ингибитора протеазы Complete® с ЭДТА (Roche Diagnostics) на 50 мл буфера. Клетки гомогенизировали с помощью гомогенизатора Potter-Elvehjem из тефлонового стекла с верхним приводом, используя от 15 до 20 ударов, с последующим центрифугированием при 1100×g в течение 10 минут при 4 °C. Супернатант хранили на льду и осадки гомогенизировали, как описано выше, и центрифугировали при 1100×g в течение 10 минут при 4 °C. Все супернатанты объединяли и затем центрифугировали при 35000 g в течение 60 минут при 4 °C. Осадок ресуспендировали в буфере (от 4 до 5 мл/г исходной клеточной пасты), содержащем ингибиторы протеазы, и быстро замораживали в жидком азоте, после чего хранили при -80 °C. Концентрацию белка определяли с использованием набора с бисинхониновой кислотой (BCA) (ThermoScientific) с BSA в качестве стандарта.

Аффинности связывания рецепторов (K_i) определяли в анализе конкурентного связывания радиолигандов либо с человеческим рекомбинантным (3-[125 I]-йодтирозил-A14)-инсулином (2200 Ки/ммоль), либо с человеческим рекомбинантным [125 I]-инсулиноподобным фактором роста-1 (1853 Ки/ммоль), оба были получены от Perkin Elmer. Анализы проводили методом сцинтилляционного анализа сближения (SPA) с использованием поливинилтолуоловых (PVT) гранул SPA, связанных с агглютинином зародышей пшеницы (Perkin Elmer). Буфер для анализа (50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl) содержал 0,1% (мас./об.) BSA, не содержащего жирных кислот, 0,001% (мас./об.) NP-40 (4-нонилфенилполиэтиленгликоль) или 0,1% (мас./об.) HSA, не содержащего жирных кислот, и его использовали для тестирования всех соединений и подготовки реагентов. Готовили десятиточечные кривые концентрация-эффект с использованием трехкратных последовательных разведений испытуемых образцов или контролей в буфере для анализа с использованием робота Freedom/Evo (Tecan®). Пятьдесят мкл разведенного соединения добавляли в 96-луночный белый микропланшет с прозрачным дном (Corning) с помощью робота TeMO (Tecan®), затем добавляли радиолиганд (50 мкл), мембраны (50 мкл) и гранулы SPA (50 мкл). все они были добавлены с помощью массового дозатора Multiflo F/X (Biotek). Конечная концентрация радиолиганда составляла ~40 пМ, а количество добавленных гранул SPA составляло 0,15 мг/лунку.

Константу аффинности (K_i) рассчитывали по значению IC_{50} на основании уравнения $K_i = IC_{50} / (1 + L^*/K_d)$, где L^* равен концентрации радиолиганда, использованного в эксперименте, а K_d равен равновесной константе связывающей

аффинности радиолиганда к соответствующему рецептору, определенной с помощью анализа методом насыщающего связывания.

Среднее геометрическое, $K_i = 10^{(\text{среднее арифметическое значений } \text{Log } K_i)}$

Ошибку рассчитывали с использованием дельта-метода, где SEM = среднее

5 геометрическое $x ((\text{среднеквадратическое отклонение значений } \text{Log}_{10} K_i)/(\text{квадратный корень из } n)) \times \ln 10$

Таблицы 1А, В, С: аффинность связывания подтипов А и В инсулинового рецептора человека (hIR-A и hIR-B) и рецептора инсулиноподобного фактора роста-1 человека (hIGF-1R), значения K_i представляют собой средние геометрические значения, а SEM представляет собой ошибку, рассчитанную с использованием дельта-метода.

Таблица 1А: 0,1% (мас./об.) BSA

	K _i , нМ (SEM, n)		
Исследуемое соединение	hIR-A	hIR-B	hIGF-1R
Пример 1	413 (55, 3)	253 (41, 3)	>19800 (NC, 1/3)
Пример 2	423 (52, 3)	190 (32, 3)	>19900 (NC, 1/3)
Пример 3	404 (60, 3)	303 (16, 3)	>19500 (NC, 1/3)
ВНІ	0,260 (0,038, 6)	0,167 (0,017, 6)	124 (11, 3)
IGF-1	7,73 (0,75, 3)	67,3 (9,9, 3)	0,147 (0,023, 6)

Таблица 1В: 0,001% (мас./об.) NP-40

	K _i , нМ (SEM, n)		
Исследуемое соединение	hIR-A	hIR-B	hIGF-1R
Пример 1	68,2 (20,5, 3)	64,0 (7,9, 3)	>19200 (NC, 1/3)
Пример 2	124 (2, 3)	70,1 (4,9, 3)	>19300 (NC, 1/3)
Пример 3	86 (15,8, 3)	60,2 (10,8, 3)	>18900 (NC, 1/3)
ВНІ	0,304 (0,073, 6)	0,313 (0,038, 6)	108 (38, 3)
IGF-1	10,3 (3,9, 3)	86,1 (12,5, 3)	0,187 (0,015, 6)

Таблица 1С: 0,1% (мас./об.) HSA

	K _i , нМ (SEM, n)		
Исследуемое соединение	hIR-A	hIR-B	hIGF-1R
Пример 1	274 (38, 3)	177 (21, 3)	ND
Пример 2	240 (38, 3)	145 (9, 3)	ND

Пример 3	334 (20, 3)	220 (24, 3)	ND
BHI	0,221 (0,042, 6)	0,149 (0,016, 6)	ND
IGF-1	7,79 (0,12, 3)	54,3 (6,6, 3)	ND

Данные в таблицах 1А, 1В и 1С демонстрируют, что Примеры 1, 2 и 3 связываются с IR-A человека и IR-B человека с очень низким уровнем связывания с hIGF-R при использовании 0,1% BSA, 0,001% NP-40 либо 0,1% HSA в буфере для анализа.

5

Функциональная активация рецептора

Инсулиновый рецептор содержит внутриклеточный тирозинкиназный домен, который при связывании с лигандом аутофосфорилирует собственные тирозиновые остатки, обеспечивая возможность рекрутинга адаптерных белков, которые возбуждают инсулиновые пути передачи сигналов. Функциональную клеточную активность для стимуляции аутофосфорилирования рецептора на остатках тирозина определяли после обработки лигандом клеток HEK293, сверхэкспрессирующих hIR-A, hIR-B или hIGF-1R, каждый из которых имеет С-концевой эпитоп С9 (TETSQVAPA, SEQ ID NO:6).

