



(51) МПК
C07K 14/62 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2007105824/04, 19.07.2005**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.07.2005

(30) Конвенционный приоритет:
19.07.2004 US 60/589,058
15.10.2004 US 60/619,153
02.12.2004 US 60/632,578
24.02.2005 US 60/655,803
24.02.2005 US 60/655,838

(43) Дата публикации заявки: **27.08.2008**

(45) Опубликовано: **27.06.2010** Бюл. № 18

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: **RU 2156257 C2, 20.09.2000. WO 02/098232**
A1, 12.12.2002. US 2003087808 A1, 08.05.2003.
US 2003118510B A1, 26.06.2003. US 2003083232
A1, 01.05.2003.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
 фазу: **19.02.2007**

(86) Заявка РСТ:
US 2005/025644 (19.07.2005)

(87) Публикация РСТ:
WO 2006/014673 (09.02.2006)

Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24,
"НЕВИНПАТ", пат.пов. А.В.Поликарпову

(72) Автор(ы):

РАДХАКРИШНАН Баласингам (US),
АГГАРВАЛ Дити (US),
ФЕРРО Мишель (US),
ДЖЕЙМС Кеннет Д. (US),
МАЛКАР Навдип Б. (US),
МИЛЛЕР Марк А. (US),
ПАВЛИВ Лео (US),
ПОЛОВИ Карен (US),
ПУСКАС Карен (US),
ЭКВУРИБЕ Нночири Н. (US)

(73) Патентообладатель(и):

Биокон Лимитед (IN)

(54) ИНСУЛИН-ОЛИГОМЕРНЫЕ КОНЬЮГАТЫ, ИХ ПРЕПАРАТЫ И ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к комплексу, включающему конъюгат инсулина, содержащий нативный инсулин или его полипептидный аналог, конъюгированные с модифицирующей группировкой, где полипептидный аналог проявляет сходную активность относительно нативного инсулина, и где модифицирующая группировка содержит полиалкиленгликолевый (PAG) компонент и

алкильный компонент, и катион, где конъюгат инсулина образует комплекс с двухвалентным катионом металла группы II или переходного металла. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие комплексы, их способам получения. Изобретение также относится к композициям жирных кислот для введения комплексов конъюгатов соединений инсулинов по изобретению. 6 н. и 54 з.п. ф-лы, 42 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

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

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2007105824/04, 19.07.2005**

(24) Effective date for property rights:
19.07.2005

(30) Priority:
19.07.2004 US 60/589,058
15.10.2004 US 60/619,153
02.12.2004 US 60/632,578
24.02.2005 US 60/655,803
24.02.2005 US 60/655,838

(43) Application published: **27.08.2008**

(45) Date of publication: **27.06.2010 Bull. 18**

(85) Commencement of national phase: **19.02.2007**

(86) PCT application:
US 2005/025644 (19.07.2005)

(87) PCT publication:
WO 2006/014673 (09.02.2006)

Mail address:
**191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT",
pat.pov. A.V.Polikarpovu**

(72) Inventor(s):

**RADKhAKRISHNAN Balasingam (US),
AGGARVAL Diti (US),
FERRO Mishel' (US),
DZhEJMS Kennet D. (US),
MALKAR Navdip B. (US),
MILLER Mark A. (US),
PAVLIV Leo (US),
POLOVI Karen (US),
PUSKAS Karen (US),
EhKVURIBE Nnochiri N. (US)**

(73) Proprietor(s):

Biokon Limited (IN)

(54) **INSULIN-OLIGOMER CONJUGATES, PREPARATIONS AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a complex containing an insulin conjugate which contains native insulin or its polypeptide analogue conjugated with a modifying group, where the polypeptide analogue exhibits similar activity relative native insulin and where the modifying group contains a polyalkylene glycol component (PAG) and an alkyl component and a cation, where the insulin conjugate forms a complex with a divalent cation of a group II metal or

transition metal. The invention also relates to pharmaceutical compositions containing such complexes and their preparation methods. The invention also relates to fatty acid compositions for administration of complexes of conjugates of disclosed insulin compounds.

EFFECT: design of an efficient method of preparing pharmaceutical compositions containing an insulin conjugate.

60 cl, 42 dwg, 100 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

1. РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 Данная заявка основана на заявках на патент США № 60/589058,
поданной 19 июля 2004 г., № 60/619153, поданной 15 октября 2004 г., №
10 60/632578, поданной 2 декабря 2004 г., и № 60/655838, поданной 24 февраля
2005 г., и № 60/655803, поданной 24 февраля 2005 г., и включает полные
описания данных изобретений посредством ссылки. Эта заявка также включает
15 посредством ссылки следующие заявки, поданные 19 июля 2005 г.
Radhakrishnan с соавт.: заявку на патент США № 11/184668 под названием
"Cation complexes of insulin compound conjugates, formulations and uses thereof";
20 заявку на патент США № 11/184594 под названием "Insulin-oligomer compound
conjugates, formulations and uses thereof"; заявку на патент США № 11/184528
под названием "Fatty acid formulations for oral delivery of proteins and peptides,
and uses thereof".

2. ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

25 Данное изобретение относится к новым конъюгатам соединений
инсулинов, в которых инсулин или аналог инсулина связан с модифицирующей
группировкой. Изобретение также относится к катионным комплексам таких
конъюгатов соединений инсулинов и к фармацевтическим препаратам,
30 содержащим такие конъюгаты соединений инсулинов и/или модифицирующие
группировки.

3. ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

35 Цинковый комплекс соединения инсулина имеется в продаже, например,
под торговыми названиями HUMULIN® и HUMALOG®. Цинковый комплекс
инсулина обычно существует в гексамерной форме.

40 Описаны различные способы применения цинка в кристаллизации
ацилированного инсулина. Например, в патентной публикации США №
20010041786, опубликованной 15 ноября 2001 г., Mark L. Brader с соавт., под
названием "Stabilized acylated insulin formulations", описан препарат с водным
45 раствором для парентеральной доставки, в частности, в виде препарата для
инъекций, имеющий рН от 7,1 до 7,6, содержащий инсулин, ацилированный

5 жирной кислотой, или аналог инсулина, ацилированный жирной кислотой, и стабилизированный с помощью цинка и предпочтительно фенольного соединения. В патенте США № 6451970 под названием "Peptide derivatives", опубликованном 17 сентября 2002 г. Schaffer с соавт., права на который переданы Novo Nordisk A/S, описаны производные соединения инсулина и аналогов инсулина, где N-концевая аминокислота В-цепи и/или ε-аминокислота Lys в положении В28, В29 или В30 ацилирована с использованием длинноцепочечной углеводородной группы, содержащей от 12 до 22 атомов углерода, и их цинковые комплексы.

15 Описали применение протамина и фенольных соединений для кристаллизации ацилированного инсулина. В патентах США №№ 6268335 (31 июля 2001 г.) и 6465426 (10 октября 2002 г.), опубликованных Brader, которые оба озаглавлены "Insoluble insulin compositions", описаны нерастворимые композиции, содержащие ацилированный инсулин, комплексообразующее соединение протамина, гексамер-стабилизирующее фенольное соединение и двухвалентный катион металла.

25 Существующие подходы специально предназначены для кристаллизации нативного соединения инсулина, или аналогов соединений инсулинов, или для ацилированных соединений инсулинов, имеющих повышенную липофильность по сравнению с неацилированными соединениями инсулинами. В данной области техники существует необходимость в фармацевтически приемлемых комплексах, включающих производные соединений инсулинов, отличные от ацилированного соединения инсулина, такие как гидрофильные и/или амфифильные производные соединений инсулинов, и в стабилизации неацилированных липофильных аналогов соединений инсулинов. В данной области техники существует необходимость также в новых белковых конъюгатах, имеющих повышенную биодоступность или другие улучшенные фармацевтические свойства по сравнению с существующими конъюгатами. В данной области техники существует необходимость в новых препаратах, которые облегчают пероральную доставку белков и белковых конъюгатов. Наконец, существует необходимость в комбинированном подходе для улучшения пероральной биодоступности белка, такого как соединение инсулин, который включает улучшенный пероральный белковый конъюгат,

предложенный в виде твердого вещества в улучшенном препарате для максимизации преимуществ пероральной доставки белков.

4. КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В общем, в изобретении предложен комплекс, включающий конъюгат соединения инсулина, в котором соединение инсулин конъюгировано с модифицирующей группировкой, и катион, где конъюгат соединения инсулина образует комплекс с катионом. Соединение инсулин может представлять собой, например, нативный инсулин или аналоги инсулина. Примеры соединений инсулинов включают в себя инсулин человека, лизпроинсулин, des30 инсулин, нативный проинсулин, искусственный проинсулин и так далее. Катионный компонент может представлять собой, например, двухвалентный катион металла, выбранный из группы, состоящей из Zn^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , Fe^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} , Co^{++} и Mg^{++} .

Модифицирующая группировка может быть выбрана так, чтобы сделать конъюгат соединения инсулина более, менее или таким же растворимым, как соответствующее неконъюгированное соединение инсулин. Предпочтительно, модифицирующая группировка выбрана так, чтобы сделать конъюгат соединения инсулина по меньшей мере в 1,05; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5; 11; 11,5; 12; 12,5; 13; 13,5; 14; 14,5 или 15 раз более растворимым, чем соответствующее неконъюгированное соединение инсулин, в водном растворе при pH приблизительно 7,4. Предпочтительно, модифицирующая группировка выбрана так, чтобы конъюгат соединения инсулина имел растворимость в воде, которая превышает приблизительно 1 г/л, 2 г/л, 3 г/л, 4 г/л, 5 г/л, 10 г/л, 15 г/л, 20 г/л, 25 г/л, 50 г/л, 75 г/л, 100 г/л, 125 г/л или 150 г/л при pH приблизительно 7,4. Кроме того, модифицирующая группировка выбрана так, чтобы сделать конъюгат соединения инсулина таким же или более растворимым, чем соответствующее неконъюгированное соединение инсулин, и растворимость в воде конъюгата соединения инсулина уменьшена путем добавления цинка. В другом воплощении модифицирующая группировка выбрана так, чтобы сделать конъюгат соединения инсулина таким же или более растворимым, чем соответствующее неконъюгированное соединение инсулин; растворимость в воде конъюгата соединения инсулина уменьшена путем добавления цинка; и

растворимость в воде комплекса выше растворимости в воде соединения инсулина. В еще одном воплощении относительная липофильность конъюгата соединения инсулина по сравнению с соответствующим исходным соединением инсулином ($k_{отн}$) равна 1 или меньше 1.

В изобретении также предложены новые конъюгаты соединений инсулинов, содержащие соединение инсулин, конъюгированное с модифицирующей группировкой. Например, в изобретении предложены соединения инсулины, связанные с модифицирующей группировкой, имеющей формулу:



(Формула VI),

где:

X, Y и Z представляют собой независимо выбранные связывающие группы, и каждая из них возможно присутствует, и X, когда присутствует, связан с соединением инсулином ковалентной связью,

по меньшей мере один из R^1 и R^2 присутствует и представляет собой низший алкил и возможно может включать карбонильную группу,

R^2 представляет собой блокирующую группу, такую как $-CH_3$, $-H$, тозилат, или активирующую группу, и

PAG представляет собой линейную или разветвленную углеродную цепь, включающую одну или более алкаленгликолевых группировок (т.е. оксиалкаленовых группировок) и возможно включающую одну или более дополнительных группировок, выбранных из группы, состоящей из $-S-$, $-O-$, $-N-$ и $-C(O)-$, и

где наибольшее число тяжелых атомов, имеющих в модифицирующей группировке, составляет 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

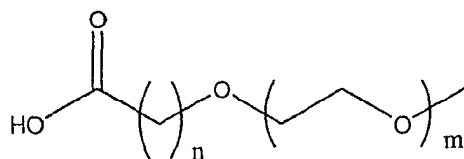
В воплощениях изобретения любой один или более из X, Y и Z могут отсутствовать. Кроме того, X, Y и/или Z, когда присутствуют, независимо могут быть выбраны из $-C(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-C-$ и $-N-$. В одном воплощении Z представляет собой $-C(O)-$. В другом воплощении Z не присутствует.

В некоторых воплощениях R^1 представляет собой низший алкил, и R^2 не присутствует. В других воплощениях R^2 представляет собой низший алкил, и R^1 не присутствует.

В другом воплощении модифицирующая группировка может включать линейную или разветвленную группировку, представляющую собой замещенную углеродную цепь, имеющую основную цепь из 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 атомов, выбранных из группы, состоящей из -C, -C-, -O-, =O, -S-, -N-, -Si-. Тяжелые атомы обычно включают в себя один или более атомов углерода и один или более неуглеродных тяжелых атомов, выбранных из группы, состоящей из -O-, -S-, -N- и =O. Атомы углерода и неуглеродные тяжелые атомы обычно присутствуют в соотношении по меньшей мере 1 атом углерода на каждый неуглеродный тяжелый атом, предпочтительно по меньшей мере 2 атома углерода на каждый неуглеродный тяжелый атом, более предпочтительно по меньшей мере 3 атома углерода на каждый неуглеродный тяжелый атом. Атомы углерода и атомы кислорода обычно присутствуют в соотношении по меньшей мере 1 атом углерода на каждый атом кислорода, предпочтительно по меньшей мере 2 атома углерода на каждый атом кислорода, более предпочтительно по меньшей мере 3 атома углерода на каждый атом кислорода. Модифицирующая группировка может включать одну или более блокирующих групп, таких как разветвленный или линейный C_{1-6} , разветвленный или линейный или карбонил. Модифицирующая группировка обычно включает атомы водорода, и один или более из данных атомов водорода может быть замещен фтором (который является тяжелым атомом, но не следует его рассматривать в качестве тяжелого атома в вышеприведенной формуле). В некоторых случаях модифицирующая группировка, в частности, может исключать незамещенные алкильные группировки. Модифицирующая группировка может быть связана, например, с подходящей группой на аминокислоте, такой как аминогруппа, гидроксильная группа или свободная карбоновокислотная группа полипептида, например, посредством связывающей группы, такой как карбаматная, карбонатная, простая эфирная, сложноэфирная, амидная группа или вторичная аминная группа, или посредством дисульфидной связи. Молекулы в связывающей группе считаются частью модифицирующей группировки. В

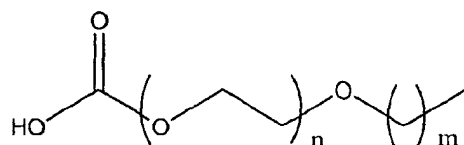
предпочтительном воплощении молекулярная масса модифицирующей группировки меньше молекулярной массы модифицирующей группировки HIM2.

Изобретение включает конъюгаты соединений инсулинов, имеющие модифицирующие группировки формулы:



(Формула VII),

где n равно 1, 2, 3 или 4, и m равно 1, 2, 3, 4 или 5; и/или



(Формула VIII),

где n равно 1, 2, 3, 4 или 5, и m равно 1, 2, 3 или 4.

Следует принимать во внимание, что новые модифицирующие группировки, а также применение таких группировок для модификации инсулина и других полипептидов сами являются аспектами данного изобретения.