Клетки HEK293, сверхэкспрессирующие hIR-A или hIR-B-C9, трипсинизировали и центрифугировали при 1000 об/мин. Клетки ресуспендировали в «голодной» среде, содержащей DMEM с высоким содержанием глюкозы без пирувата натрия плюс 0,1% BSA, и высевали в 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином, с плотностью 50-60 тыс. клеток/лунку. Клетки инкубировали в стандартных условиях для тканевых культур в течение ночи. Для оценки эффекта связывания альбумина проводили стимуляцию клеток в среде, содержащей DMEM с высоким содержанием глюкозы без пирувата натрия плюс 0,1% BSA. После стимуляции клеток с hIR-A или hIR-B различными концентрациями лиганда в диапазоне от 10 до 0,0000169 мкМ при 37 °С в течение 60 минут клетки лизировали лизирующим буфером, содержащим 50 мМ трис (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1% NP40 и свежедобавленный полный коктейль ингибиторов протеаз (Pierce A32955) плюс 2 мМ ванадата (Sigma S6508), в день анализа. Уровень аутофосфорилирования тирозина киназным доменом каждого рецептора определяли путем нанесения клеточных лизатов на планшеты для ELISA; при этом активированный рецептор захватывался антителом либо к IR (Ab 83-14) при 3,5 мкг/мл для IR-A, либо к эпитопной метке С9 при 2 мкг/мл для IR-B с последующим определением уровня фосфорилирования тирозина с помощью конъюгата пероксидазы хрена HRP с антителом к фосфотирозину (Millipore 16-105) в соотношении 1:5000.

Для ELISA IR 96-луночные планшеты покрывали либо Ab 83-14 в концентрации 3,5 мкг/мл для IR-A, либо 2 мкг/мл анти-C9 Ab для IR-B. Антитела разводили в 20 мМ карбоната натрия, pH 9,6, и инкубировали в течение ночи при 4 °C. На второй день планшеты 3 раза промывали TBST (1X TBS, содержащим 0,1% Tween 20). Планшеты 5 блокировали 1% BSA в TBST в течение 1 часа. Блокирующий буфер удаляли и наносили клеточный лизат на планшеты. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на шейкере. Планшеты промывали 3 раза 1X TBST. Наносили вторичное антитело (анти-фосфотирозин-HRP (Millipore 16-105) в количестве 2 мкл в 10 мл (1/5000) в TBST, содержащем 1X коктейль ингибиторов протеиназы и фосфатазы). Планшеты 10 дополнительно инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере. Для проявления сигнала pIR планшеты 4 раза промывали TBST. Добавляли в планшеты субстрат TMB (Pierce 34021) в объеме 100 мкл/лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл/лунку 2 н. H₂SO₄ и инкубировали планшет в течение 5 минут. Планшеты считывали при OD 15 (оптическая плотность) 450 нм.

Активация инсулиновых рецепторов, 0,1% казеин (метод без BSA)

Чтобы измерить влияние Примеров на фосфорилирование IRA и IRB в присутствии 0,1% казеина, клетки hIRA-HEK293-zeo или hIRB-C9-HEK293-G418 сначала высевали в 20 количестве 60000 клеток/лунку в 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином (Biocoat 354461), в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы и без пирувата натрия (Gibco 11965-084) с 0,1% BSA. Затем клетки инкубировали в течение ночи при 37 °C в инкубаторе для тканевых культур. 96-луночные планшеты для ELISA также покрывали 3,5 мкг/мл антитела к инсулиновому рецептору 83-14 (для анализа IRA) или 2,0 мкг/мл 25 антитела к C9 (для анализа IRB) в 20 мМ натрий-карбонатном буфере (pH 9,6) и инкубировали в течение ночи при 4 °C.

На следующий день планшеты для ELISA промывали 3 раза 200 мкл промывочного буфера (TBS-T с 0,1% Tween®) и блокировали в течение по меньшей мере часа с помощью 1% BSA в TBS-T. Готовили среду для анализа с 0,1% казеина в DMEM с 30 высоким содержанием глюкозы и без пирувата натрия. Следующие соединения разводили до соответствующей концентрации в среде для анализа: инсулин человека до 200 нМ, Примеры до 60 мкМ, hIGF-1 до 20 мкМ и AspB10 до 200 нМ. Соединения последовательно разводили в разведении 1:3. Планшеты с клетками дважды промывали 50 мкл среды для анализа, а затем 50 мкл среды для анализа и 50 мкл разведенных

соединений переносили в отдельные лунки планшетов с клетками. Переносили 200 нМ ВНИ. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37 °С.

Ингибиторы протеазы (Pierce A32965) и ортованадат натрия (конечная концентрация 2 мМ) добавляли к лизирующему буферу (50 мМ трис, pH 7,4, 150 мМ NaCl и 1% NP40). После инкубации в течение 1 часа планшеты с клетками сначала промывали 100 мкл холодного DPBS и лизировали в 100 мкл лизирующего буфера в течение 15 мин при 4 °С. Планшеты с клеточными лизатами смешивали, и 300 мкл клеточного лизата, обработанного ВНИ, переносили в первую колонку планшета для разведения из планшета с клетками, наполовину обработанного ВНИ. 200 мкл лизирующего буфера добавляли к другим одиннадцати колонкам этого планшета для разведения, и лизат последовательно разводили 1:3 одиннадцать раз путем переноса 100 мкл лизата к 200 мкл лизирующего буфера и повторения одиннадцать раз. 10 мкл лизата переносили из планшета, обработанного соединениями, в планшет для разведения и добавляли в каждую лунку по 190 мкл лизата. Планшеты для ELISA промывали, как описано выше, а затем 100 мкл разбавленного лизата переносили в соответствующие планшеты для ELISA. Планшеты инкубировали при комнатной температуре на шейкере в течение одного часа.

Планшеты промывали, как описано выше, и в каждый планшет добавляли 100 мкл вторичного антитела, разведенного 1:5000 в TBST (с ингибиторами протеаз и 40 мкМ ортованадата натрия). Планшеты инкубировали при комнатной температуре на шейкере в течение одного часа. Планшеты промывали, как описано выше, и в планшет добавляли 50 мкл ТМВ для проявления примерно на 2 минуты. Реакцию ТМВ останавливали с помощью 50 мкл 2 н. серной кислоты и считывали планшеты при 450 нм.

Функциональную эффективность приводили в виде концентрации, вызывающей половину от максимального эффекта (EC_{50}) относительно максимально эффективной концентрации (100 нМ) положительного контроля, инсулина человека (анализ фосфорилирования hIR-A и hIR-B), или 10 нМ положительного контроля hIGF-1 (анализ фосфорилирования hIGF-1R). Значения EC_{50} определяли с помощью 4-параметрического логистического нелинейного регрессионного анализа (NGR Screener 13). При необходимости параметры верха или низа кривой устанавливали на 100 или 0, соответственно.

Полученные значения EC_{50} представлены в виде геометрического среднего, а стандартная ошибка среднего (SEM) рассчитана с использованием дельта-метода с количеством независимых измерений, обозначенным как «n» (таблица 2).

Таблица 2: инсулиновые рецепторы человека подтипов А и В (hIR-A и hIR-B) Среднее геометрическое значение активации, (SEM, n)

Тестируемое соединение	0,1% BSA EC50, нМ (SEM, n)		0,1% казеин EC50, нМ (SEM, n)	
	hIR-A	hIR-B	hIR-A	hIR-B
Пример 1	2550 (147, 3)	1560 (156, 3)	588 (42,9, 3)	145 (10,8, 3)
Пример 2	3035 (229, 3)	1791 (85, 3)	478 (72,1, 3)	124 (14,7, 3)
Пример 3	3182 (240, 3)	1219 (68, 3)	627 (40,4, 3)	183 (12,7, 3)
ВНІ	3,36 (0,176, 3)	2,37 (0,231, 3)	5,19 (0,702, 3)	1,89 (0,319, 3)
IGF-1	240 (25,4, 3)	771 (14,7, 3)	156 (10,2, 3)	577 (60,1, 3)

Данные в таблице 2 демонстрируют, что Примеры 1, 2 и 3 связывают и стимулируют инсулиновые рецепторы человека А и В.

Оценка эффективности *in vivo* на крысиной модели диабета 1 типа

Снижение уровня глюкозы и фармакокинетику Примеров 1, 2 и 3 исследовали на модели диабета у крыс, получавших стрептозотоцин (STZ). Самцов крыс Спрег-Доули с массой тела 400-425 г приобретали у компании Envigo, Индианаполис, штат Индиана. После акклиматизации в течение примерно одной недели крыс анестезировали изофлураном и осуществляли однократную инъекцию Zanosar (89256, Teva Parenteral Medicines, 40 мг/кг, в/в). Крыс использовали в исследованиях через 3 дня после инъекции Zanosar; в этих исследованиях использовали только тех животных, у которых уровень сахара в крови после приема пищи составлял 400-550 мг/дл.

Крыс разделяли на группы для получения сопоставимой вариативности по уровню глюкозы в крови и массе тела; крыс разделяли случайным образом. Глюкозу в крови измеряли глюкометром Accu-Chek Aviva (Roche).

Исследуемые образцы (растворы пептидов; 1 мл/кг; подкожно; разовая доза в 1-й день фазы дозирования) или носитель (10 мМ трис, 19 мг/мл глицерина, 3,15 мг/мл м-крезола, pH 7,6; 1 мл/кг; подкожно; разовая доза в 1-й день фазы дозирования) дозировали, исходя из массы тела животного в 08:00 в 1-й день дозирования. Образцы крови для измерения глюкозы брали посредством надреза хвоста. Во время эксперимента

животные имели свободный доступ к пище и воде. Образцы плазмы из указанных исследований направляли на анализ содержания соединений.

Через 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 и 120 часов после введения дозы брали цельную кровь для определения уровня глюкозы в цельной крови с помощью глюкометра. Значения регистрировали дважды, если значения не отличались более чем на 30 мг/дл. В противном случае значение регистрировали трижды. Если уровень глюкозы у крысы падал ниже 35 мг/дл, всей группе перорально вводили 2 мл 50% декстрозы, за исключением крыс с >100 мг/дл в той же группе. За крысами, которым была оказана экстренная помощь, наблюдали и измеряли уровень глюкозы в крови каждые 2-4 часа после нагрузки декстрозой. В течение периода наблюдения, если уровень глюкозы у крысы падал ниже 35 мг/дл, всей группе перорально вводили 2 мл 50% декстрозы, за исключением крыс с >100 мг/дл в той же группе. Наблюдение продолжали с измерением уровня глюкозы в крови каждые 2-4 часа после нагрузки декстрозой. Если крысе перорально вводили 2 мл 50% декстрозы, все последующие зарегистрированные значения уровня глюкозы исключали из расчетов исследования. Даже если животным оказывали экстренную помощь, они продолжали участвовать в исследовании для сбора временных точек ФК (фармакокинетики), поскольку болюс декстрозы не влияет на ФК.

Анализ крысиной плазмы методом иммуноаффинной хроматографии и ЖХ/МС: для характеристики ФК Примеров образцы плазмы (аликвоты по 10 мкл) анализировали для определения концентрации интактного инсулина с помощью иммунопреципитации с последующим анализом методом ЖХ/МС. Стандарты и холостые образцы готовили из 100% контрольной крысиной плазмы с использованием Примера, и ко всем стандартам и образцам в качестве внутреннего стандарта добавляли антитело, меченое стабильным изотопом (не относящееся к Примеру). Для иммунопреципитации в качестве реагента для захвата использовали меченое биотином мышинное античеловеческое антитело (Fitzgerald, 10R-I134E), которое затем связывалось магнитными гранулами Dynal M-280, покрытыми стрептавидином (Invitrogen 60210). Образцы, иммобилизованные на магнитных гранулах, промывали 0,1% CHAPS, а затем PBS, и элюировали Пример раствором, содержащим 20% ACN, 2% водного раствора муравьиной кислоты и 20% Invitrosol (Invitrogen, 46-5553). Образцы плазмы количественно определяли с использованием масс-спектрометра Thermo Q/Exactive Plus в диапазоне от 0,01 до 5,3 мкг/мл (от 1,6 до 802 нМ).

Некомпарментный фармакокинетический анализ проводили с помощью Phoenix WinNonLin v8.1. Для анализа ФК у крыс концентрации, использованные для оценки периодов полувыведения, в среднем составляли от 44 до 120 часов после введения дозы для группы с дозой 50 нмоль/кг, от 32 до 120 часов после введения дозы для группы с дозой 100 нмоль/кг, от 18 до 120 часов после введения дозы для группы с дозой 200 нмоль/кг и от 18 до 120 часов после введения дозы для группы с дозой 400 нмоль/кг.