В изобретении также предложены новые препараты, содержащие конъюгаты соединений инсулинов и/или конъюгаты катиона и соединения инсулина по изобретению. Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что некоторые композиции жирных кислот являются особенно полезными, в частности, для пероральной доставки полипептидов и полипептидных конъюгатов, таких как инсулин и конъюгаты соединений инсулинов, и/или для пероральной доставки комплексов конъюгатов соединений инсулинов с катионами по изобретению. В одном аспекте в изобретении предложены композиции жирных кислот с одной или более насыщенными или ненасыщенными C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 или C_{10} жирными кислотами и/или солями таких жирных кислот. Предпочтительными жирными кислотами являются каприловая, каприновая, миристиновая и лауриновая. Предпочтительными солями жирных кислот являются натриевые соли каприловой, каприновой, миристиновой и лауриновой кислот. Содержание жирных кислот в композиции обычно находится в диапазоне, имеющем в качестве нижнего предела приблизительно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5;

1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9 или 3,0% масс./масс. и
имеющем в качестве верхнего предела приблизительно 3,0; 3,1; 3,2; 3,3; 3,4;
3,5; 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4,0; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5,0; 5,1; 5,2; 5,3;
5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7,0; 7,1; 7,2;
7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9; 8,0; 8,1; 8,2; 8,3; 8,4; 8,5; 8,6; 8,7; 8,8; 8,9; 9,0; 9,1;
9,2; 9,3; 9,4; 9,5; 9,6; 9,7; 9,8; 9,9; 10,0; 10,1; 10,2; 10,3; 10,4; 10,5; 10,6; 10,7;
10,8; 10,9; 11,0; 11,1; 11,2; 11,3; 11,4; 11,5; 11,6; 11,7; 11,8; 11,9 и 12,0%
масс./масс. В еще одном воплощении содержание жирных кислот в композиции
обычно находится в диапазоне, имеющем в качестве нижнего предела
приблизительно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5;
1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9 или 3,0% масс./масс. и
имеющем в качестве верхнего предела приблизительно 3,0; 3,1; 3,2; 3,3; 3,4;
3,5; 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4,0; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5,0; 5,1; 5,2; 5,3;
5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7,0; 7,1; 7,2;
7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9; 8,0; 8,1; 8,2; 8,3; 8,4; 8,5; 8,6; 8,7; 8,8; 8,9; 9,0; 9,1;
9,2; 9,3; 9,4; 9,5; 9,6; 9,7; 9,8; 9,9; 10,0; 10,1; 10,2; 10,3; 10,4; 10,5; 10,6; 10,7;
10,8; 10,9; 11,0; 11,1; 11,2; 11,3; 11,4; 11,5; 11,6; 11,7; 11,8; 11,9 или 12,0%
масс./масс., и содержание одной жирной кислоты, предпочтительно
каприловой, каприновой, миристиновой или лауриновой, или ее соли в
содержании жирных кислот в композиции обычно выше приблизительно 90; 91;
92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 99,5; 99,6; 99,7; 99,8 или 99,9% масс./масс.

В изобретении также предложен способ лечения недостаточности
инсулина или иного пополнения инсулина у субъекта с использованием
конъюгатов соединений инсулинов, комплексов конъюгатов соединений
инсулинов с катионами и/или препаратов по изобретению. Данные способы
обычно включают введение терапевтически эффективного количества одного
или более конъюгатов соединений инсулинов, комплексов конъюгатов
соединений инсулинов с катионами и/или препаратов по изобретению субъекту,
нуждающемуся в этом.

5. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1-15Б представлены микрофотографии различных
кристаллических твердых веществ по изобретению. На фиг. 1 и 2 представлены
микрофотографии, полученные с использованием микроскопа Zeiss Axiovert,

показывающие Zn-комплекс Т-типа для HIM2 в концентрации 30 г/л, кристаллы выращивали в течение 24 ч. На фиг. 3 представлена микрофотография, полученная с использованием микроскопа Zeiss Axiovert, показывающая Zn-комплекс Т-типа для HIM2 в концентрации 30 г/л, кристаллы выращивали в течение 5 суток. На фиг. 4 представлена микрофотография, полученная с использованием микроскопа Zeiss Axiovert, показывающая Zn-комплекс R-типа для HIM2 в концентрации 30 г/л, кристаллы выращивали в течение 4 суток. На фиг. 5 представлена микрофотография кристаллического Zn-комплекса R-типа для IN105, содержащего 30% органического вещества. На фиг. 6А-10Б представлены микрофотографии различных Zn-комплексов R-типа для HIM2, полученных с использованием органического растворителя. На фиг. 11А-14Б представлены микрофотографии кристаллов различных Zn-комплексов R-типа, полученных в результате сокристаллизации HIM2 и IN105. На фиг. 15А-15Б представлены микрофотографии кристаллов различных Zn-комплексов R-типа, полученных в результате сокристаллизации HIM2 и инсулина человека. Данное изобретение включает кристаллы, имеющие морфологию, показанную на любой из фиг. 1-15Б.

На фиг. 16-20 представлены результаты анализа глюкозы в крови у мышей (MBGA от англ. Mouse Blood Glucose Assay) для HIM2 и различных комплексов Zn-HIM2. На фиг. 16 показаны MBGA-профили биологической активности для HIM2. На фиг. 17 показаны MBGA-профили биологической активности для продукта Zn HIM2 соединения инсулина R-типа. На фиг. 18 показаны MBGA-профили биологической активности для продукта Zn HIM2 соединения инсулина Т-типа. На фиг. 19 показаны MBGA-профили биологической активности для продукта Zn HIM2 соединения инсулина с протамином. На фиг. 20 показан эффект протаминового комплекса R-типа на снижение уровня глюкозы через 30 и 90 минут после введения дозы.

На фиг. 21-24 показаны MBGA-профили биологической активности для IN-186, IN-192, IN-190, IN-191, IN-189, IN-178, IN-193, IN-194, IN-185, IN-196 и IN-197.

На фиг. 25 и 26 приведены результаты исследований с фиксированным уровнем глюкозы у собак для комплексов Zn-HIM2 по изобретению.

На фиг. 27 и 28 приведены результаты исследований с фиксированным уровнем глюкозы у собак для комплексов Zn-IN105 по изобретению.

5 На фиг. 29 и 30 приведены результаты исследований с фиксированным уровнем глюкозы у собак, которым вводили IN105 в дозе 0,25 мг/кг в пероральном жидком препарате [820], содержащем 3% (масс./об.) натриевой соли каприновой кислоты в фосфатном буфере без дополнительных
10 эксципиентов.

На фиг. 31-33 приведены результаты исследований с фиксированным уровнем глюкозы у собак, которым давали таблетки, содержащие 6 мг IN105 и
15 150 мг маннита, 30 мг Exlotab с 143 мг капрата с или без 143 мг лаурата (пероральная доза составляла 0,25 мг/кг).

На фиг. 34-37 приведены результаты исследований с фиксированным уровнем глюкозы у собак, которым давали таблетки-прототипы, содержащие
20 150 мг и 280 мг капрата, и таблетки, содержащие 140 мг/140 мг капрата/лаурата (доза ZN IN-105 составляла 6 мг или 0,25 мг/кг) и сравнение с подкожным* и ингаляционным* введением стандартного инсулина.

25 На фиг. 38-42 приведены результаты исследований с фиксированным уровнем глюкозы у собак, которым давали таблетки, содержащие 150 мг и 286 мг капрата, и таблетки, содержащие 140 мг/140 мг капрата/лаурата (доза ZN IN-
30 105 составляла 0,25 мг/кг).

6. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Ниже приведены определения терминов, используемых в данном описании изобретения и в формуле изобретения. Предложенные определения,
35 если не оговорено особо, использованы везде в описании настоящего изобретения. Термины, не определенные в данном описании, имеют значение, которое обычно подразумевается в той области техники, к которой относится
40 данный термин.

Термин "**вставка**", когда его используют в отношении аминокислотной последовательности, включает добавления одной или более аминокислот с
45 одного или обоих концов последовательности, а также инсерции в пределах данной последовательности.

Термин "**комплекс**" относится к ассоциации молекул, в которой одно или более соединений инсулинов или конъюгатов соединений инсулинов образуют
50

координационные связи с одним или более атомами или ионами металла. Комплексы могут существовать в растворе или в виде твердого вещества, такого как кристалл, микрокристалл, или аморфного твердого вещества. Термин **“смесь комплексов”** означает смесь, содержащую два или более различных комплексов, либо в растворе, либо в твердой форме. Смеси комплексов могут включать в себя, например, комплексы с разными соединениями инсулинами, разными конъюгатами соединений инсулинов, разными гибридными комплексами, разными катионами, комбинации вышеупомянутого и тому подобное. Термин **“гибридный комплекс”** означает комплекс конъюгата соединения инсулина с катионом, содержащий два или более разных соединений инсулинов и/или конъюгатов соединений инсулинов.

Термин **“комплексообразующий агент”** означает молекулу, которая имеет множество зарядов и которая связывается или образует комплекс с конъюгатами соединений инсулинов. Примеры комплексообразующих агентов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают в себя протамины, сурфен, глобиновые белки, спермин, спермидин, альбумин, аминокислоты, карбоновые кислоты, поликатионные полимерные соединения, катионные полипептиды, анионные полипептиды, нуклеотиды и антисенс. Смотри Brange, J., Galenics of Insulin compound, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1987), полное описание которого включено в данное изобретение посредством ссылки.

Термин **“консервативный”**, используемый в отношении вставки, делеции или замены аминокислоты, означает вставку, делецию или замену в аминокислотной цепи, которая не уменьшает полностью терапевтическую эффективность соединения инсулина, т.е. данная эффективность может уменьшаться, оставаться такой же или увеличиваться относительно терапевтической эффективности приемлемого с научной точки зрения контроля, такого как соответствующее соединение нативного инсулина.

Термин **“гидрофильный”** означает проявление свойств растворимости в воде, и термин **“гидрофильная группировка”** относится к группировке, которая является гидрофильной, и/или которая, при присоединении к другой химической структурной единице, увеличивает гидрофильность такой химической структурной единицы. Примеры включают в себя сахара и

полиалкиленовые группировки, такие как полиэтиленгликоль, но не ограничиваются этим. Термин **“липофильный”** означает проявление свойств растворимости в жирах, таких как накопление в жире или жировых тканях, способность растворяться в липидах и/или способность проникать в биологические мембраны, взаимодействовать с ними и/или проходить через них, и термин **“липофильная группировка”** означает группировку, которая является липофильной, и/или которая, при присоединении к другой химической структурной единице, увеличивает липофильность такой химической структурной единицы. Термин **“амфифильный”** означает проявление свойств гидрофильности и липофильности, и термин **“амфифильная группировка”** означает группировку, которая является амфифильной, и/или которая, при присоединении к полипептидному или непептидному лекарственному препарату, увеличивает амфифильность (т.е. увеличивает как гидрофильность, так и амфифильность) полученного конъюгата, например некоторые PEG-жирнокислотные модифицирующие группировки и сахар-жирнокислотные модифицирующие группировки.

Термин **“низший алкил”** означает замещенные или незамещенные, линейные или разветвленные алкильные группировки, содержащие от одного до шести атомов углерода, т.е. C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ или C₆. Термин **“высший алкил”** означает замещенные или незамещенные, линейные или разветвленные алкильные группировки, содержащие шесть или более атомов углерода, например C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀ и так далее.

Термин **“монодисперсный”** описывает смесь соединений, где приблизительно 100 процентов соединений в смеси имеют одинаковую молекулярную массу. Термин **“по существу монодисперсный”** описывает смесь соединений, где по меньшей мере приблизительно 95 процентов соединений в смеси имеют одинаковую молекулярную массу. Термин **“чисто монодисперсный”** описывает смесь соединений, где приблизительно 100 процентов соединений в смеси имеют одинаковую молекулярную массу и имеют одинаковую молекулярную структуру. Соответственно, чисто монодисперсная смесь является монодисперсной смесью, но монодисперсная смесь не обязательно является чисто монодисперсной смесью. Термин **“по существу чисто монодисперсный”** описывает смесь соединений, где по

5 меньшей мере приблизительно 95 процентов соединений в смеси имеют одинаковую молекулярную массу и одинаковую молекулярную структуру. Соответственно, по существу чисто монодисперсная смесь является по
5 по существу монодисперсной смесью, но по существу монодисперсная смесь не обязательно является по существу чисто монодисперсной смесью. В композициях конъюгатов соединений инсулинов с катионами компоненты
10 конъюгатов соединений инсулинов предпочтительно являются монодисперсными, по существу монодисперсными, чисто монодисперсными или по существу чисто монодисперсными, но могут быть также полидисперсными. Термин **“полидисперсный”** означает имеющий дисперсность, которая не является монодисперсной, по существу монодисперсной, чисто монодисперсной или по существу чисто монодисперсной.

20 Термин **“соединение нативный инсулин”**, специфически используемый в данном описании, означает соединение инсулин млекопитающего (например инсулин человека, соединение бычий инсулин,
25 соединение инсулин свиньи или соединение инсулин кита), полученное из природного, искусственного или генно-инженерного источника. Инсулин человека состоит из А-цепи, имеющей двадцать одну аминокислоту, и В-цепи, имеющей тридцать аминокислот, которые сшиты дисульфидными связями.
30 Правильно сшитый инсулин человека содержит три дисульфидных мостика: один - между А7 и В7, второй- между А20 и В19, и третий - между А6 и А11. Инсулин человека имеет три свободные аминокислоты: В1-фенилаланин, А1-глицин и В29-лизин. Свободные аминокислоты в положениях А1 и В1 представляют собой α-аминокислоты. Свободная аминокислота в положении В29 представляет собой ε-аминокислоту. Термин **“аналог инсулина”** означает
40 полипептид, проявляющий частичную, полную или повышенную активность относительно соответствующего нативного инсулина, или полипептид, который превращается *in vivo* или *in vitro* в полипептид, проявляющий частичную, полную или повышенную активность относительно соответствующего нативного
45 инсулина, например полипептид, имеющий структуру инсулина человека со вставками, делециями и/или заменами одной или более консервативных аминокислот. Аналоги инсулина могут быть идентифицированы с
50

использованием известных методов, таких как методы, описанные в патентной публикации США № 20030049654, "Protein design automation for protein libraries", поданного 18 марта 2002 г. на имя Dahiyat с соавт. Проинсулины, препроинсулины, предшественники инсулина, одноцепочечные предшественники инсулина человека и животных, не относящихся к человеку, и аналоги любого из вышеперечисленного в данном описании также называются аналогами инсулина, как и инсулины немлекопитающих. В данной области техники известно много аналогов инсулина (смотри обсуждение ниже). Если в контексте не оговорено особо (например, кроме тех случаев, где указан конкретный инсулин, такой как "инсулин человека" или тому подобное), термин **"соединение инсулин"** используют в широком смысле для включения нативных инсулинов и аналогов инсулинов.

Термин **"полиалкиленгликоль"** или PAG относится к замещенным или незамещенным, линейным или разветвленным полиалкиленгликолевым полимерам, таким как полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль (PPG) и полибутиленгликоль (PBG), и их комбинациям (например линейным или разветвленным полимерам, включающим комбинации двух или более различных PAG-субъединиц, такие как комбинации двух или более различных PAG-субъединиц, выбранных из PEG-, PPG-, PPG- и PBG-субъединиц) и включает простые моноалкилэферы полиалкиленгликоля. Термин PAG-субъединица означает одну структурную единицу PAG, например термин **"PEG-субъединица"** относится к одной полиэтиленгликолевой структурной единице, например к $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$, термин **"PPG-субъединица"** относится к одной полипропиленгликолевой структурной единице, например к $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$, и термин **"PBG-субъединица"** относится к одной полибутиленгликолевой структурной единице, например к $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$. PAG и/или PAG-субъединицы также включают в себя замещенные PAG и/или PAG-субъединицы, например PAG, содержащие алкильные боковые цепи, такие как метильные, этильные или пропильные боковые цепи, или карбонильные боковые цепи, а также PAG, содержащие одну или более разветвленных PAG-субъединиц, таких как изо-PPG или изо-PBG.

Термин **"соединение проинсулин"** означает соединение инсулин, в котором С-конец В-цепи связан с N-концом А-цепи посредством природного или

искусственного С-пептида, имеющего 5 или более аминокислот. Термин **“соединение препроинсулин”** означает соединение проинсулин, дополнительно содержащее лидерную последовательность, соединенную с N-концом В-цепи, такую как последовательность, выбранную для стимуляции экскреции в виде растворимого белка, или последовательность, выбранную для предотвращения конъюгирования N-конца, или последовательность, выбранную для улучшения очистки (например последовательность со средством связывания к колонке для очистки). Термин **“одноцепочечный предшественник соединения инсулина”** или **“соединение минипроинсулин”** означает соединение инсулин, в котором С-конец В-цепи (или укороченной В-цепи, у которой на С-конце удалены 1, 2, 3 или 4 аминокислоты) связан с N-концом А-цепи или укороченной А-цепи, которая укорочена на N-конце на 1, 2, 3 или 4 аминокислоты, без промежуточного С-пептида или через укороченный С-пептид, имеющий 1, 2, 3 или 4 аминокислоты.