Таблицы 3А, 3В: эффекты снижения уровня глюкозы (3А) и фармакокинетические эффекты (3В) Примера 1 на модели диабета у крыс, получавших стрептозотоцин (STZ).

10 **Таблица 3А:** снижение уровня глюкозы Примером 1 у самцов крыс Спрег-Дули, получавших STZ, после однократного подкожного введения 50, 100, 200 или 400 нмоль/кг Примера 1.

Время (часы)	Средний уровень глюкозы, мг/дл (SEM) n = 5				
	Носитель	Пример 1 (50 нмоль/кг)	Пример 1 (100 нмоль/кг)	Пример 1 (200 нмоль/кг)	Пример 1 (400 нмоль/кг)
0	559 (15,3)	509 (9,08)	535 (17,3)	524 (10,4)	496 (13,4)
1	510 (21,7)	454 (18,8)	492 (13,8)	364 (64,4)	196 (35,6)
2	504 (14,3)	327 (43,0)	358 (22,8)	146 (16,9)	89,3 (8,6)
4	434 (20,2)	212 (42,1)	200 (38,8)	93,6 (13,8)	54,6 (2,84)
6	432 (13,0)	207 (80,6)	136 (58,2)	112 (15,1)	55,7 (5,23)
8	441 (37,3)	189 (57,4)	174 (49,2)	113 (11,0)	82,5 (12,3)
10	519 (45,1)	334 (57,0)	219 (77,1)	205 (48,1)	61,9 (5,79)
12	578 (14,6)	515 (37,0)	322 (80,7)	245 (56,7)	78,4 (8,52)
18	544 (21,5)	365 (49,6)	237 (75,7)	247 (80,6)	65,0 (4,5)
24	480 (16,4)	237 (44,3)	127 (34,3)	116 (27,5)	70,3 (8,49)
36	593 (8,1)	468 (80,6)	367 (86,8)	272 (70,6)	104 (10,9)
48	507 (19,7)	332 (62,0)	231 (61,6)	131 (25,1)	69,9 (10,1)
60	601 (0)	485 (78,9)	407 (99,5)	331 (49,4)	122 (16,2)
72	561 (8,02)	365 (78,2)	313 (72,8)	188 (16,7)	94,8 (5,96)
84	598 (3)	522 (67,3)	466 (103,0)	443 (39,9)	190 (16,0)
96	556 (13,3)	435 (62,7)	344 (77,6)	306 (46,8)	180 (28,7)
108	600 (1,30)	529 (68,7)	598 (2,5)	525 (45,7)	349 (27,2)
120	567 (19,9)	497 (38,5)	504 (13,5)	408 (57,8)	267 (30,8)
AUC за 120 часов	66682 (717)	50061 (6354)	42360 (6855)	34185 (3632)	17350 (767)

*значения выше 601 не измеряли, поскольку это максимальное показание глюкометра

Таблица 3В: средние фармакокинетические параметры Примера 1 у самцов крыс Спрег-Доули, получавших STZ, после однократного подкожного введения 50, 100, 200 или 400 нмоль/кг Примера 1.

	50 нмоль/кг Примера 1 Среднее ± СКО	100 нмоль/кг Примера 1 Среднее ± СКО	200 нмоль/кг Примера 1 Среднее ± СКО	400 нмоль/кг Примера 1 Среднее ± СКО
$T_{1/2}$ (ч)	21 ± 1	21 ± 2	24 ± 1	20 ± 3
T_{max} (ч)	16,8 ± 5,0	14,4 ± 5,4	10,8 ± 2,7	7,2 ± 2,7
C_{max}/D (кг*нМ/нмоль)	6,77 ± 0,69	8,18 ± 1,13	8,35 ± 1,84	9,89 ± 1,91
AUC_{0-inf} (ч*мкМ)	15,6 ± 1,03	38,0 ± 3,68	74,7 ± 9,57	185 ± 20,4
CL/F (мл/ч/кг)	3,29 ± 0,206	2,73 ± 0,282	2,80 ± 0,359	2,25 ± 0,285

5 **Таблица 4А:** снижение уровня глюкозы Примером 2 у самцов крыс Спрег-Доули, получавших STZ, после однократного подкожного введения 50, 100, 200 или 400 нмоль/кг Примера 2.

Время (часы)	Средний уровень глюкозы, мг/дл (SEM) n = 5				
	Носитель	Пример 2 (50 нмоль/кг)	Пример 2 (100 нмоль/кг)	Пример 2 (200 нмоль/кг)	Пример 2 (400 нмоль/кг)
0	514 (24,9)	506 (25,2)	511 (25,0)	554 (21)	514 (27,8)
1	522 (15,6)	362 (38,4)	377 (69,5)	330 (46)	225 (8,16)
2	501 (9,42)	186 (46,8)	163 (36,7)	140 (6)	105 (24,2)
4	431 (10,5)	138 (13,7)	142 (37,1)	71 (10)	88 (15,2)
6	432 (20,5)	139 (25,0)	125 (30,8)	191 (45)	125 (22,4)
8	488 (41,3)	259 (73,9)	185 (34,5)	184 (69)	121 (19,8)
10	541 (28,3)	380 (69,4)	332 (55,2)	280 (70)	129 (7,58)
12	601 (0,00)	548 (24,7)	493 (45,0)	322 (78)	175 (19,2)
18	592 (7,74)	513 (32,3)	383 (52,1)	173 (15)	121 (8,99)
24	499 (17,5)	391 (51,7)	285 (69,2)	114 (18)	103 (16,4)
36	601 (0,40)	572 (12,6)	464 (56,9)	187 (18)	128 (20,0)
48	552 (8,53)	459 (31,6)	333 (59,1)	91 (10)	82 (4,6)
60	601 (0,00)	584 (7,42)	520 (43,7)	249 (32)	108 (12,4)
72	527 (14,5)	490 (11,3)	376 (58,4)	151 (30)	60 (5,31)
84	601 (0,00)	601 (0)	542 (39,7)	433 (41)	167 (20,2)
96	531 (23,9)	499 (15,3)	402 (40,2)	298 (69)	86 (11,5)
108	601 (0,00)	600 (1,2)	568 (22,4)	516 (27)	352 (31,2)
120	552 (22,1)	534 (27,6)	487 (39,5)	390 (42)	197 (27,7)

AUC за 120 часов	67232 (536)	60367 (1720)	50661 (5087)	31052 (2387)	16886 (631)
------------------	-------------	--------------	--------------	--------------	-------------

*значения выше 601 не измеряли, поскольку это максимальное показание глюкометра

Таблица 4В: средние фармакокинетические параметры Примера 2 у самцов крыс Спрег-Доули, получавших STZ, после однократного подкожного введения 50, 100, 200 или 400 нмоль/кг Примера 2.

	50 нмоль/кг Примера 2 Среднее ± СКО	100 нмоль/кг Примера 2 Среднее ± СКО	200 нмоль/кг Примера 2 Среднее ± СКО	400 нмоль/кг Примера 2 Среднее ± СКО
T _{1/2} (ч)	16,1 ± 1,39	18,1 ± 2,17	21,3 ± 1,04	21,9 ± 3,62
T _{max} (ч)	24,0 ± 7,3	19,2 ± 5,0	18,0 ± 4,2	14,4 ± 5,4
C _{max} /D (кг*нМ/нмоль)	3,06 ± 0,56	4,69 ± 0,54	5,99 ± 0,77	6,2 ± 0,52
AUC _{0-inf} (ч*мкМ)	7,71 ± 1,1	23,8 ± 16,5	54,3 ± 3,91	119 ± 7,23
CL/F (мл/ч/кг)	6,69 ± 1,12	4,3 ± 0,33	3,82 ± 0,28	3,49 ± 0,24

5

Таблица 5А: снижение уровня глюкозы Примером 3 у самцов крыс Спрег-Доули, получавших STZ, после однократного подкожного введения 50, 100, 200 или 400 нмоль/кг Примера 3.

	Средний уровень глюкозы, мг/дл (SEM) n = 5				
Время (часы)	Носитель	Пример 3 (50 нмоль/кг)	Пример 3 (100 нмоль/кг)	Пример 3 (200 нмоль/кг)	Пример 3 (400 нмоль/кг)
0	475 (19,8)	486 (13,6)	505 (23,3)	534 (18,5)	519 (32,3)
1	475 (18,2)	313 (17,7)	413 (34,4)	278 (21,3)	301 (28,4)
2	465 (22,4)	122 (28,0)	195 (56,0)	116 (19,0)	90 (9,52)
4	444 (17,3)	217 (60,5)	162 (39,9)	104 (20,9)	98 (19,9)
6	430 (18,0)	179 (45,3)	134 (26,3)	175 (15,4)	106 (22,0)
8	452 (29,2)	259 (71,2)	247 (92,0)	166 (37,6)	99 (14,8)
10	459 (44,0)	394 (78,8)	327 (100)	172 (29,0)	112 (19,3)
12	569 (17,9)	573 (11,4)	494 (38,1)	258 (55,6)	153 (23,5)
18	552 (16)	469 (16,2)	443 (39,6)	166 (56,0)	90 (7,40)
24	467 (23,6)	311 (68,3)	188 (58,4)	72 (6,17)	71 (4,98)
36	593 (3,70)	528 (28,8)	489 (29,8)	154 (27,0)	94 (13,0)
48	507 (9,03)	444 (19,6)	257 (53,9)	75 (9,77)	47 (5,03)
72	531 (19,6)	475 (21,3)	437 (15,4)	114 (22,2)	48 (2,42)
84	579 (21,9)	588 (7,61)	560 (26,3)	396 (22,8)	112 (29,0)

96	494 (7,31)	472 (19,3)	469 (23,0)	288 (31,1)	82 (12,6)
108	578 (12,6)	580 (10,3)	584 (10,9)	492 (16,5)	405 (22,5)
120	504 (5,09)	486 (17,6)	481 (18,5)	369 (40,0)	234 (26,6)
AUC за 120 часов	63389 (382)	56237 (1523)	49612 (2958)	26200 (1092)	14756 (404)

*значения выше 601 не измеряли, поскольку это максимальное показание глюкометра

Таблица 5В: средние фармакокинетические параметры Примера 3 у самцов крыс Спрег-Доули, получавших STZ, после однократного подкожного введения 50, 100, 200 или 400 нмоль/кг Примера 3.

	50 нмоль/кг Примера 3 Среднее ± СКО	100 нмоль/кг Примера 3 Среднее ± СКО	200 нмоль/кг Примера 3 Среднее ± СКО	400 нмоль/кг Примера 3 Среднее ± СКО
T _{1/2} (ч)	20 ± 2	19 ± 3	19 ± 3	20 ± 1
T _{max} (ч)	25 ± 11	26 ± 5	24 ± 0	20 ± 3
C _{max} /D (кг*нМ/нмоль)	4,89 ± 1,22	6,46 ± 1,32	6,17 ± 0,90	6,43 ± 0,41
AUC _{0-inf} (ч*мкМ)	11,7 ± 2,8	33,9 ± 6,1	65,3 ± 6,3	143,0 ± 14,8
CL/F (мл/ч/кг)	4,50 ± 1,13	3,03 ± 0,56	3,09 ± 0,30	2,81 ± 0,28

5

Сокращения в таблицах 3В, 4В, 5В: AUC_{0-inf} = площадь под кривой от 0 до бесконечности, CL/F = клиренс/биодоступность, T_{max} = время достижения максимальной концентрации, C_{max}/D = максимальная концентрация в плазме на дозу, T_{1/2} = период полувыведения. [Данные представляют собой среднее значение +/- СКО (N=5)]

10 Данные в таблицах 3А, 4А и 5А демонстрируют устойчивый дозозависимый эффект снижения уровня глюкозы *in vivo* для всех трех примеров. Данные в таблицах 3В, 4В и 5В демонстрируют устойчивую продолжительность действия *in vivo* для всех трех примеров.

15 **Оценка выведения лекарственного средства на модели диабета 1 типа у свиней**

Цель этого исследования состояла в том, чтобы исследовать снижение уровня глюкозы и фармакокинетику Примеров у юкатанских карликовых свиней с диабетом после однократного подкожного введения дозы 3,6 нмоль/кг. Образцы крови брали в течение 168 часов после введения дозы.

20 Кастрированные самцы юкатанских карликовых свиней (средний возраст 23 месяца, средняя масса тела 44 кг) с диабетом (индуцированным аллоксаном) содержались

индивидуально с неограниченным доступом к питьевой воде в любое время и получали два приема пищи в день корма собственного производства. Животные получали соответствующий поддерживающий базальный и прандиальный инсулин два раза в сутки для контроля их диабетического состояния, когда они не участвовали в исследовании.

- 5 Животных случайным образом разделяли на экспериментальные группы и возвращали в их загон. Готовили препараты Примеров концентрацией 400 ЕД/мл в виде препаратов гексамеров (19 мг/мл глицерина, 4 Zn/гексамер, 3,15 мг/мл м-крезола, 10 mM трис, pH 7,6).