Термин **“протамин”** относится к смеси сильно основных белков, полученных из природных (например из спермы рыб) или рекомбинантных источников. Смотри Hoffmann, J. A., *et al.*, Protein Expression and Purification, 1:127-133 (1990). Композиция протамина может быть представлена в виде препарата данных белков, относительно свободного от солей, часто называемого как “протаминавое основание” или в виде препарата, содержащего соли данных белков.

Термины **“белок”**, **“пептид”** и **“полипептид”** используются в данном описании взаимозаменяемо и относятся к соединениям, имеющим аминокислотные последовательности любой длины, но по меньшей мере из двух аминокислот.

Термин **“R-тип”** означает конформацию комплекса, образованного в присутствии конъюгата соединения инсулина, катиона и стабилизирующего соединения, такого как фенол. Термин **“T-тип”** означает конформацию комплекса, образованного в присутствии конъюгата соединения инсулина и катиона без стабилизирующего соединения, такого как фенол. Комплекс T-типа или R-типа может включать или исключать протамин.

Термин **“приемлемый с научной точки зрения контроль”** означает экспериментальный контроль, который является приемлемым для среднего специалиста в той области техники, к которой относится предмет эксперимента.

Термин **“твердое”** относится к состоянию вещества, у которого существует трехмерная регулярная структура; в данном описании этот термин широко используется для упоминания как кристаллических твердых веществ, аморфных твердых веществ, так и комбинаций кристаллических твердых веществ и аморфных твердых веществ. Термин **“твердый конъюгат соединения инсулина с катионом”** относится к твердому веществу, которое включает конъюгат соединения инсулина с катионом, предпочтительно координированный одновалентным или поливалентным катионом. Термин **“кристалл”** означает твердое вещество в форме правильного многогранника. Термин **“кристаллический”** относится к твердым веществам, имеющим свойства кристаллов. Термин **“микрориссталл”** означает твердое вещество, которое образовано, главным образом, из вещества в кристаллическом состоянии, которое является микроскопическим по размерам, наибольший размер которого обычно находится в диапазоне от 1 микрона до 100 микрон. В некоторых случаях отдельные кристаллы, имеющие микрориссталлическую структуру, представляют собой кристаллы, имеющие преимущественно одну кристаллографическую структуру. В некоторых воплощениях кристаллы по изобретению не являются микрориссталлами. Термин **“микрориссталлический”** относится к состоянию вещества, являющегося микрориссталлом. Термин **“аморфный”** относится к твердому веществу, которое не находится в кристаллической форме. Средний специалист в данной области может отличить кристаллы от аморфных веществ, используя стандартные методы, например, используя рентгеновские кристаллографические методы, сканирующую электронную микроскопию или оптическую микроскопию. Термин **“смесь твердых веществ”** означает смесь двух разных твердых веществ. Термин **“смесь кристаллов”** означает смесь двух разных кристаллов. Термин **“сокристалл”** означает кристалл, содержащий два или более различных соединений инсулинов и/или конъюгатов соединений инсулинов. Комплексы конъюгатов соединений инсулинов с

катионами по изобретению могут быть представлены в любой из вышеупомянутых форм или в виде смесей двух или более таких форм.

5 Термин **“замена”** означает замену одного или более аминокислотных остатков в последовательности соединения инсулина другой аминокислотой. В
10 некоторых случаях аминокислотная замена действует как функциональный эквивалент, что приводит к “молчащему” изменению. Замены могут быть консервативными; например, консервативные замены могут быть выбраны из
15 других представителей того же класса, к которому принадлежит замещенная аминокислота. Примеры неполярных (гидрофобных) аминокислот включают в себя аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. Примеры полярных нейтральных аминокислот включают в себя глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Примеры
20 положительно заряженных (основных) аминокислот включают в себя аргинин, лизин и гистидин. Примеры отрицательно заряженных (кислых) аминокислот включают в себя аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту.

25 **“Растворимость в воде”** или **“водная растворимость”**, если не оговорено особо, определяют в водном буферном растворе при pH 7,4.

7. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 В изобретении предложены комплексы конъюгатов соединений инсулинов с катионами и различные композиции, содержащие такие комплексы, а также способы получения и применения таких комплексов и композиций. Данные комплексы являются полезными для введения соединения инсулина для лечения различных медицинских состояний, таких как состояния, которые
35 характеризуются дефицитом соединений инсулинов. Комплексы обычно включают в себя катионный компонент и компонент, представляющий собой конъюгат соединения инсулина. Компонент, представляющий собой конъюгат соединения инсулина, обычно включает соединение инсулин, связанное с модифицирующей группировкой. Примеры других подходящих компонентов
40 данных комплексов и/или композиций включают в себя стабилизирующие агенты, комплексообразующие агенты и другие известные в данной области компоненты для применения в получении катион-белковых комплексов. В
45 изобретении также предложены новые конъюгаты соединений инсулинов и

50

препараты жирных кислот, содержащие такие конъюгаты соединений инсулинов и/или комплексы конъюгатов соединений инсулинов с катионами.

7.1. Соединение инсулин

5 Конъюгат соединения инсулина с катионом включает компонент, представляющий собой соединение инсулин. Соединение инсулин может представлять собой, например, соединение инсулин млекопитающего, такое как
10 инсулин человека, или аналог соединения инсулина.

В данной области техники известно большое количество различных аналогов соединений инсулинов. Предпочтительными аналогами соединений
15 инсулинов являются те аналоги, которые содержат лизин, предпочтительно лизин в пределах 5 аминокислот С-конца В-цепи, например в положении B26, B27, B28, B29 и/или B30. Группа подходящих аналогов, имеющих последовательность соединения инсулина, за исключением того, что
20 аминокислотный остаток в положении B28 представляет собой Asp, Lys, Leu, Val или Ala; аминокислотный остаток в положении B29 представляет собой Lys или Pro; аминокислотный остаток в положении B10 представляет собой His или Asp; аминокислотный остаток в положении B1 представляет собой Phe, Asp или
25 делетирован один или в комбинации с делецией остатка в положении B2; аминокислотный остаток в положении B30 представляет собой Thr, Ala или делетирован; и аминокислотный остаток в положении B9 представляет собой Ser или Asp; при условии, что в положении либо B28, либо B29 находится Lys, описана в EP-A 1227000107 (полное описание которого включено в данное изобретение посредством ссылки).

35 Другие примеры подходящих аналогов соединений инсулинов включают в себя Asp^{B28} инсулин человека, Lys^{B28} инсулин человека, Leu^{B28} инсулин человека, Val^{B28} инсулин человека, Ala^{B28} инсулин человека, Asp^{B28}Pro^{B29}
40 инсулин человека, Lys^{B28}Pro^{B29} инсулин человека, Leu^{B28}Pro^{B29} инсулин человека, Val^{B28}Pro^{B29} инсулин человека, Ala^{B28}Pro^{B29} инсулин человека, а также аналоги, полученные с использованием описанных выше принципов замещения. Фрагменты соединений инсулинов включают в себя B22-B30
45 инсулин человека, B23-B30 инсулин человека, B25-B30 инсулин человека, B26-B30 инсулин человека, B27-B30 инсулин человека, B29-B30 инсулин человека, B1-B2 инсулин человека, B1-B3 инсулин человека, B1-B4 инсулин человека, B1-

50

В5 инсулин человека, А-цепь инсулина человека и В-цепь инсулина человека, но не ограничиваются этим.

5 Другие дополнительные примеры подходящих аналогов соединений
инсулинов можно найти в патентной публикации США № 20030144181A1 под
названием "Insoluble compositions for controlling blood glucose", 31 июля 2003 г.;
патентной публикации США № 20030104983A1 под названием "Stable insulin
10 formulations", 5 июня 2003 г.; патентной публикации США № 20030040601A1 под
названием "Method for making insulin precursors and insulin analog precursors", 27
февраля 2003 г.; патентной публикации США № 20030004096A1 под названием
15 "Zinc-free and low-zinc insulin preparations having improved stability", 2 января 2003
г.; патенте США № 6551992B1 под названием "Stable insulin formulations", 22
апреля 2003 г.; патенте США № 6534288B1 под названием "C peptide for
improved preparation of insulin and insulin analogs", 18 марта 2003 г.; патенте
20 США № 6531448B1 под названием "Insoluble compositions for controlling blood
glucose", 11 марта 2003 г.; патенте США № RE37971E под названием "Selective
acylation of epsilon-amino groups", 28 января 2003 г.; патентной публикации США
25 № 20020198140A1 под названием "Pulmonary insulin crystals", 26 декабря 2002
г.; патенте США № 6465426B2 под названием "Insoluble insulin compositions", 15
октября 2002 г.; патенте США № 6444641B1 под названием "Fatty acid-acylated
insulin analogs", 3 сентября 2002 г.; патентной публикации США №
30 20020137144A1 под названием "Method for making insulin precursors and insulin
precursor analogues having improved fermentation yield in yeast", 26 сентября 2002
г.; патентной публикации США № 20020132760A1 под названием "Stabilized
35 insulin formulations", 19 сентября 2002 г.; патентной публикации США №
20020082199A1 под названием "Insoluble insulin compositions", 27 июня 2002 г.;
патенте США № 6335316B1 под названием "Method for administering acylated
40 insulin", 1 января 2002 г.; патенте США № 6268335B1 под названием "Insoluble
insulin compositions", 31 июля 2001 г.; патентной публикации США №
20010041787A1 под названием "Method for making insulin precursors and insulin
precursor analogues having improved fermentation yield in yeast", 15 ноября 2001
45 г.; патентной публикации США № 20010041786A1 под названием "Stabilized
acylated insulin formulations", 15 ноября 2001 г.; патентной публикации США №
20010039260A1 под названием "Pulmonary insulin crystals", 8 ноября 2001 г.;

50

патентной публикации США № 20010036916A1 под названием "Insoluble insulin compositions", 1 ноября 2001 г.; патентной публикации США № 20010007853A1 под названием "Method for administering monomeric insulin analogs", 12 июля 2001 г.; патенте США № 6051551A под названием "Method for administering acylated insulin", 18 апреля 2000 г.; патенте США № 6034054A под названием "Stable insulin formulations", 7 марта 2000 г.; патенте США № 5970973A под названием "Method of delivering insulin lispro", 26 октября 1999; патенте США № 5952297A под названием "Monomeric insulin analog formulations", 14 сентября 1999; патенте США № 5922675A под названием "Acylated Insulin Analogs", 13 июля 1999; патенте США № 5888477A под названием "Use of monomeric insulin as a means for improving the bioavailability of inhaled insulin", 30 марта 1999; патенте США № 5873358A под названием "Method of maintaining a diabetic patient's blood glucose level in a desired range", 23 февраля 1999; патенте США № 5747642A под названием "Monomeric insulin analog formulations", 5 мая 1998; патенте США № 5693609A под названием "Acylated insulin compound analogs", 2 декабря 1997; патенте США № 5650486A под названием "Monomeric insulin analog formulations", 22 июля 1997; патенте США № 5646242A под названием "Selective acylation of epsilon-amino groups", 8 июля 1997; патенте США № 5597893A под названием "Preparation of stable insulin analog crystals", 28 января 1997; патенте США № 5547929A под названием "Insulin analog formulations", 20 августа 1996; патенте США № 5504188A под названием "Preparation of stable zinc insulin compound analog crystals", 2 апреля 1996; патенте США № 5474978A под названием "Insulin analog formulations", 12 декабря 1995; патенте США № 5461031A под названием "Monomeric insulin analog formulations", 24 октября 1995; патенте США № 4421685A под названием "Process for producing an insulin", 20 декабря 1983; патенте США № 6221837 под названием "Insulin derivatives with increased zinc binding" 24 апреля 2001 г.; патенте США № 5177058 под названием "Pharmaceutical formulation for the treatment of diabetes mellitus" 5 января 1993 (описывает фармацевтические препараты, содержащие производное соединения инсулина, модифицированное основанием в положении В31 и имеющее изоэлектрическую точку в диапазоне от 5,8 до 8,5, и/или по меньшей мере одну из его физиологически допустимых солей в фармацевтически приемлемом эксципиенте, и относительно высокое

5 содержание ионов цинка в диапазоне от приблизительно 1 мкг до приблизительно 200 мкг цинка/МЕ, включая соединение инсулин-B31-Arg-OH и инсулин-B31-Arg-B32-Arg-OH человека). Полное описание каждого из вышеупомянутых патентных документов включено в данное описание посредством ссылки, особенно в части, относящейся к получению, применению и композициям различных аналогов соединений инсулинов.

10 Соединение инсулин, используемое для получения конъюгатов соединения инсулина с катионом, может быть получено с использованием любой из множества общепризнанных методов синтеза пептидов, например классических методов (синтеза в растворе), методов твердофазного синтеза, полусинтетических методов и методов рекомбинантной ДНК. Например, Chance с соавт. в заявке на патент США № 07/388201, ЕРО383472; Brange с соавт. ЕРО214826 и Belagaje с соавт. в патенте США № 5304473, включенных в данное описание посредством ссылки, раскрывают получение различных соединений проинсулинов и аналогов соединений инсулинов. А- и В-цепи аналогов соединений инсулинов могут быть получены также с помощью молекулы предшественника проинсулин-подобного соединения или молекулы одноцепочечного предшественника соединения инсулина с использованием методов рекомбинантной ДНК. Смотри Frank *at al.*, "Peptides: Synthesis-Structure-Function", *Proc. Seventh Am. Pept. Symp.*, Eds. D. Rich and E. Gross (1981); Bernd Gutte, *Peptides: Synthesis, Structures, and Applications*, Academic Press (October 19, 1995); Chan, Weng and White, Peter (Eds.), *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press (March 2000 г.); полные описания которых в части, относящейся к пептидному синтезу, рекомбинантной продукции и производству, включены в данное описание посредством ссылки.

40 7.2. Модифицирующая группировка

45 Комплексы конъюгатов соединений инсулинов с катионами включают в себя модифицирующую группировку, связанную (например посредством ковалентной или ионной связи) с соединением инсулином с получением конъюгата соединения инсулина. Модифицирующие группировки представляют собой связанные с соединением инсулином группировки, которые дают соединение инсулин с желательными свойствами, как описано в данном

50

изобретении. Например, модифицирующая группировка может уменьшать скорость распада соединения инсулина в различном окружении (таким как
5 желудочно-кишечный тракт и/или кровоток), так что меньше соединения инсулина распадается в модифицированной форме, чем распадалось бы в таком окружении в отсутствие модифицирующей группировки. Предпочтительные модифицирующие группировки представляют собой
10 группировки, которые позволяют конъюгату соединения инсулина сохранить терапевтически значимый процент биологической активности исходного соединения инсулина. Кроме того, предпочтительные модифицирующие группировки представляют собой группировки, которые являются амфифильными или гидрофильными и/или которые делают конъюгат
15 соединения инсулина амфифильным, или гидрофильным, или менее липофильным, чем приемлемый с научной точки зрения контроль, такой как соответствующее соединение инсулин или соответствующее неконъюгированное соединение инсулин.

Примеры подходящих модифицирующих группировок и конъюгатов соединений инсулинов, полезных в композициях конъюгатов соединений инсулинов с катионами, можно найти в следующих патентах, полные описания которых включены в данное описание посредством ссылки: патенте США №
25 6303569 под названием "Trialkyl-lock-facilitated polymeric prodrugs of amino-containing bioactive agents", 16 октября 2001 г.; патенте США № 6214330, "Coumarin and related aromatic-based polymeric prodrugs", 10 апреля 2001 г.; патенте США № 6113906 под названием "Water-soluble non-antigenic polymer linkable to biologically active material", 5 сентября 2000 г.; патенте США №
30 5985263 под названием "Substantially pure histidine-linked protein polymer conjugates", 16 ноября 1999; патенте США № 5900402 под названием "Method of reducing side effects associated with administration of oxygen-carrying proteins", 4 мая 1999; патенте США № 5681811, "Conjugation-stabilized therapeutic agent compositions, delivery and diagnostic formulations comprising same, and method of making and using the same" 28 октября 1997; патенте США № 5637749 под названием "Aryl imidate activated polyalkylene oxides", 10 июня 1997; патенте США № 5612460 под названием "Active carbonates of polyalkylene oxides for
40 modification of polypeptides", 18 марта 1997; патенте США № 5567422 под

названием "Azlactone activated polyalkylene oxides conjugated to biologically active nucleophiles", 22 октября 1996; патенте США № 5405877 под названием "Cyclic imide thione activated polyalkylene oxides", 11 апреля 1995; и патенте США № 5359030 под названием "Conjugation-stabilized polypeptide compositions, therapeutic delivery and diagnostic formulations comprising same, and method of making and using the same", 25 октября 1994. Дополнительные примеры конъюгированных пептидов, полезных в препаратах по настоящему изобретению, можно найти в следующих заявках на патент США, полные описания которых включены в данное описание посредством ссылки: в заявке на патент США № 09/134803, поданной 14 августа 1998; № 10/018879, поданной 19 декабря 2001 г.; № 10/235381, поданной 5 сентября 2002 г.; № 10/235284, поданной 5 сентября 2002 г.; и № 09/873797, поданной 4 июня 2001 г. Полное описание каждого из вышеупомянутых патентов и каждой из вышеупомянутых заявок на патент в части, относящейся к группировкам, используемым для модификации полипептидов, включено в данное описание посредством ссылки.