За день до начала исследования свиньям давали половину их суточного рациона и вводили 0,2 ЕД/кг Humalog Mix 75/25 в качестве утренней поддерживающей дозы.

- 10 Примерно за 12 часов до запланированного введения исследуемой дозы свиньям давали половину их суточного рациона и только 0,2 ЕД/кг Humalog. Все животные не получали пищи до тех пор, пока не был взят образец через 24 часа.

Утром в день проведения исследования всех животных помещали в стропы для ограничения подвижности и открывали доступ к портам сосудистого доступа

- 15 (подготовленным для отбора образцов крови) и проверяли их на проходимость. Животных случайным образом помещали в экспериментальную группу (n=6) и возвращали в их индивидуальные загон. Брали первые два образца перед введением дозы, животным вводили исследуемый образец 0,6 ЕД/кг/3,6 нмоль/кг (исходя из концентрации инсулина 400 ЕД/мл, средний объем 7 ЕД/свинью) подкожно в бок (0 мин) инсулиновым шприцем U100. Все подопытные животные имели свободный доступ к чистой питьевой воде в течение всего оставшегося периода взятия крови.

- 25 Образцы крови (по 4,0 мл каждый) последовательно брали у каждого животного и помещали в пробирки, содержащие антикоагулянт К₃-ЭДТА, в следующих временных точках: -0,5, 0, 1,5, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 42, 48, 54, 60, 72, 96, 120, 144 и 168 часов после подкожного (п/к) введения.

Животным давали 300 граммов корма S-9 и вводили 0,2 ЕД/кг Humalog п/к после взятия образцов через 24 и 60 часов. После взятия образцов через 72 часа животных возвращали к обычному режиму введения поддерживающего инсулина и кормления. Все образцы брали перед утренним приемом пищи и введением поддерживающего инсулина.

- 30 Образцы цельной крови хранили на влажном льду сразу после взятия. Затем плазму отделяли центрифугированием (~3000 об/мин, по меньшей мере 15 мин при ~4 °C), делили на две аликвоты и хранили в замороженном виде при примерно -20 °C для анализа уровня глюкозы или -70 °C для ФК анализа.

Концентрации глюкозы в плазме определяли с помощью автоматического биохимического анализатора Beckman AU480 (Beckman Coulter, Брея, штат Калифорния) и наносили на график с помощью Graphpad Prism 8.

Анализ свиной плазмы методом иммуноаффинной хроматографии и ЖХ/МС:

5 для характеристики ФК исследуемого Примера образцы плазмы (аликвоты по 100 мкл) анализировали для определения концентраций интактного Примера с помощью иммунопреципитации с последующим анализом методом ЖХ/МС. Стандарты и холостые образцы готовили из 100% контрольной свиной плазмы с использованием исследуемого

10 Примера, и ко всем стандартам и образцам в качестве внутреннего стандарта добавляли антитело, меченое стабильным изотопом (не относящееся к Примеру). Для иммунопреципитации в качестве реагента для захвата использовали меченое биотином

15 мышинное античеловеческое антитело (Fitzgerald, кат. № 10R-I134E), которое затем связывалось магнитными гранулами Dynal M-280, покрытыми стрептавидином (Invitrogen 60210). Образцы, иммобилизованные на магнитных гранулах, промывали 0,1% CHAPS, а

20 затем PBS, и элюировали исследуемый Пример и его внутренний стандарт раствором, содержащим 20% ACN, 2% водного раствора муравьиной кислоты и 20% Invitrosol (Invitrogen, 46-5553). Образцы плазмы количественно определяли с использованием масс-спектрометра Thermo Q/Exactive Plus в диапазоне от 0,1 до 52,3 нг/мл (от 0,016 до 8,0 нМ).

Фармакокинетический анализ: некомпартментный фармакокинетический анализ

20 проводили с помощью Phoenix WinNonLin v8.1. Для ФК анализа концентрации, использованные для оценки периода полувыведения, в среднем составляли от 50 до 160 часов после введения дозы (соответствует 3,6 нмоль/кг п/к).

Таблица 6А: данные по снижению уровня глюкозы

Время (часы)	Пример 1 Средний уровень глюкозы, мг/дл (SEM) n=6	Пример 2 Средний уровень глюкозы, мг/дл (SEM) n=5	Пример 3 Средний уровень глюкозы, мг/дл (SEM) n=7
-0,5	443 (34)	417 (35)	373 (27)
0	439 (36)	410 (31)	374 (27)
1,5	436 (38)	409 (33)	361 (21)
3	398 (27)	364 (31)	341 (23)
6	311 (18)	269 (46)	250 (18)
12	173 (25)	176 (42)	86 (15)

18	124 (14)	132 (30)	69 (9)
24	104 (13)	110 (30)	50 (4)
36	146 (24)	208 (22)	128 (28)
42	246 (33)	268 (5)	185 (40)
48	206 (32)	236 (25)	126 (29)
54	136 (38)	159 (33)	72 (9)
60	127 (36)	148 (30)	77 (9)
72	194 (45)	205 (39)	110 (27)
96	296 (36)	293 (36)	247 (22)
120	311 (30)	319 (16)	226 (51)
144	264 (20)	276 (23)	194 (26)
168	143 (45)	233 (41)	196 (46)

Таблица 6В: средние ФК параметры Примеров 1, 2, 3 у самцов юкатанских свиней с индуцированным диабетом после введения однократных подкожных доз.

	3,6 нмоль/кг Примера 1 Среднее ± СКО	3,6 нмоль/кг Примера 2 Среднее ± СКО	3,6 нмоль/кг Примера 3 Среднее ± СКО
T _{1/2} (ч)	45 ± 11	39 ± 5	39 ± 10
T _{max} (ч)	15 ± 7	13 ± 7	15 ± 5
C _{max} (пмоль/л)	25,8 ± 2,20	19,5 ± 4,68	21,1 ± 2,99
AUC _{0-inf} (ч* нмоль/л)	2,11 ± 0,300	1,26 ± 0,156	1,46 ± 0,193
CL/F (мл/ч/кг)	1,74 ± 0,23	2,88 ± 0,34	2,50 ± 0,33

Сокращения: T_{1/2} = период полувыведения, T_{max} = время достижения максимальной концентрации, C_{max} = максимальная концентрация в плазме, AUC_{0-inf} = площадь под кривой от 0 до бесконечности, CL/F = клиренс/биодоступность (N=6 для исследуемого Примера)

Данные в таблицах 6А и 6В демонстрируют устойчивый и продолжительный эффект снижения уровня глюкозы *in vivo* для всех трех примеров на модели диабета 1 типа у свиней.