Основные цепи модифицирующих группировок могут включать слабые или способные к распаду связи. Например, PAG могут включать гидролитически нестабильные связи, такие как лактидная, гликолидная, карбонатная, сложноэфирная, карбаматная и тому подобное, которые чувствительны к гидролизу. Данный подход позволяет расщеплять такие полимеры на фрагменты с меньшей молекулярной массой. Примеры таких полимеров описаны, например, Hubbell *с соавт.* в патенте США № 6153211, полное описание которого включено в данное описание посредством ссылки. Смотри также патент США № 6309633, Ekwuribe *с соавт.*, полное описание которого включено в данное описание посредством ссылки.

Модифицирующая группировка может включать в себя любые гидрофильные группировки, липофильные группировки, амфифильные группировки, солеобразующие группировки и их комбинации. Типичные гидрофильные, амфифильные и липофильные полимеры и модифицирующие группировки описаны более подробно ниже.

7.2.1. Гидрофильные группировки

Примеры подходящих гидрофильных группировок включают в себя PAG-группировки, другие гидрофильные полимеры, сахарные группировки, полисорбатные группировки и их комбинации.

7.2.2. Полиалкиленгликолевые группировки

PAG представляют собой соединения с повторяющимися алкиленгликолевыми структурными единицами. В некоторых воплощениях все структурные единицы являются идентичными (например, PEG или PPG). В других воплощениях алкиленовые структурные единицы являются разными (например, полиэтилен-со-пропиленгликоль или PLURONICS®). Данные полимеры могут быть статистическими сополимерами (например, когда сополимеризуются этиленоксид и пропиленоксид) или разветвленными или привитыми сополимерами.

PEG представляет собой предпочтительный PAG и является полезным в биологических применениях, так как он имеет весьма желательные свойства и признан FDA (Управлением США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) безопасным (GRAS). PEG обычно имеет формулу $H-(CH_2CH_2O)_n-H$, где n может варьировать от приблизительно 2 до приблизительно 4000 или более, однако блокирующие группировки могут варьировать, например, представлять собой монометокси или дигидрокси. Обычно PEG не имеет цвета, запаха, является водорастворимым или смешивается с водой (в зависимости от молекулярной массы), термостойким, химически инертным, гидролитически стабильным и, как правило, нетоксичным. PEG является также биосовместимым и обычно не вызывает в организме иммунной реакции. Предпочтительные PEG-группировки включают в себя 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или более PEG-субъединиц.

PEG может быть моодисперсным, по существу моодисперсным, чисто моодисперсным или по существу чисто моодисперсным (например таким, как описано ранее авторами данной заявки в патенте США № 09/873731 и патенте США № 09/873797, которые оба поданы 4 июня 2001 г. и полные описания которых включены в данное описание посредством ссылки) или

полидисперсным. Одно из преимуществ использования относительно
низкомолекулярных монодисперсных полимеров заключается в том, что они
образуют легко определяемые молекулы конъюгатов, что может облегчить как
воспроизводимый синтез, так и одобрение FDA).

PEG может быть линейным с гидроксильной группой на каждом конце (до
его конъюгирования с остатком соединения инсулина). PEG также может
представлять собой алкокси-PEG, такой как метокси-PEG (или mPEG), где один
конец представляет собой относительно инертную алкокси-группу (например
линейную или разветвленную OC_{1-6}), тогда как другой конец представляет
собой гидроксильную группу (которая связана с соединением инсулином).

PEG также может быть разветвленным, который в одном из воплощений
может быть представлен как $R(-PEG_nOH)_m$, где R представляет собой
центральный (обычно многоатомный) коровый агент, такой как пентаэритрит,
сахар, лизин или глицерин, n представляет собой число PEG-субъединиц и
может варьировать для каждой ветви, и обычно равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32,
33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50, и m
представляет собой число ветвей и варьирует от 2 до максимального числа
сайтов присоединения на коровом агенте. Все эти ветви могут быть
одинаковыми или разными и могут быть терминированы, например, простыми
эфирами и/или сложными эфирами. Число ветвей m может варьировать от трех
до ста или более, и одна или более концевых гидроксильных групп могут быть
связаны с остаточным соединением инсулином или иным образом подвергнуты
химической модификации.

Другие разветвленные PEG включают в себя PEG, представленные
формулой $(CH_3O-PEG)_pR-Z$, где p равно 2 или 3, R представляет собой
центральный кор, такой как лизин или глицерин, и Z представляет собой группу,
такую как карбоксил, которая легко подвергается химической активации. Еще
одна разветвленная форма, PEG с боковыми подвешенными группами, имеет
химически активные группы, такие как карбоксилы, вдоль основной цепи PEG, а
не на конце, или не только на конце, PEG-цепей. Разветвленный PEG может
быть представлен формулой $PEG(-LCHX_2)_n$, где L представляет собой

связывающую группу, и X представляет собой активированную концевую группу.

7.2.3. Сахарные группировки

5 Модифицирующие группировки, описанные в данном изобретении, могут
включать в себя сахарные группировки. Обычно сахарная группировка
представляет собой углеводный продукт из по меньшей мере одной сахарозной
10 группы. Типичные сахарные группировки включают в себя, но не
ограничиваются этим, глицериновые группировки, моно-, ди-, три- и
олигосахариды, и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и
15 полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают в себя C₆ и
выше (предпочтительно от C₆ до C₈) сахара, такие как глюкоза, фруктоза,
манноза, галактоза, рибоза и седогептулоза; ди- и трисахариды включают в
себя группировки, имеющие две или три моносахаридные структурные единицы
20 (предпочтительно C₅-C₈), такие как сахароза, целлобиоза, мальтоза, лактоза и
раффиноза. Конъюгирование с использованием сахарных группировок описано
в патентах США №№ 5681811, 5438040 и 5359030, полные описания которых
25 включены в данное описание посредством ссылки.

7.2.4. Полисорбатные группировки

Модифицирующие группировки могут включать в себя одну или более
30 полисорбатных группировок. Примеры включают в себя сложные эфиры
сорбитана и полиоксиэтиленовые производные полисорбата. Конъюгирование с
использованием полисорбатных группировок описано в патентах США №№
5681811, 5438040 и 5359030, полные описания которых включены в данное
35 описание посредством ссылки.

7.2.5. Биосовместимые водорастворимые поликатионные группировки

В некоторых воплощениях могут быть использованы биосовместимые
40 водорастворимые поликатионные полимеры. Биосовместимые
водорастворимые поликатионные полимеры включают в себя, например,
любую модифицирующую группировку, содержащую протонированные
гетероциклы, присоединенные в виде концевых групп. "Водорастворимый" в
45 данном контексте означает, что вся модифицирующая группировка
растворяется в водных растворах, таких как забуференный физиологический
раствор или забуференный физиологический раствор с небольшими
50

количествами добавленных органических растворителей в качестве соразтворителей, при температуре от 20 до 37°C. В некоторых воплощениях модифицирующая группировка сама по себе не является достаточно растворимой в водных растворителях, но становится растворимой в результате прививки водорастворимыми полимерами, такими как PEG-цепи. Примеры включают в себя полиамины, имеющие аминогруппы либо на основной цепи модифицирующей группировки, либо на боковых цепях модифицирующей группировки, такие как поли-L-Lys и другие положительно заряженные полиаминокислоты из природных или синтетических аминокислот или смесей аминокислот, включая поли(D-Lys), поли(орнитин), поли(Arg) и поли(гистидин), и непептидные полиамины, такие как поли(аминостирол), поли(аминоакрилат), поли(N-метиламиноакрилат), поли(N-этиламиноакрилат), поли(N,N-диметиламиноакрилат), поли(N,N-диэтиламиноакрилат), поли(аминометакрилат), поли(N-метиламинометакрилат), поли(N-этиламинометакрилат), поли(N,N-диметиламинометакрилат), поли(N,N-диэтиламинометакрилат), поли(этиленимин), полимеры четвертичных аминов, такие как поли(N,N,N-триметиламиноакрилатхлорид), поли(метилакриламидопропилтриметиламмонийхлорид), и природные или синтетические полисахариды, такие как хитозан.

7.2.6. Другие гидрофильные группировки

Модифицирующие группировки могут включать в себя также другие гидрофильные полимеры. Примеры включают в себя поли(оксиэтилированные полиолы), такие как поли(оксиэтилированный глицерин), поли(оксиэтилированный сорбит) и поли(оксиэтилированная глюкоза); поливиниловый спирт ("PVA"); декстран; полимеры на основе углеводов и тому подобное. Данные полимеры могут представлять собой гомополимеры, или статистические или блок-сополимеры и тройные сополимеры на основе мономеров вышеуказанных полимеров, с линейной цепью или разветвленные.

Конкретные примеры подходящих дополнительных полимеров включают в себя поли(оксазолин), бифункциональный поли(акрилоилморфолин) ("РАсМ") и поли(винилпирролидон) (PVP), но не ограничиваются этим. PVP и поли(оксазолин) представляют собой хорошо известные в данной области техники полимеры, и их получение будет очевидным для специалиста. РАсМ и

его синтез и применение описаны в патенте США № 5629384 и патенте США № 5631322, описания которых во все своей полноте включены в данное описание посредством ссылки.

7.2.7. Биоадгезивные полианионные группировки

Некоторые гидрофильные полимеры, по-видимому, имеют потенциально полезные биоадгезивные свойства. Примеры таких полимеров можно найти, например, в патенте США № 6197346 (Mathiowitz с соавт.). Данные полимеры, содержащие карбоксильные группы (например, полиакриловую кислоту) проявляют биоадгезивные свойства и также могут быть легко конъюгированы с соединениями инсулинами, описанными в данном изобретении. Быстро биodeградируемые полимеры, которые экспонируют карбоновокислотные группы для деградации, такие как поли(лактид-со-гликолид), полиангидриды и полиортоэфиры, также являются биоадгезивными полимерами. Эти полимеры можно использовать для доставки соединений инсулинов в желудочно-кишечный тракт. Так как эти полимеры деградируют, они могут экспонировать карбоновокислотные группы, что дает им возможность прочно прилипнуть к желудочно-кишечному тракту, и могут содействовать доставке конъюгатов соединений инсулинов.

7.2.8. Липофильные группировки

В некоторых воплощениях модифицирующие группировки включают в себя одну или более липофильных группировок. Липофильная группировка может представлять собой различные липофильные группировки, которые, как известно специалистам в данной области, включают в себя алкильные группировки, алкенильные группировки, алкинильные группировки, арильные группировки, арилалкильные группировки, алкиларильные группировки, жирнокислотные группировки, адамантантил и холестерил, а также липофильные полимеры и/или олигомеры, но не ограничиваются этим.

Алкильная группировка может представлять собой насыщенную или ненасыщенную, линейную, разветвленную или циклическую углеводородную цепь. В некоторых воплощениях алкильная группировка имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или более атомов углерода. Примеры включают в себя насыщенные линейные

алкильные группировки, такие как метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил, ундецил, додецил, тридецил, тетрадецил, пентадецил, гексадецил, октадецил, нондецил и эйкозил; насыщенные разветвленные алкильные группировки, такие как изопропил, *втор*-бутил, *трет*-бутил, 2-метилбутил, *трет*-пентил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 2-этилгексил, 2-пропилпентил; и ненасыщенные алкильные группировки, происходящие из вышеуказанных насыщенных алкильных группировок, включая, но не ограничиваясь этим, винил, аллил, 1-бутенил, 2-бутенил, этинил, 1-пропинил и 2-пропинил. В других воплощениях алкильная группировка представляет собой низшую алкильную группировку. В других воплощениях алкильная группировка представляет собой C₁-C₃ низшую алкильную группировку. В некоторых воплощениях модифицирующая группировка конкретно не состоит из алкильной группировки, или конкретно не состоит из низшей алкильной группировки, или конкретно не состоит из алкановой группировки, или конкретно не состоит из низшей алкановой группировки.

Алкильные группы могут быть либо незамещенными, либо замещенными одним или более заместителями, и предпочтительно, чтобы такие заместители не препятствовали способам синтеза конъюгатов и не уничтожали биологическую активность конъюгатов. Потенциально мешающая функциональная группа может быть подходящим образом блокирована защитной группой для того, чтобы сделать данную функциональную группу немешающей. Каждый заместитель возможно может быть замещен дополнительными немешающими заместителями. Термин "немешающий" характеризует заместители, которые не уничтожают возможности осуществления любых реакций в соответствии со способом по данному изобретению.

Липофильная группировка может представлять собой жирнокислотную группировку, такую как природная или синтетическая, насыщенная или ненасыщенная, линейная или разветвленная жирнокислотная группировка. В некоторых воплощениях жирнокислотная группировка содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более атомов углерода. В некоторых воплощениях модифицирующая группировка конкретно

не состоит из жирнокислотной группировки; или конкретно не состоит из жирнокислотной группировки, содержащей 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более атомов углерода.

Когда модифицирующая группировка включает в себя арильное кольцо, тогда данное кольцо может быть функционализировано нуклеофильной функциональной группой (такой как OH или SH), которая расположена так, что она может вступать во внутримолекулярное взаимодействие с карбаматной группировкой и способствовать ее гидролизу. В некоторых воплощениях данная нуклеофильная группа защищена защитной группой, способной гидролизоваться или иным образом деградировать *in vivo*, в результате, когда защитная группа удалена, тогда гидролиз конъюгата и последующее высвобождение исходного соединения инсулина облегчается.

Другие примеры подходящих модифицирующих группировок включают в себя $-\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$; $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})_2$; $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$; $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

7.2.9. Амфифильные группировки

В некоторых воплощениях модифицирующая группировка включает в себя амфифильную группировку. Многие полимеры и олигомеры являются амфифильными. Они часто представляют собой блок-сополимеры, разветвленные сополимеры или привитые сополимеры, которые включают в себя гидрофильные и липофильные группировки, которые могут находиться в форме олигомеров и/или полимеров, таких как линейные, разветвленные или привитые полимеры или сополимеры.

Амфифильные модифицирующие группировки могут включать в себя комбинации любых липофильных и гидрофильных группировок, описанных в данном изобретении. Такие модифицирующие группировки обычно включают в себя по меньшей мере одну реакционноспособную функциональную группу, например галогено, гидроксил, амин, тиол, сульфоновую кислоту, карбоновую кислоту, изоцианат, эпокси, сложный эфир и тому подобное, которые часто находятся на терминальном конце модифицирующей группировки. Эти реакционноспособные функциональные группы могут быть использованы для присоединения липофильной алкильной, алкенильной, алкинильной, арилалкильной или алкиларильной группы с линейной или разветвленной цепью или липофильного полимера или олигомера, что увеличивает

липофильность модифицирующей группировки (и тем самым делает ее обычно амфифильной). Липофильные группы могут быть производными, например, моно- или дикарбоновых кислот или, когда это целесообразно, реакционноспособными эквивалентами карбоновых кислот, такими как ангидриды или хлорангидриды. Примерами подходящих предшественников липофильных групп являются уксусная кислота, пропионовая кислота, масляная кислота, валериановая кислота, изомасляная кислота, триметилуксусная кислота, капроновая кислота, каприловая кислота, гептановая кислота, каприновая кислота, пеларгоновая кислота, лауриновая кислота, миристиновая кислота, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота, бегеновая кислота, лигноцериновая кислота, цератиновая кислота, монтановая кислота, изостеариновая кислота, изононановая кислота, 2-этилгексановая кислота, олеиновая кислота, рицинолеиновая кислота, линолевая кислота, линоленовая кислота, эруковая кислота, жирная кислота сои, жирная кислота льна, жирная кислота дегидратированного касторового масла, жирная кислота таллового масла, жирная кислота тунгового масла, жирная кислота подсолнечника, жирная кислота сафлора, акриловая кислота, метакриловая кислота, малеиновый ангидрид ортофталевого ангидрид, терефталевая кислота, изофталева кислота, адипиновая кислота, азелаиновая кислота, себациновая кислота, тетрагидрофталевого ангидрид, гексагидрофталевого ангидрид, янтарная кислота и полиолефиновые карбоновые кислоты.

Концевые липофильные группы не обязательно должны быть эквивалентными, т.е. полученные сополимеры могут включать концевые липофильные группы, которые являются одинаковыми или разными. Липофильные группы могут быть производными более чем одной моно- или бифункциональной алкильной, алкенильной, алкинильной, циклоалкильной, арилалкильной или алкиларильной группы, как определено выше.

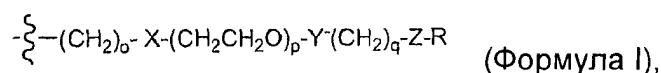
7.2.10. PAG-алкильные модифицирующие группировки

Модифицирующая группировка может быть линейной или разветвленной полимерной группировкой, содержащей одну или более линейных или разветвленных PAG-группировок и/или одну или более линейных или разветвленных, замещенных или незамещенных алкильных группировок. В некоторых случаях такие группировки считаются амфифильными; однако PAG и

алкильные группировки можно изменять таким образом, чтобы сделать такие группировки более липофильными или более гидрофильными. В некоторых воплощениях модифицирующая группировка конкретно не состоит из алкильной группировки, а в других воплощениях модифицирующая группировка конкретно не состоит из алкановой группировки.

PAG-группировки в некоторых воплощениях включают в себя 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 PAG-субъединиц, организованных в линейную или разветвленную форму. PAG-группировки в некоторых воплощениях включают в себя PEG-, PPG- и/или PBG-субъединицы. Алкильные группировки в некоторых воплощениях предпочтительно имеют 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 атомов углерода. Предпочтительно, алкильные группировки представляют собой алкановые группировки. Модифицирующая группировка может включать в себя блокирующую группировку, такую как $-\text{OCH}_3$. Кроме того, модифицирующая группировка может включать в себя гидрофобную группу, такую как пивалоильная группа.

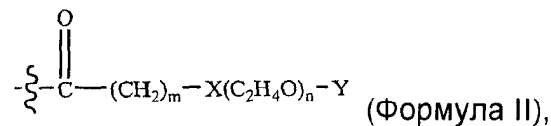
В одном воплощении модифицирующая группировка имеет формулу:



где o , p и q независимо равны 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50, и по меньшей мере одно из o , p и q равно по меньшей мере 2. X, Y и Z независимо выбраны из $-\text{C}-$, $-\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ и $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, и R представляет собой H или алкил, предпочтительно низший алкил, более предпочтительно метил. Переменные o , p и q предпочтительно выбраны таким образом, чтобы получить гидрофильную или амфифильную модифицирующую группировку, и предпочтительно выбраны относительно соединения инсулина таким образом, чтобы получить гидрофильный или амфифильный конъюгат соединения инсулина, предпочтительно моноконъюгат, диконъюгат или триконъюгат. В одном предпочтительном воплощении конъюгата соединения инсулина, который следует использовать для базального поддержания соединения инсулина, o , p и q выбраны таким образом, чтобы получить PAG, который является проксимальным относительно соединения инсулина, и алкильную

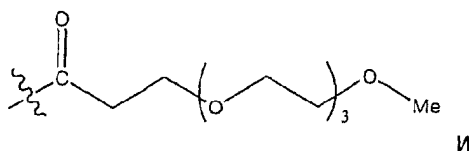
группировку, которая является дистальной относительно соединения инсулина. Альтернативно, O, P и Q могут быть выбраны таким образом, чтобы получить
 5 PAG, который является дистальным относительно соединения инсулина, и алкил, который является проксимальным относительно инсулина. В альтернативном воплощении R представляет собой пивалоильную группу или алкил-пивалоильную группу.

10 В родственном воплощении модифицирующая группировка имеет формулу:

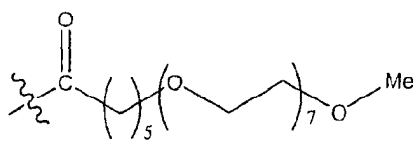


где m равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, и n равно от 2 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более
 20 предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, X представляет собой -C-, -O-, -C(O)-, -NH-, -NHC(O)- или -C(O)NH-, и Y представляет собой низший алкил или -H. X представляет собой предпочтительно O, и Y представляет собой предпочтительно -CH₃. В некоторых случаях карбонильная группа (-C(O)-) может отсутствовать и группировка -(CH₂)- может быть связана с подходящей группой на аминокислоте, такой как гидроксильная группа или свободная
 25 карбоновокислотная группа.

В предпочтительном воплощении модифицирующая группировка имеет структуру, выбранную из следующих:

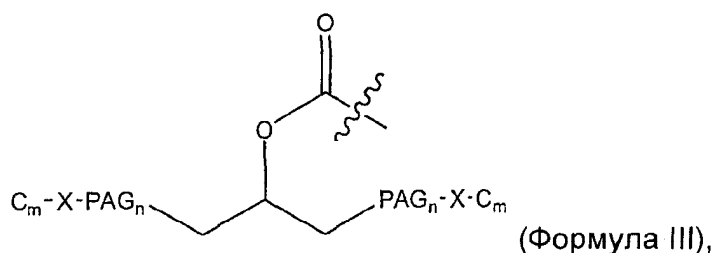


40 (когда непосредственно предшествующая модифицирующая группировка связана с инсулином человека в положении B29, полученный моноконъюгат называется IN105).



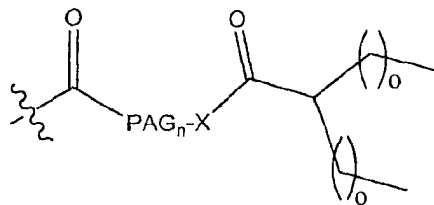
(когда непосредственно предшествующая модифицирующая группировка связана с инсулином человека в положении В29, полученный моноконъюгат называется НМ2). Любая из вышеупомянутых группировок может быть связана, например, с инсулином человека по нуклеофильному остатку, например А1, В1 или В29. В некоторых случаях карбонильная группа (-C(O)-) может отсутствовать или может быть заменена алкильной группировкой, предпочтительно низшей алкильной группировкой, и группировка -(CH₂)- может быть связана с подходящей группой на аминокислоте, такой как гидроксильная группа или свободная карбоновокислотная группа.

В другом воплощении модифицирующая группировка имеет формулу:



где каждый С независимо выбран и представляет собой алкильную группировку, имеющую m атомов углерода, и m равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20; и каждый PAG независимо выбран и представляет собой PAG-группировку, имеющую n субъединиц, и n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25; каждый X независимо выбран и представляет собой связывающую группировку, присоединяющую PAG к С, и представляет собой предпочтительно -С-, -О-, -C(O)-, -NH-, -NHC(O)- или -C(O)NH-. В некоторых воплощениях группировка C_m-X отсутствует, и группировка PAG_n заканчивается группировкой -ОН или группировкой -ОСН₃. Например, PAG может представлять собой PAG с концевой метоксигруппой или концевой гидроксигруппой, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 PAG-субъединиц, включая PEG-, PPG- и/или PBG-субъединицы. В некоторых случаях карбонильная группа (-C(O)-) может быть заменена алкильной группировкой, предпочтительно низшей алкильной группировкой, которая может быть связана с подходящей группой на аминокислоте, такой как гидроксильная группа или свободная карбоновокислотная группа.

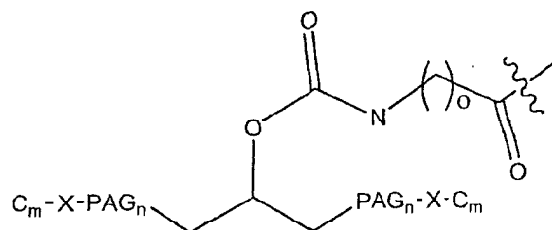
Модифицирующая группировка может, например, иметь формулу:



(Формула IV),

где каждый С независимо выбран и представляет собой алкильную группировку, имеющую m атомов углерода, и m равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20; и каждый PAG независимо выбран и представляет собой PAG-группировку, имеющую n субъединиц, и n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25; X представляет собой -O- или -NH-; каждое o независимо выбрано и равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15. Например, PAG может иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 PAG-субъединиц, включая PEG-, PPG- и/или PBG-субъединицы. В некоторых случаях карбонильная группа (-C(O)-), проксимальная к точке присоединения, может отсутствовать или может быть заменена алкильной группировкой, предпочтительно низшей алкильной группировкой, и группировка -(CH₂)- может быть связана с подходящей группой на аминокислоте, такой как гидроксильная группа или свободная карбоновокислотная группа.

Модифицирующая группировка может, например, иметь формулу:

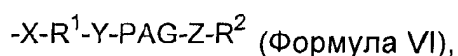


(Формула V),

где каждый С независимо выбран и представляет собой алкильную группировку, имеющую m атомов углерода, и m равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20; и каждый PAG независимо выбран и представляет собой PAG-группировку, имеющую n субъединиц, и n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25; каждый X независимо выбран и представляет собой связывающую группировку, присоединяющую PAG к С, и предпочтительно представляет собой -C-, -O-, -C(O)-, -NH-, -NHС(O)- или -C(O)NH-; каждое o независимо выбрано и равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15. В некоторых воплощениях

5 группировка C_m-X отсутствует и группировка PAG_n содержит концевую группировку $-OH$ или концевую группировку $-OCH_3$. Например, PAG может представлять собой PAG с концевой метоксильной группой или концевой гидроксигруппой, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 PAG -субъединиц, включая PEG -, PPG - и/или PBG -субъединицы. В некоторых случаях карбонильная группа ($-C(O)-$), проксимальная к точке присоединения, может отсутствовать, и группировка $-(CH_2)-$ может быть связана с подходящей группой на аминокислоте, такой как гидроксильная группа или свободная карбоновокислотная группа.

15 В другом воплощении модифицирующая группировка может иметь формулу:



20 где X , Y и Z представляют собой независимо выбранные связывающие группы, и каждая из них возможно присутствует, и X , когда присутствует, связан с соединением инсулином ковалентной связью,

25 по меньшей мере один из R^1 и R^2 присутствует и представляет собой низший алкил, и возможно может включать карбонильную группу,

R^2 представляет собой блокирующую группу, такую как $-CH_3$, $-H$, тозилат, или активирующую группу, и

30 PAG представляет собой линейную или разветвленную углеродную цепь, включающую одну или более алкаленгликолевых группировок (т.е. оксиалкаленовых группировок) и возможно включающую одну или более дополнительных группировок, выбранных из группы, состоящей из $-S-$, $-O-$, $-N-$ и $-C(O)-$, и

35 где максимальное число тяжелых атомов в модифицирующей группировке составляет 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

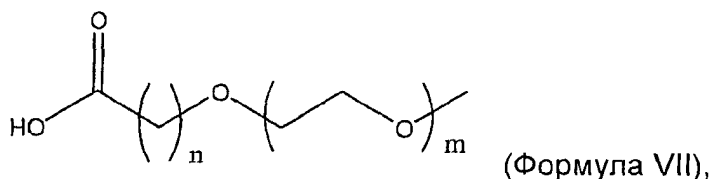
40 В воплощениях изобретения любой один или более из X , Y и Z может отсутствовать. Кроме того, X , Y и/или Z , когда присутствуют, могут быть независимо выбраны из $-C(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-C-$ и $-N-$. В одном воплощении Z представляет собой $-C(O)-$. В другом воплощении Z не присутствует.

В некоторых воплощениях R^1 представляет собой низший алкил, и R^2 не присутствует. В других воплощениях R^2 представляет собой низший алкил, и R^1 не присутствует.

В другом воплощении модифицирующая группировка может включать в себя группировку линейной или разветвленной замещенной углеродной цепи, имеющей основную цепь из 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 атомов, выбранных из группы, состоящей из -C-, -C-, -O-, =O-, -S-, -N-, -Si-. Тяжелые атомы обычно включают в себя один или более атомов углерода и один или более неуглеродных тяжелых атомов, выбранных из группы, состоящей из -O-, -S-, -N- и =O. Атомы углерода и неуглеродные тяжелые атомы обычно присутствуют в соотношении по меньшей мере 1 атом углерода на каждый неуглеродный тяжелый атом, предпочтительно по меньшей мере 2 атома углерода на каждый неуглеродный тяжелый атом, более предпочтительно по меньшей мере 3 атома углерода на каждый неуглеродный тяжелый атом. Атомы углерода и атомы кислорода обычно присутствуют в соотношении по меньшей мере 1 атом углерода на каждый атом кислорода, предпочтительно по меньшей мере 2 атома углерода на каждый атом кислорода, более предпочтительно по меньшей мере 3 атома углерода на каждый атом кислорода. Модифицирующая группировка может включать в себя одну или более блокирующих групп, таких как разветвленный или линейный C_{1-6} , разветвленный или линейный, или карбонил. Модифицирующая группировка обычно включает атомы водорода, и один или более из данных атомов водорода могут быть замещены фтором (который представляет собой тяжелый атом, но не должен рассматриваться тяжелым атомом в вышеупомянутой формуле). Модифицирующая группировка в некоторых случаях может конкретно исключать незамещенные алкильные группировки. Модифицирующая группировка может быть связана, например, с подходящей группой на аминокислоте, такой как аминогруппа, гидроксильная группа или свободная карбоновокислотная группа полипептида, например, с помощью связывающей группы, такой как карбаматная, карбонатная, простая эфирная, сложноэфирная, амидная или вторичная аминная группа, или посредством дисульфидной связи. Молекулы в связывающей группе рассматриваются как часть модифицирующей группировки. В предпочтительном воплощении

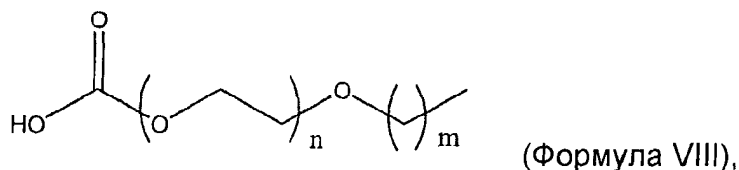
молекулярная масса модифицирующей группировки меньше молекулярной массы модифицирующей группировки Н1М2.

Изобретение включает модифицирующие группировки, имеющие формулу:



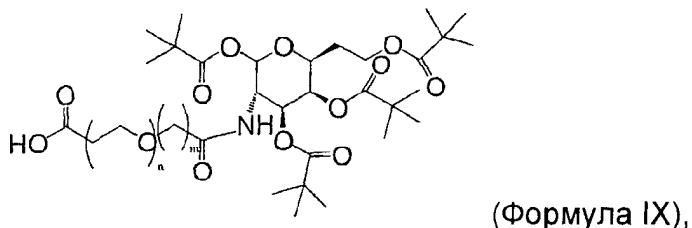
где n равно 1, 2, 3 или 4, и m равно 1, 2, 3, 4 или 5.

Изобретение включает модифицирующие группировки, имеющие формулу:



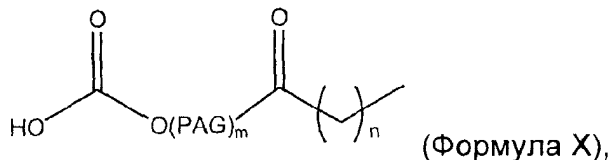
где n равно 1, 2, 3, 4 или 5 и m равно 1, 2, 3 или 4.