Последовательности

SEQ ID NO:1 модифицированная цепь А инсулина (A14E); цепь А формулы I

GIVEQCCTSICSLEQLNYCN

5 **SEQ ID NO:2 модифицированная цепь В инсулина (B16H, B25H, desB30); цепь В формулы I**

FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPK

где Lys в положении 29 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\text{X}-$, где X

10 представляет собой -Lys-Gly-, -Lys-(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]уксусную кислоту)- или -εLys-Gly-.

SEQ ID NO:3 цепь В примера 1

FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPK

15 где Lys в положении 29 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\text{Lys-Gly}-$.

SEQ ID NO:4 цепь В примера 2

FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPK

20 где Lys в положении 29 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\text{Lys-(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]уксусной кислотой)}-$.

SEQ ID NO:5 цепь В примера 3

25 FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPK

где Lys в положении 29 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\epsilon\text{Lys-Gly}-$.

SEQ ID NO:6 C-концевой эпитоп C9

30 TETSQVAPA

SEQ ID NO:7 одноцепочечный инсулин

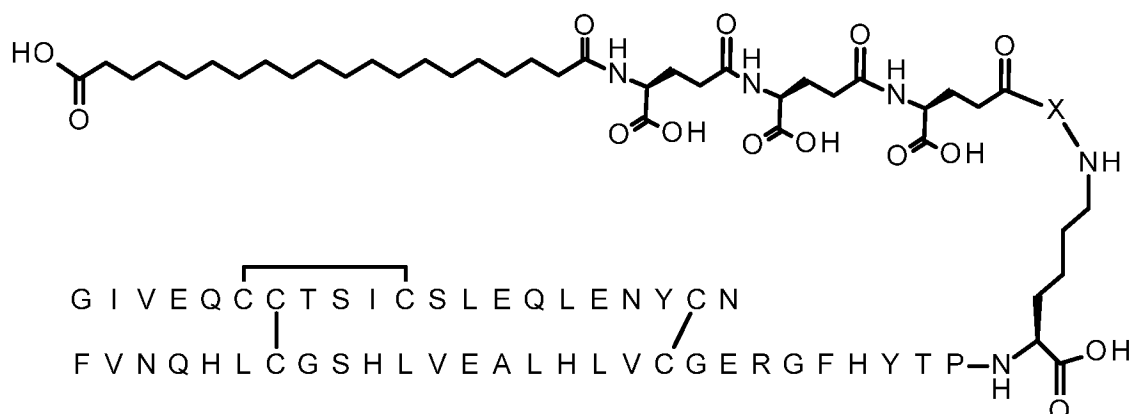
MHHHHHHQAI FVLQGSLDQDPEFENLYFQIEGGRFVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGF
HYTPKRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQRGIVEQCCTSICSLQLENYC
N

5 **SEQ ID NO:8** модифицированная цепь В инсулина (B16H, B25H, desB30)

FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы I:



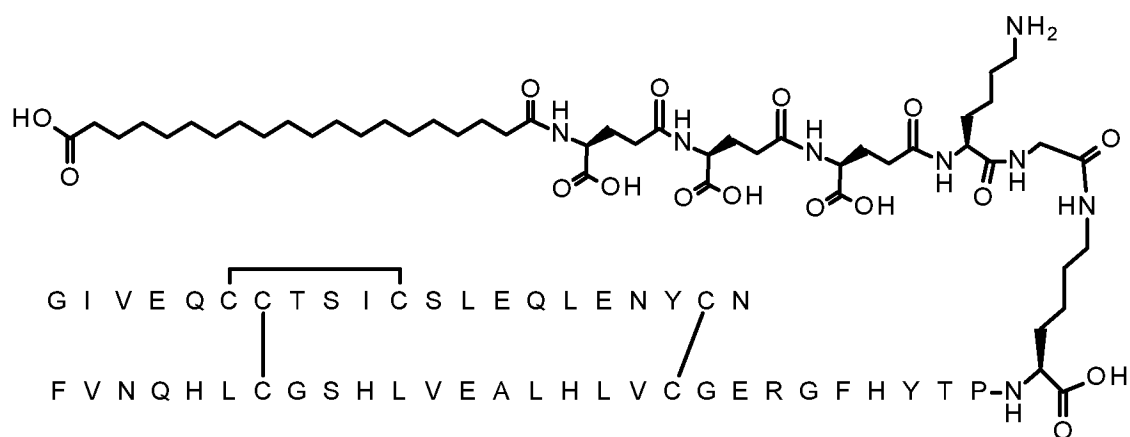
5 где X выбран из группы, состоящей из -Lys-Gly-, -Lys-(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]уксусной кислоты)- и -εLys-Gly-; или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п. 1, где X представляет собой -Lys-Gly-, или его фармацевтически приемлемая соль.

10 3. Соединение по п. 1, где X представляет собой -Lys-(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]уксусную кислоту)-, или его фармацевтически приемлемая соль.

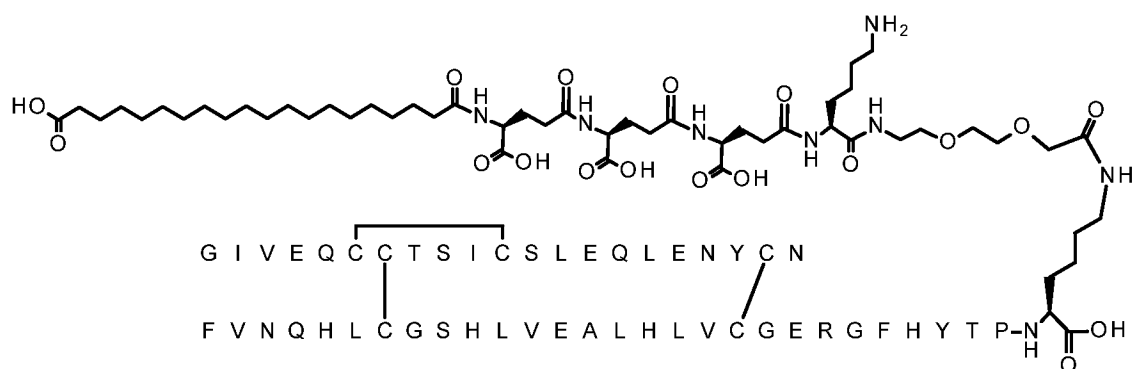
4. Соединение по п. 1, где X представляет собой -εLys-Gly-, или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Соединение по п. 1, представляющее собой