Изобретение включает модифицирующие группировки, имеющие формулу:



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

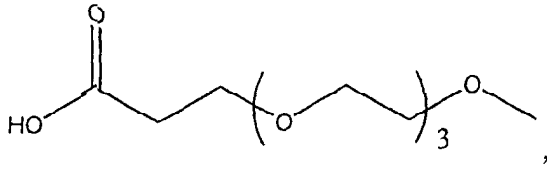
Изобретение также включает модифицирующие группировки, имеющие формулу:



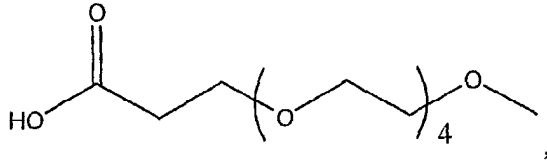
где PAG представляет собой PAG-группировку, имеющую m субъединиц, и m равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, и n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

Другие предпочтительные модифицирующие группировки включают в себя:

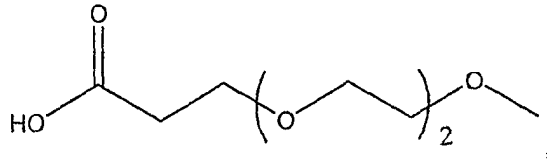
5



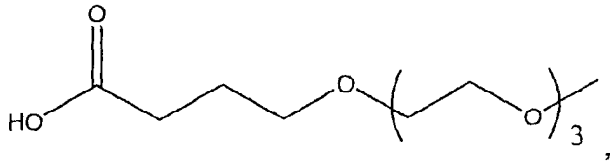
10



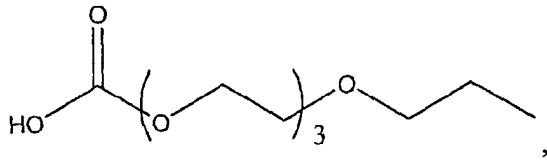
15



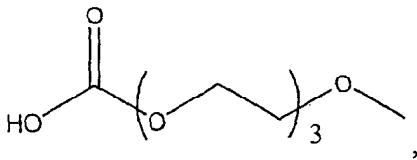
20



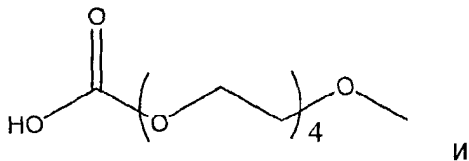
25



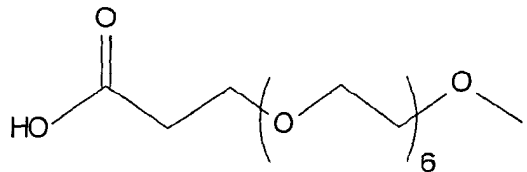
30



35



40

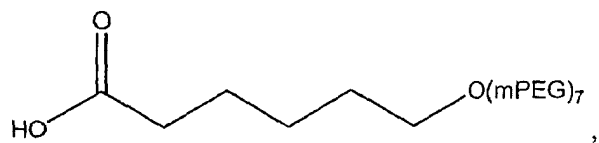


45

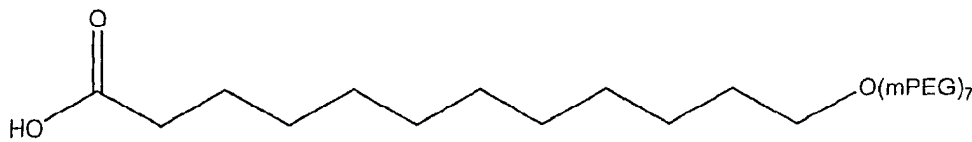
50

Следующие модифицирующие группировки могут быть особенно предпочтительными для применения в схеме замещения базального соединения инсулина.

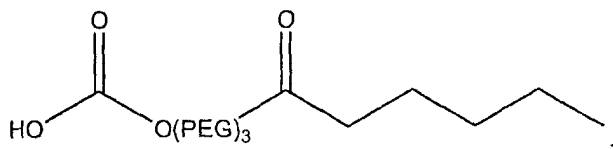
5



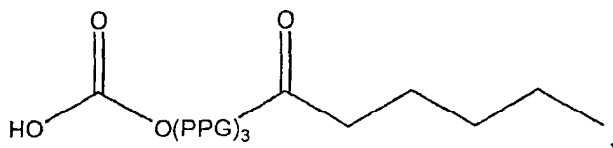
10



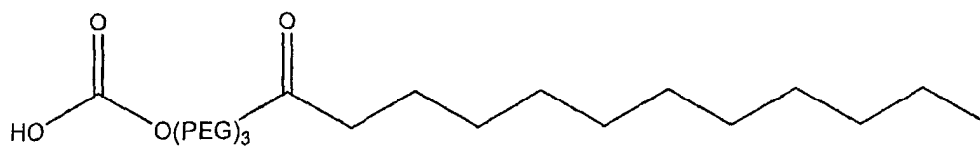
15



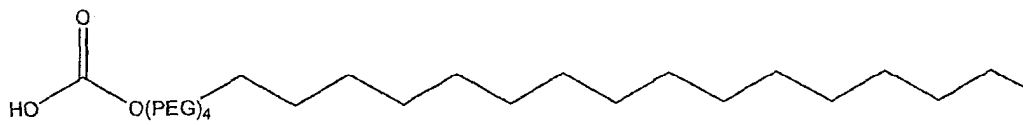
20



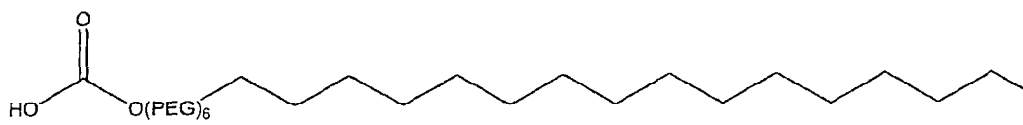
25



30

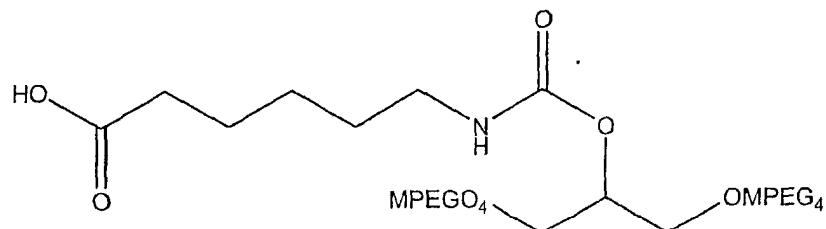


35



40

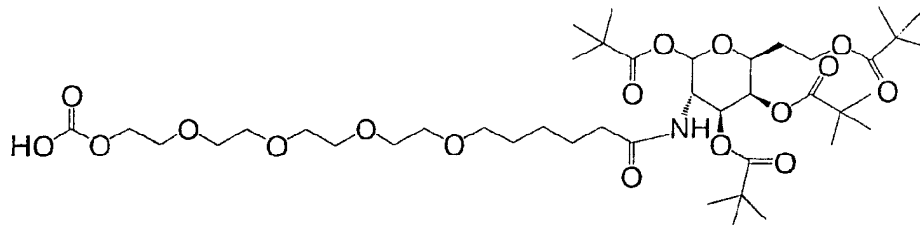
45



50

И

5



Другие модифицирующие группировки включают в себя следующие группировки:

10

15

20

25

30

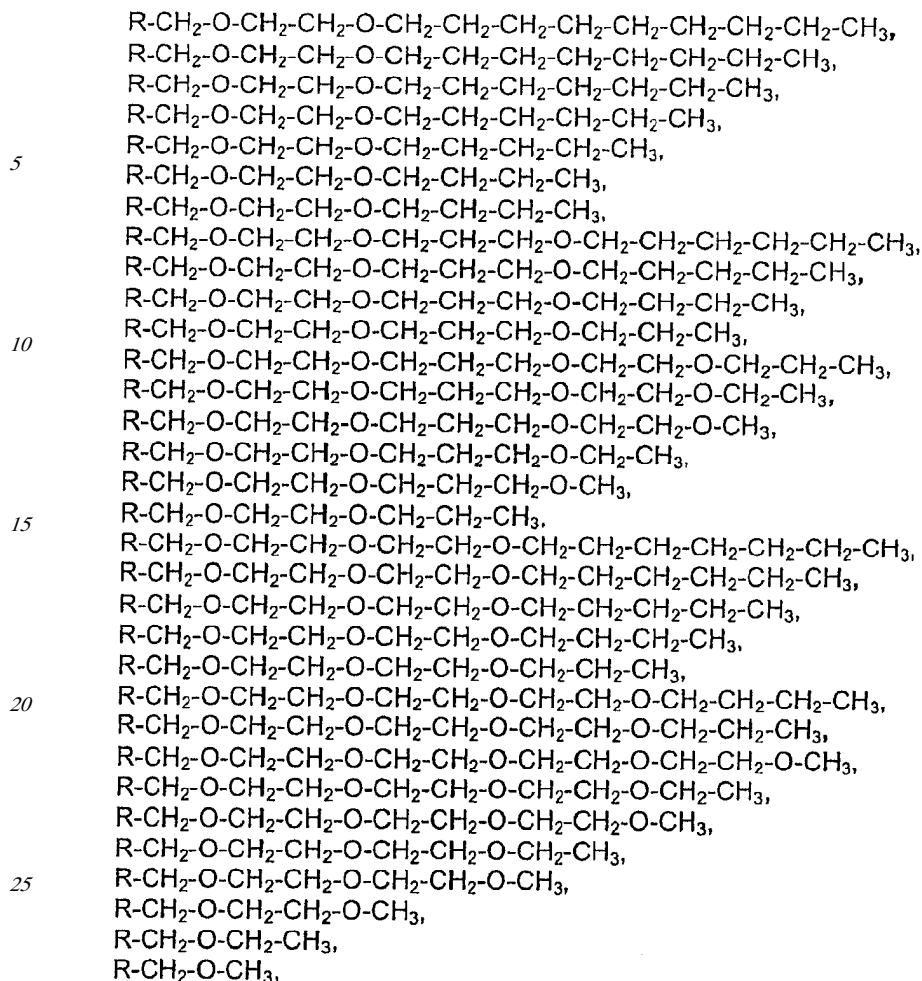
35

40

45

50

- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₃,
- R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₃,



где R представляет собой -H, -OH, -CH₂OH, -CH(OH)₂, -C(O)OH, -CH₂C(O)OH,
 или активирующую группировку, такую как карбодимид, смешанный ангидрид
 или N-гидроксисукцинимид, или блокирующую группу. Изобретение также
 включает такие группировки, присоединенные к белку или пептиду,
 предпочтительно к соединению инсулину. Конкретные стратегии коъюгации
 обсуждаются более подробно ниже. Из этих модифицирующих группировок
 предпочтительными группировками являются такие группировки, которые
 делают соединение инсулин менее липофильным и/или более гидрофильным,
 чем соответствующее неконъюгированное соединение инсулин. Изобретение
 включает такие модифицирующие группировки, дополнительно включающие
 одну или более карбонильных групп, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5
 карбонильных групп; данные карбонильные группы могут быть встроены в
 модифицирующую группировку, или -O- или -CH₂- могут быть заменены
 карбонилем. Дополнительно, любая из группировок -CH₂- или -CH₃ может быть
 замещена, например, низшим алкилом, или -OH, или PAG-целью, имеющей 1,

2, 3, 4 или 5 PAG-субъединиц, которые могут быть одинаковыми или разными. Предпочтительно, R выбран таким образом, что каждый -O- отделен от ближайшего -O- по меньшей мере 2 атомами углерода. В изобретение также включены разветвленные модифицирующие группировки, в которых две или более из группировок присоединены к разветвленной группировке, такой как лизин.

Фармацевтические характеристики, такие как гидрофильность/липофильность конъюгатов согласно воплощениям изобретения, можно изменять, например, путем регулирования липофильной и гидрофильной частей модифицирующей группировки, например, путем увеличения или уменьшения числа PAG-мономеров, типа и длины алкильной цепи, природы PAG-пептидной связи и числа сайтов конъюгирования. Точная природа связи модифицирующей группировки и пептида может быть изменена таким образом, чтобы она стала стабильной и/или чувствительной к гидролизу при физиологическом pH или в плазме. Изобретение также включает любую из вышеупомянутых модифицирующих группировок, связанных с полипептидом, предпочтительно с соединением инсулином. Предпочтительно, модифицирующая группировка делает данный полипептид более растворимым, чем соответствующий неконъюгированный полипептид, например, по меньшей мере в 1,05; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5; 11; 11,5; 12; 12,5; 13; 13,5; 14; 14,5 или 15 раз. Модифицирующая группировка по изобретению может быть связана, например, с соединением инсулином, таким как инсулин человека, в любой подходящей точке присоединения. Предпочтительная точка присоединения представляет собой нуклеофильный остаток, например A1, B1 и/или B29.

Кроме того, следует принимать во внимание, что один из аспектов изобретения включает новые модифицирующие группировки, такие как, но не ограничиваясь этим, группировки Формул VII и VIII, в карбоновокислотной форме. Кроме того, когда модифицирующая группировка включает карбоксильную группу, ее можно превратить в смешанный ангидрид и подвергнуть взаимодействию с аминок группой пептида с образованием конъюгата, содержащего амидную связь. В другом методе карбоксильная группа может быть обработана водорастворимым карбодиимидом и

5 подвергнута взаимодействию с пептидом с образованием конъюгатов, содержащих амидные связи. Следовательно, изобретение включает активированные формы новых группировок, представленных в данном описании, таких как активированные формы модифицирующих группировок Формул VII и VIII, и другие новые олигомеры по изобретению, такие как карбодиимиды, смешанные ангидриды или *N*-гидроксисукцинимиды.

10 В некоторых случаях модифицирующая группировка может быть связана с полипептидом с помощью аминокислоты или последовательности из 2 или более аминокислот, связанных с С-концом или боковой цепью полипептида. Например, в одном воплощении модифицирующая группировка связана с -ОН или -C(O)ОН Thr, и *m*m-модифицированный Thr (*m*m, модифицирующая группировка) связан с полипептидом на карбоксильном конце. Например, в одном воплощении модифицирующая группировка связана с -ОН или -C(O)ОН Thr, и данный модифицированный Thr связан с аминокислотой B29 (например B29 Lys в случае инсулина человека) соединения *des*-Thr-инсулина. В другом примере *m*m связана с -ОН или -C(O)ОН Thr концевого октапептида из В-цепи соединения инсулина, и *m*m-модифицированный октапептид связан с аминокислотой B22 соединения *des*-окта-инсулина. Другие вариации станут очевидны для специалиста в данной области в свете данного описания изобретения.

7.2.11. Солеобразующие группировки

35 В некоторых воплощениях модифицирующая группировка содержит солеобразующую группировку. Солеобразующая группировка может представлять собой различные подходящие солеобразующие группировки, которые, как известно специалистам в данной области, включают в себя карбоксилат и аммоний, но не ограничиваются ими. В некоторых воплощениях, где модифицирующая группировка включает солеобразующую группировку, конъюгат соединения инсулина предложен в форме соли. В этих воплощениях конъюгат соединения инсулина ассоциирован с подходящим фармацевтически приемлемым противоионом, который, как известно специалистам в данной области, включает в себя, но не ограничивается этим, отрицательные ионы, такие как хлоро, бромо, иодо, фосфат, ацетат, карбонат, сульфат, тозилат и

мезилат, или положительные ионы, такие как натрий, калий, кальций, литий и аммоний.

5 Подразумевается, что вышеупомянутые примеры модифицирующих группировок являются иллюстративными и не должны рассматриваться в качестве ограничивающих каким-либо образом. Специалисту в данной области
10 будет понятно, что подходящие группировки для конъюгирования с целью достижения конкретной функциональности, возможно будут ограничены связями химических механизмов конъюгирования, раскрытыми и заявленными в данном описании. Соответственно, дополнительные группировки могут быть
15 выбраны и использованы в соответствии с принципами, раскрытыми в данном описании.