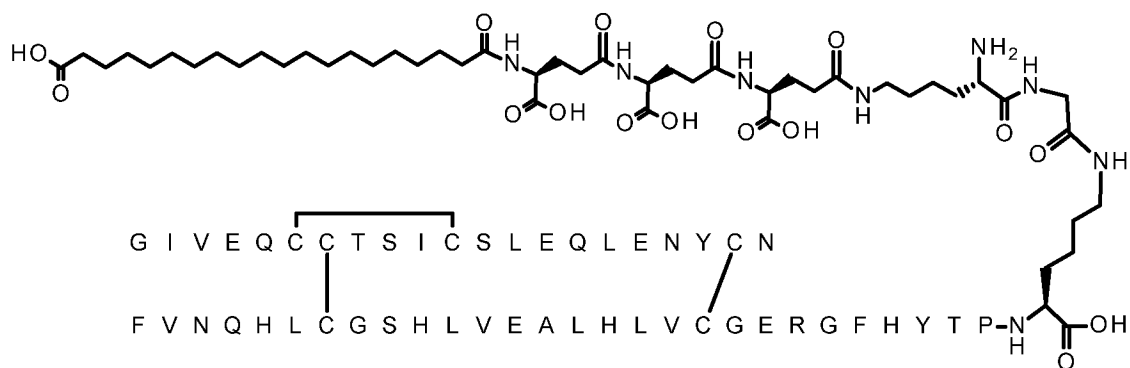
15 или его фармацевтически приемлемая соль.

6. Соединение по п. 1, представляющее собой



или его фармацевтически приемлемая соль.

7. Соединение по п. 1, представляющее собой



5 или его фармацевтически приемлемая соль.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-7 или его фармацевтически приемлемую соль и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

9. Способ лечения диабета I типа и/или II типа у пациента, включающий введение
10 нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества соединения по любому из пп. 1-7 или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 8.

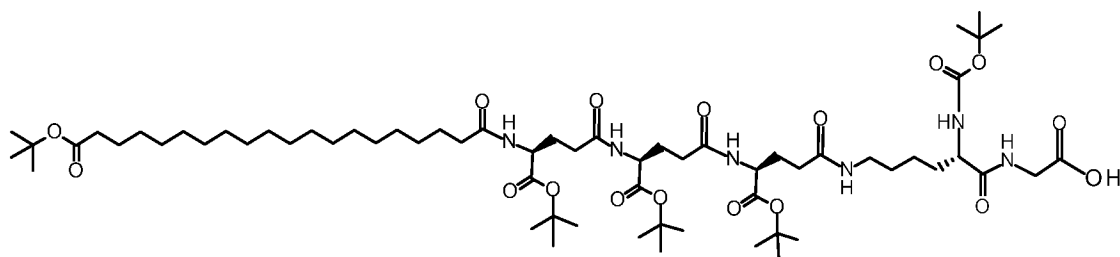
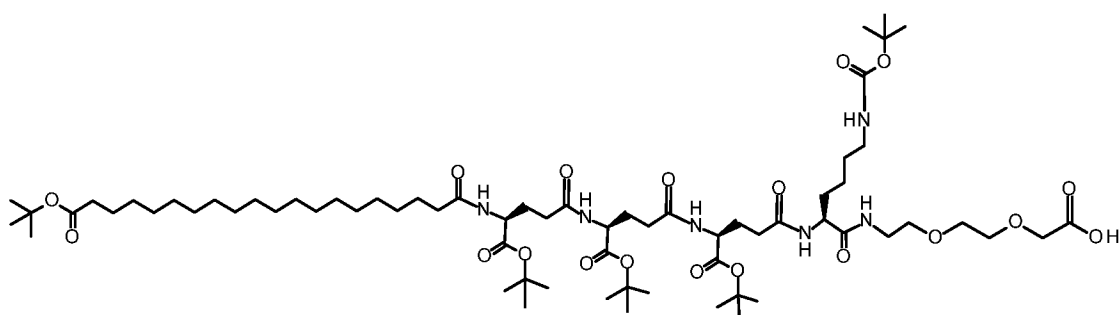
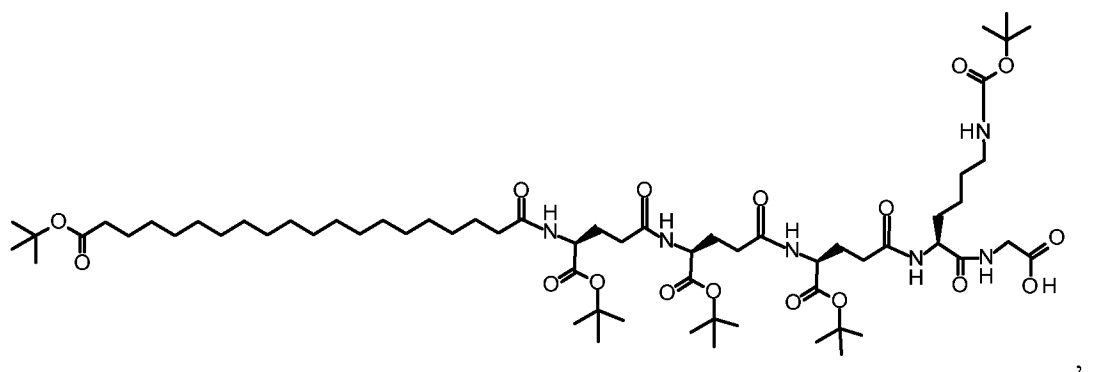
10. Способ лечения гипергликемии у пациента, включающий введение
нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества соединения по любому из пп. 1-7 или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 8.
15

11. Соединение по любому из пп. 1-7 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

12. Соединение по любому из пп. 1-7 или его фармацевтически приемлемая соль
20 для применения для лечения диабета I типа и/или II типа.

13. Соединение по любому из пп. 1-7 или его фармацевтически приемлемая соль для применения для лечения гипергликемии.

14. Соединение, выбранное из группы, состоящей из:



или его фармацевтически приемлемая соль.

15. Способ получения соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли с применением соединения, выбранного из группы согласно п. 14.

16. Применение соединения по любому из пп. 1-7 или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения диабета.

17. Применение соединения по любому из пп. 1-7 или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения гипергликемии.