7.3. Стратегии конъюгирования

20 Факторы, такие как степень конъюгирования с модифицирующими группировками, выбор сайтов конъюгирования на молекуле и выбор модифицирующих группировок, можно варьировать для того, чтобы получить конъюгат, который, например, является менее чувствительным к деградации *in vivo* и, соответственно, имеет увеличенный период полураспада в плазме. Например, соединения инсулина могут быть модифицированы таким образом, чтобы включать модифицирующую группировку в одном, двух, трех, четырех,
25 пяти или более сайтах в структуре соединения инсулина в соответствующих сайтах присоединения (т.е. конъюгирования модифицирующей группировки), подходящих для облегчения ассоциации модифицирующей группировки. В качестве примера, такие подходящие сайты конъюгирования могут содержать
30 такие аминокислотные остатки, как аминокислотный остаток лизина.

35 В некоторых воплощениях конъюгаты соединений инсулинов представляют собой моноконъюгаты. В других воплощениях конъюгаты соединений инсулинов представляют собой поликонъюгаты, такие как диконъюгаты, триконъюгаты, тетраконъюгаты, пентаконъюгаты и тому подобное. Количество модифицирующих группировок в соединении инсулине
40 ограничено только количеством сайтов конъюгирования в соединении инсулине. В других воплощениях конъюгаты соединений инсулинов представляют собой смеси моноконъюгатов, диконъюгатов, триконъюгатов, тетраконъюгатов и/или пентаконъюгатов. Предпочтительные стратегии
45
50

конъюгирования представляют собой такие стратегии, которые дают конъюгат, проявляющий некоторую или полную биологическую активность исходного соединения инсулина.

Предпочтительные сайты присоединения включают в себя A1 N-конца, B1 N-конца и лизин B29 боковой цепи. Весьма предпочтительными являются B29 моноконъюгат и B1, B29 диконъюгаты. Другой предпочтительной точкой присоединения является функциональная аминокгруппа на C-пептидном компоненте или лидерном пептидном компоненте соединения инсулина.

С соединением инсулином могут быть связаны одна или более модифицирующих группировок (т.е. одна или множество структур модифицирующих группировок). Модифицирующие группировки в данном множестве предпочтительно являются одинаковыми. Однако необходимо понимать, что модифицирующие группировки в данном множестве могут отличаться друг от друга, или, альтернативно, некоторые из модифицирующих группировок в данном множестве могут быть одинаковыми, а некоторые могут быть разными. Когда с соединением инсулином связано множество модифицирующих группировок, может быть предпочтительно, чтобы одна или более модифицирующих группировок были связаны с соединением инсулином гидролизуемыми связями и одна или более модифицирующих группировок были связаны с соединением инсулином негидролизуемыми связями. Альтернативно, все связи, соединяющие множество модифицирующих группировок с соединением инсулином, могут быть гидролизуемыми, но имеют разную степень гидролизуемости, так что, например, одна или более модифицирующих группировок могут быть относительно быстро удалены из соединения инсулина путем гидролиза в организме, и одна или более модифицирующих группировок удаляются более медленно из соединения инсулина путем гидролиза в организме.

7.3.1. Связывание модифицирующей группировки с соединением инсулином

Модифицирующая группировка предпочтительно ковалентно связана с соединением инсулином. С соединением инсулином может быть ковалентно связано более одной группировки на модифицирующей группировке. В связывании могут быть использованы гидролизуемые или негидролизуемые

связи или комбинации этих двух связей (т.е. разные связи в разных сайтах конъюгирования).

5 В некоторых воплощениях соединение инсулин связано с
модифицирующей группировкой с использованием гидролизуемой связи
(например сложноэфирной, карбонатной или гидролизуемой карбаматной
10 связи). Использование гидролизуемого связывания дает конъюгат соединения
инсулина, который действует как пролекарство. Подход, предполагающий
использование пролекарства, может быть желательным в том случае, когда
15 конъюгат соединения инсулина и модифицирующей группировки является
неактивным (т.е. конъюгат теряет способность воздействовать на организм
через основной механизм действия соединения инсулина), например, когда
сайт конъюгирования модифицирующей группировки находится в связывающей
20 области соединения инсулина. Использование гидролизуемого связывания
также может обеспечить замедленное или контролируемое высвобождение,
введение соединения инсулина в течение заданного периода времени по мере
того, как одна или более модифицирующих группировок отщепляются от
25 соответствующих конъюгатов соединения инсулина и модифицирующей
группировки с получением активного лекарства.

В других воплощениях соединение инсулин связано с модифицирующей
30 группировкой с помощью негидролизуемой связи (например негидролизуемой
карбаматной, амидной или простой эфирной связи). Использование
негидролизуемой связи может быть предпочтительным в том случае, когда
желательно, чтобы терапевтически значимые количества конъюгата
35 соединения инсулина циркулировали в кровяном русле в течение
продолжительного периода времени, например в течение по меньшей мере 2
часов после введения. Связи, используемые для ковалентного связывания
соединения инсулина с модифицирующей группировкой в негидролизуемой
40 форме, обычно выбраны из группы, состоящей из ковалентной(ых) связи(ей),
сложноэфирных группировок, карбонатных группировок, карбаматных
группировок, амидных группировок и вторичных аминных группировок.
45

Модифицирующая группировка может быть связана с соединением
инсулином по разным нуклеофильным остаткам, которые включают в себя
50 нуклеофильные гидроксильные функциональные группы и/или функциональные

аминогруппы, но не ограничиваются этим. Нуклеофильные гидроксильные функциональные группы можно найти, например, в остатках серина и/или тирозина, и нуклеофильные функциональные аминогруппы можно найти, например, в остатках гистидина и/или Lys, и/или на одном или более из N-концов А- или В-цепей соединения инсулина. Когда модифицирующая группировка связана с N-концом натрийуретического пептида, тогда при связывании предпочтительно образуется вторичный амин.

Модифицирующая группировка может быть связана с соединением инсулином по свободной группе -SH, например, путем образования сложной тиозэфирной, простой тиозэфирной или сульфонатной связи.

Модифицирующая группировка может быть связана с соединением инсулином через одну или более аминогрупп. В случае инсулина человека примеры включают в себя аминогруппы в А1, В1 и В29. В одном воплощении одна модифицирующая группировка связана с одиночной аминогруппой в соединении инсулине. В другом воплощении две модифицирующие группировки связаны с разными аминогруппами в соединении инсулине. Когда имеются две модифицирующие группировки, связанные с двумя аминогруппами, предпочтительным расположением является связывание в В1 и В29. Когда имеется несколько полимеров, все данные полимеры могут быть одинаковыми или один или более полимеров могут отличаться от остальных. Различные способы и типы связывания полимеров с соединениями инсулинами описаны в заявке на патент США № 09/873899 под названием "Mixtures of insulin compound conjugates comprising polyalkylene glycol, uses thereof, and methods of making same", поданной 4 июня 2001 г., полное описание которой включено в данное описание посредством ссылки.

В других воплощениях может быть использован подход, предполагающий использование частичного пролекарства, когда гидролизуется часть модифицирующей группировки. Например, смотри патент США № 6309633, Еkwuribe с соавт. (полное описание которого включено в данное описание посредством ссылки), где описаны модифицирующие группировки, имеющие гидрофильные и липофильные компоненты, в которых липофильные компоненты гидролизуются *in vivo* с образованием микропэгиллированного конъюгата.

7.3.2. Выбор модифицирующей группировки и свойства конъюгата соединения инсулина и его комплексов

5 Модифицирующая группировка может быть выбрана таким образом, чтобы получить конъюгат соединения инсулина и его комплексы с желательными свойствами. Предпочтительные модифицирующие группировки
10 выбраны таким образом, чтобы сделать соединение инсулин более растворимым в водном растворе, чем растворимость в воде соединения инсулина в отсутствие модифицирующей группировки, предпочтительно, чтобы оно стало по меньшей мере в 1,05; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6;
15 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5; 11; 11,5; 12; 12,5; 13; 13,5; 14; 14,5 или 15 раз более растворимым в водном растворе, чем исходное соединение инсулин (т.е. соответствующее неконъюгированное соединение инсулин). Например, не находящийся в комплексе нативный инсулин человека имеет растворимость
20 примерно 18 мг/мл при рН приблизительно 7,4. Авторы изобретения неожиданно обнаружили способ получения комплексов конъюгатов инсулина человека, которые являются по меньшей мере в 1,05; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,5; 3;
25 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5; 11; 11,5; 12; 12,5; 13; 13,5; 14; 14,5 или 15 раз более растворимыми, чем инсулин человека.

В некоторых воплощениях модифицирующая группировка выбрана таким
30 образом, чтобы растворимость в воде конъюгата соединения инсулина превышала 1 г/л, 2 г/л, 3 г/л, 4 г/л, 5 г/л, 20 г/л, 50 г/л, 100 г/л или даже 150 г/л при рН, варьирующем от приблизительно 4 до приблизительно 8, предпочтительно при рН, варьирующем от приблизительно 5 до
35 приблизительно 7,5, в идеале при рН приблизительно 7,4.

Конъюгат соединения инсулина может иметь большую пероральную биодоступность в организме млекопитающего, чем приемлемый с научной
40 точки зрения контроль, такой как соответствующее неконъюгированное соединение инсулин. В других воплощениях конъюгат соединения инсулина имеет большую пероральную биодоступность в организме человека, чем приемлемый с научной точки зрения контроль, такой как соответствующее неконъюгированное соединение инсулин. В некоторых воплощениях абсорбция конъюгата соединения инсулина, например, определенная путем измерения
45

50

уровней конъюгата в плазме, по меньшей мере в 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 или 4 раза больше абсорбции контрольного неконъюгированного соединения инсулина.

5 Следует принимать во внимание, что хотя в некоторых аспектах изобретения модифицирующая группировка выбрана таким образом, чтобы
10 сделать конъюгат соединения инсулина более растворимым, чем соответствующее неконъюгированное соединение инсулин, в других аспектах модифицирующая группировка также, или альтернативно, может быть выбрана
15 таким образом, чтобы сделать конъюгат соединения инсулина таким же или более гидрофильным, чем соответствующее неконъюгированное соединение инсулин. Кроме того, модифицирующая группировка может быть выбрана таким образом, чтобы сделать конъюгат соединения инсулина более амфифильным, чем соответствующее неконъюгированное соединение инсулин.

20 В некоторых воплощениях комплекс конъюгата соединения инсулина с катионом является таким же или более водорастворимым, чем (а) соответствующий не находящийся в комплексе конъюгат соединения инсулина,
25 (б) соответствующее не находящееся в комплексе и неконъюгированное соединение инсулин и/или (в) соответствующее находящееся в комплексе, но неконъюгированное соединение инсулин.

30 В предпочтительном воплощении растворимость в воде конъюгата соединения инсулина уменьшена путем добавления Zn^{++} . В некоторых воплощениях модифицирующая группировка выбрана таким образом, чтобы сделать конъюгат соединения инсулина таким же или более растворимым, чем
35 соответствующее неконъюгированное соединение инсулин, и растворимость в воде конъюгата соединения инсулина уменьшена путем добавления цинка. В других воплощениях модифицирующая группировка выбрана таким образом, чтобы сделать конъюгат соединения инсулина таким же или более
40 растворимым, чем соответствующее неконъюгированное соединение инсулин, растворимость в воде конъюгата соединения инсулина уменьшена путем добавления цинка, и растворимость в воде катионного комплекса выше растворимости в воде соединения инсулина. В другом аспекте конъюгат
45 соединения инсулина представляет собой соединение инсулин, ацилированное жирной кислотой, катион представляет собой цинк, и растворимость в воде конъюгата соединения инсулина уменьшена путем добавления цинка. В еще
50

5
одном воплощении конъюгат соединения инсулина представляет собой
соединение инсулин, ацилированное жирной кислотой, которое является таким
же или более водорастворимым, чем соответствующее неконъюгированное
соединение инсулин, катион представляет собой цинк, и растворимость в воде
конъюгата соединения инсулина уменьшена путем добавления цинка.

10
В некоторых предпочтительных воплощениях липофильность конъюгата
соединения инсулина относительно соответствующего исходного соединения
инсулина равна 1 или меньше 1. Относительная липофильность конъюгата
соединения инсулина ($k_{отн}$) по сравнению с соответствующим исходным
15
соединением инсулином может быть определена, например, следующим
образом: $k_{отн} = (t_{конъюгат} - t_0)/(t_{человек} - t_0)$, где относительную липофильность
измеряют на колонке LiChroSorb RP18 (5 мкм, 250 X 4 мм) для
высокоэффективной жидкостной хроматографии путем изократической элюции
20
при 40°C. В качестве элюентов могут быть использованы следующие смеси: 0,1
М натрий-фосфатный буфер, pH 7,3, содержащий 10% ацетонитрила и 50%
ацетонитрила в воде. "Мертвый" объем (t_0) определяют путем введения 0,1 мМ
нитрата натрия. Время удерживания для инсулина человека довели до по
25
меньшей мере $2t_0$ путем варьирования соотношения между смесями (в)(1) и
(в)(2). Предпочтительно, в этих воплощениях относительная липофильность
приблизительно равна 1 или меньше 1, или по существу меньше 1. В
30
предпочтительном воплощении соединение инсулин представляет собой
инсулин человека, и относительная липофильность меньше 1.
Предпочтительно относительная липофильность меньше приблизительно 0,99;
35
0,98; 0,97; 0,96; 0,95; 0,94; 0,93; 0,92; 0,91 или 0,90. Обсуждение методов
определения растворимости и/или липофильности инсулина и конъюгатов
инсулина приведено в патенте США № 5750499 под названием "Acylated
40
insulin", опубликованном Harelund с соавт. 12 мая 1998, полное описание
которого включено в данное описание посредством ссылки.

45
В одном воплощении относительная липофильность является такой, как
описано выше, и модифицирующая группировка представляет собой
углеродную цепь, имеющую 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18
атомов углерода, причем данная углеродная цепь содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
или 10 встроенных в нее оксигрупп. В другом воплощении относительная
50

липофильность является такой, как описано выше, и модифицирующая группировка представляет собой углеродную цепь, имеющую 5, 6, 7, 8, 9 или 10 атомов углерода, причем данная углеродная цепь содержит 2, 3 или 4 встроенных в нее оксигруппы. В родственном воплощении относительная липофильность является такой, как описано выше, и модифицирующая группировка содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 полиалкаленгликолевых структурных единиц. В другом родственном воплощении относительная липофильность является такой, как описано выше, и модифицирующая группировка содержит 1, 2 или 3 полиэтиленгликолевые структурные единицы и 1, 2 или 3 полипропиленгликолевые структурные единицы.

7.4. Компонент, представляющий собой катион металла, и характеристики комплексов

Комплексы конъюгатов соединений инсулинов с катионами включают катион металла. Подходящие катионы металлов для использования в качестве катионного компонента включают в себя любой катион металла, способный к комплексообразованию, агрегированию или кристаллизации с конъюгатом соединения инсулина. Предпочтительно, чтобы катион металла образовывал комплекс с конъюгатом соединения инсулина. Может быть использован один или несколько катионов. Предпочтительно, катион не является существенным окислителем для конъюгата соединения инсулина, т.е. не является окислителем в такой степени, чтобы сделать комплексы непригодными для заданной цели.

В некоторых воплощениях катион металла является биосовместимым. Катион металла является биосовместимым, если данный катион не оказывает слишком значительных вредных воздействий на организм реципиента, таких как значительная иммунологическая реакция в месте инъекции. Однако следует принимать во внимание, что в некоторых обстоятельствах риск токсичности и другие вредные воздействия могут быть компенсированы общей пользой от композиции конъюгата соединения инсулина с катионом и поэтому могут быть приемлемыми при таких обстоятельствах.

Пригодность катионов металлов для стабилизации биологически активных агентов и отношение катиона металла к необходимому биологически активному агенту могут быть определены средним специалистом в данной

области путем выполнения ряда тестов на стабильность, таких как электрофорез в полиакриламидном геле, изоэлектрофокусирование, обращенно-фазная хроматография и ВЭЖХ-анализ (анализ с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии) на частицы биологически активных агентов, стабилизированных катионом металла, до и после уменьшения размера частиц и/или инкапсулирования.

Компонент, представляющий собой катион металла, включает соответственно один или более одновалентных, двухвалентных или трехвалентных катионов металлов или их комбинации. В предпочтительном воплощении катион металла представляет собой катион металла группы II или катион переходного металла. Примеры подходящих двухвалентных катионов включают в себя Zn^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , Fe^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} , Co^{++} и/или Mg^{++} . Когда включен одновалентный катион, тогда он представляет собой предпочтительно Na^{+} , Li^{+} или K^{+} . Катион добавляют предпочтительно в виде соли, такой как хлоридная или ацетатная соль, наиболее предпочтительными являются $ZnCl_2$ и $ZnAc$.

Молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону обычно составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:100, предпочтительно от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:12, и более предпочтительно от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:7, или составляет приблизительно 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 или 1:7. В конкретном воплощении в качестве катионного компонента используют Zn^{++} , он присутствует в молярном отношении компонента, представляющего собой катион цинк, к конъюгату соединения инсулина, составляющем от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:100, предпочтительно составляющем от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:12, и более предпочтительно от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:7, или составляющем приблизительно 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 или 1:7.

Предпочтительно, катионный компонент состоит более чем на приблизительно 90% из одного катиона, такого как Zn^{++} . Предпочтительно, данный катион представляет собой более чем приблизительно 95%, 99% или 99,9% Zn^{++} .

Предпочтительно, устойчивость к расщеплению химотрипсином находящегося в комплексе конъюгата соединения инсулина выше, чем

устойчивость к расщеплению химотрипсином соответствующего *не находящегося в комплексе* конъюгата соединения инсулина. Предпочтительно, устойчивость к расщеплению химотрипсином находящегося в комплексе конъюгата соединения инсулина выше, чем устойчивость к расщеплению химотрипсином соответствующего *находящегося в комплексе, но неконъюгированного* соединения инсулина,.

Находящийся в комплексе конъюгат соединения инсулина может иметь большую пероральную биодоступность в организме млекопитающего, чем приемлемый с научной точки зрения контроль, такой как соответствующий *не находящийся в комплексе* конъюгат соединения инсулина. В других воплощениях находящийся в комплексе конъюгат соединения инсулина имеет большую пероральную биодоступность в организме человека, чем приемлемый с научной точки зрения контроль, такой как соответствующий *не находящийся в комплексе* конъюгат соединения инсулина. В некоторых воплощениях абсорбция находящегося в комплексе конъюгата соединения инсулина, например, как определено уровнями данного конъюгата в плазме, по меньшей мере в 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 или 4 раза больше абсорбции *не находящегося в комплексе* конъюгата соединения инсулина.

Находящийся в комплексе конъюгат соединения инсулина может иметь большую пероральную биодоступность в организме млекопитающего, чем приемлемый с научной точки зрения контроль, такой как соответствующее *находящееся в комплексе, но неконъюгированное* соединение инсулин. В других воплощениях находящийся в комплексе конъюгат соединения инсулина имеет большую пероральную биодоступность в организме человека, чем приемлемый с научной точки зрения контроль, такой как соответствующее *находящееся в комплексе, но неконъюгированное* соединение инсулин. В некоторых воплощениях абсорбция находящегося в комплексе соединения инсулина, например, как определено уровнями данного конъюгата в плазме, по меньшей мере в 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 или 4 раза больше абсорбции *находящегося в комплексе, но неконъюгированного* соединения инсулина.

7.5. Комплексообразующие агенты

В некоторых воплощениях композиции конъюгата соединения инсулина с катионом включают один или более комплексообразующих агентов. Примеры

5 комплексообразующих агентов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают в себя протамины, сурфен, глобиновые белки, спермин, спермидин, альбумин, аминокислоты, карбоновые кислоты, соединения поликатионных полимеров, катионные полипептиды, анионные полипептиды, нуклеотиды и антисмысловые последовательности. Смотри Brange, J., Galenics of Insulin compound, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1987), полное описание которого включено в данное описание посредством ссылки. В свете описания настоящего изобретения пригодность комплексообразующих агентов для стабилизации данных композиций может быть определена средним специалистом в данной области. В некоторых воплощениях композиции конъюгата соединения инсулина с катионом конкретно исключают комплексообразующий агент или по существу лишены комплексообразующего агента.

20 Предпочтительным комплексообразующим агентом является протамин. В твердой форме протамин обычно присутствует в молярном отношении соединения инсулина к протамину, предпочтительно составляющем от 25 приблизительно 3:1 до приблизительно 1:3, более предпочтительно от приблизительно 2:1 до приблизительно 1:2, в идеале в молярном отношении приблизительно 1:1. В некоторых воплощениях композиции конъюгата соединения инсулина с катионом конкретно исключают протамин или по существу лишены протамин.

35 В качестве комплексообразующих агентов могут быть использованы также аминокислоты, например глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, фенил аланин, пролин, триптофан, аспарагин, глутаминовая кислота и гистидин, и олигопептиды, такие как диглицин.

40 Карбоновые кислоты также подходят для применения в качестве комплексообразующих агентов; примеры включают в себя уксусную кислоту и оксикарбоновые кислоты, так как лимонная кислота, 3-гидроксимасляная кислота и молочная кислота.

45 **7.6. Стабилизирующие агенты**

В некоторых воплощениях композиции конъюгатов соединений инсулинов с катионами содержат один или более стабилизирующих агентов. Предпочтительные стабилизирующие агенты включают в себя фенольные

50

соединения и ароматические соединения. Предпочтительными фенольными соединениями являются фенол, *мета*-крезол и *мета*-парабен или их смеси. Стабилизирующий агент может присутствовать в любом количестве, которое улучшает стабильность композиций конъюгатов соединений инсулинов с катионами относительно приемлемого с научной точки зрения контроля, такого как соответствующая композиция конъюгата соединения инсулина с катионом в отсутствие стабилизирующего агента.

7.7. Представление комплексов

Комплексы могут быть предложены в виде сухого твердого вещества, такого как по существу чистый порошок конъюгата соединения инсулина с катионом или порошок, содержащий твердый конъюгат соединения инсулина с катионом вместе с другими фармацевтически приемлемыми компонентами. Комплексы могут быть также предложены в растворенном состоянии в водной или органической среде и/или в виде нерастворимых твердых веществ в таких средах.

7.7.1. Твердые композиции

Комплекс конъюгата соединения инсулина с катионом может быть предложен в виде твердого вещества. Данное твердое вещество может находиться, например, в высушенном состоянии или в нерастворенном состоянии в водном растворе, органическом растворителе, эмульсии, микроэмульсии или в другой невысушенной форме.

В одном воплощении комплекс конъюгата соединения инсулина с катионом предложен в виде чистой обработанной твердой композиции. В чистой обработанной твердой композиции молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону обычно составляет от приблизительно 3:4 до приблизительно 3:0,5 (конъюгат соединения инсулин : катион), от приблизительно 3:3,5 до приблизительно 3:1 или в идеале приблизительно 3:1.

В обработанной чистой твердой композиции Т-типа (с катионом, конъюгатом соединения инсулина и без протамина) молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону обычно составляет от приблизительно 3:4 до приблизительно 3:0,5 (конъюгат соединения инсулин : катион), от приблизительно 3:3,5 до приблизительно 3:1 или в идеале приблизительно 3:1. В обработанной чистой твердой композиции Т-типа с

5 протамином (с катионом, конъюгатом соединения инсулина и протамином) молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону обычно составляет от приблизительно 3:6 до приблизительно 3:0,5 (конъюгат соединения инсулин : катион), от приблизительно 3:5 до приблизительно 3:1 или в идеале приблизительно 3:2.

10 В обработанной чистой твердой композиции R-типа (lente) (с катионом, соединением инсулином и стабилизирующим соединением (например с фенольным соединением) и без протамина) молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону обычно может варьировать от приблизительно 3:4,5 до приблизительно 3:0,9, предпочтительно от приблизительно 3:3,9 до приблизительно 3:2,4. В обработанной чистой твердой композиции R-типа (ultralente) (с катионом, соединением инсулином и стабилизирующим соединением (например с фенольным соединением) и без протамина),
20 молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону обычно может варьировать от приблизительно 3:12 до больше чем приблизительно 3:4,5, предпочтительно от приблизительно 3:9 до приблизительно 3:4,8, более предпочтительно от приблизительно 3:6 до приблизительно 3:5,4. В обработанной чистой твердой композиции R-типа с протамином (с катионом, соединением инсулином и стабилизирующим соединением (например с фенольным соединением) и протамином) молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону обычно может варьировать от приблизительно 3:12 до приблизительно 3:3, предпочтительно от приблизительно 3:9 до приблизительно 3:4,5, более предпочтительно от приблизительно 3:6,9 до приблизительно 3:5,4.

40 В случае одновалентного катиона, такого как Na^+ , как следовало ожидать, отношение конъюгата соединения инсулина к катиону в твердом веществе составляет от приблизительно 3:6 до приблизительно 3:3.

45 Твердые композиции по изобретению могут включать в себя, например, такие композиции, как порошки, содержащие конъюгаты соединений инсулинов и/или комплексы конъюгатов соединений инсулинов с катионами по изобретению. Предпочтительно, данные твердые композиции имеют фармацевтически приемлемый уровень чистоты, т.е. свободны от примесей,

50

которые неприемлемо снижали бы пригодность композиций для использования людьми.

5 В некоторых воплощениях предложены композиции, в которых компонент, представляющий собой конъюгат соединения инсулина с катионом, является более чем на приблизительно 90% кристаллическим, предпочтительно более чем на приблизительно 95% кристаллическим, более
10 предпочтительно более чем на приблизительно 99% кристаллическим. В других воплощениях предложены композиции, в которых компонент, представляющий собой конъюгат соединения инсулина с катионом, представляет собой более
15 чем на приблизительно 90% аморфные твердые вещества, предпочтительно более чем на приблизительно 95% аморфные твердые вещества, более предпочтительно более чем на приблизительно 99% аморфные твердые вещества.

20 В других воплощениях предложены композиции, в которых компонент, представляющий собой конъюгат соединения инсулина с катионом, присутствует в смеси аморфных твердых веществ и кристаллических твердых
25 веществ. Например, отношение аморфного твердого вещества к кристаллическому твердому веществу может составлять от приблизительно 1:10 до приблизительно 10:1, или от приблизительно 1:9 до приблизительно
30 9:1, или от приблизительно 1:8 до приблизительно 8:1, или от приблизительно 1:7 до приблизительно 7:1, или от приблизительно 1:6 до приблизительно 6:1, или от приблизительно 1:5 до приблизительно 5:1, или от приблизительно 1:4 до приблизительно 4:1, или от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, или
35 от приблизительно 1:2 до приблизительно 2:1, или приблизительно 1:1.

Кроме того, могут быть предложены композиции, в которых использованы смеси твердых соединений инсулинов с катионами, содержащих разные
40 соединения инсулина, такие как твердое вещество, включающее соединение нативного инсулина, с твердым веществом, включающим конъюгаты соединений инсулинов, или твердые вещества, включающие один конъюгат
45 соединения инсулина с твердым веществом, включающим другой конъюгат соединения инсулина.

Кроме того, тип твердого вещества и компонент, представляющий собой соединение инсулин/конъюгат соединения инсулина, все могут варьировать.
50

Например, могут быть предложены композиции, которые содержат кристаллы соединений Zn-инсулина, где использовано соединение нативного инсулина, и аморфные конъюгаты соединений инсулинов, или могут быть предложены композиции, которые содержат аморфные твердые соединения Zn-инсулина, где использовано соединение нативного инсулина, и кристаллические конъюгаты соединений Zn-инсулина. Такие смеси могут быть использованы для достижения вариаций в физических характеристиках, таких как профиль растворения, и/или вариаций в фармакокинетическом профиле.

Средний размер частиц данных твердых веществ предпочтительно составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 микрон, более предпочтительно 1-50 микрон, еще более предпочтительно 1-25 микрон, в идеале 1-15 микрон. Частицы маленького размера могут быть получены в условиях микрокристаллизации, посредством распылительной сушки, измельчения, сушки в вакууме, сублимационной сушки и тому подобного.

В одном воплощении композиция, когда она высушена, содержит более приблизительно 96% (масс./масс.) конъюгата соединения инсулина и от приблизительно 0,05; 0,1; 0,15 или 0,2 до приблизительно 4% (масс./масс.) цинка. В другом воплощении композиция, когда она высушена, содержит более приблизительно 91% (масс./масс.) конъюгата соединения инсулина, от приблизительно 0,05; 0,1; 0,15 или 0,2 до приблизительно 4% (масс./масс.) цинка и от приблизительно 0,2 до приблизительно 5% (масс./масс.) фенола. В еще одном воплощении композиция, когда она высушена, содержит более приблизительно 82% (масс./масс.) конъюгата соединения инсулина, от приблизительно 0,05; 0,1; 0,15 или 0,2 до приблизительно 4% (масс./масс.) цинка, от приблизительно 0,2 до приблизительно 14% (масс./масс.) протамина. В еще одном воплощении композиция, когда она высушена, содержит более приблизительно 71% (масс./масс.) конъюгата соединения инсулина, от приблизительно 0,05; 0,1; 0,15 или 0,2 до приблизительно 4% (масс./масс.) цинка, от приблизительно 0,2 до приблизительно 14 % (масс./масс.) протамина и от приблизительно 0,2 до приблизительно 15% (масс./масс.) фенола.

В другом воплощении композиция, когда она высушена, содержит от приблизительно 0,1 до приблизительно 2% (масс./масс.) Zn^{++} и от приблизительно 0,08 до приблизительно 1% (масс./масс.) фенола,

предпочтительно от приблизительно 0,5 до приблизительно 1,3% (масс./масс.) Zn^{++} и от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,7% (масс./масс.) фенола, более предпочтительно от более или равно 1 до приблизительно 3,5% (масс./масс.) Zn^{++} и от приблизительно 0,1 до приблизительно 3% (масс./масс.) фенола, и еще более предпочтительно от более или равно 1,3 до приблизительно 2,2% (масс./масс.) Zn^{++} и от приблизительно 0,4 до приблизительно 2% (масс./масс.) фенола.

Данные комплексы могут быть предложены в препарате lente-типа. Например, в предпочтительном высушенном препарате lente-типа Zn присутствует в количестве, варьирующем от приблизительно 0,1 до приблизительно 2% (масс./масс.), и фенол присутствует в количестве, варьирующем от приблизительно 0,08 до приблизительно 1% (масс./масс.), остальные % (масс./масс.) приходятся на долю конъюгата соединения инсулина. В идеале, в случае высушенного препарата lente-типа, Zn присутствует в количестве, варьирующем от приблизительно 0,5 до приблизительно 1,3% (масс./масс.), и фенол присутствует в количестве, варьирующем от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,7% (масс./масс.), остальные % (масс./масс.) приходятся на долю конъюгата соединения инсулина.

Комплексы могут быть предложены в препарате ultralente-типа. Например, в предпочтительном высушенном препарате ultralente-типа Zn присутствует в количестве, варьирующем от более или равно 1 до приблизительно 3,5% (масс./масс.), и фенол присутствует в количестве, варьирующем от приблизительно 0,1 до приблизительно 3% (масс./масс.), остальные % (масс./масс.) приходятся на долю конъюгата соединения инсулина. В идеале, в случае высушенного препарата ultralente-типа, Zn присутствует в количестве, варьирующем от более или равно 1,3 до приблизительно 2,2% (масс./масс.), и фенол присутствует в количестве, варьирующем от приблизительно 0,4 до приблизительно 2% (масс./масс.), остальные % (масс./масс.) приходятся на долю конъюгата соединения инсулина.

7.7.2. Жидкие композиции

Комплексы конъюгатов соединений инсулинов с катионами могут быть предложены в виде нерастворимых компонентов жидкости. Например, жидкость может представлять собой водный раствор, содержащий конъюгат соединения инсулина с катионом в виде осадка, или конъюгат соединения инсулина с катионом может быть предложен в виде компонента суспензии, эмульсии или микроэмульсии. Вместе с нерастворимыми компонентами жидкость может содержать также растворимые компоненты или комплексы.

7.7.3. Смеси и сокристаллы

Композиции по изобретению могут содержать, например, смеси комплексов, смеси твердых веществ, гибридные комплексы и сокристаллы.

Соответственно, в изобретении предложены композиции, которые содержат, например, два или более конъюгатов соединений инсулинов и/или неконъюгированных соединений инсулинов. Кроме того, когда композиции содержат твердые вещества, тогда данные твердые вещества могут иметь различные формы. Так, например, одно твердое вещество может быть кристаллическим, а другое твердое вещество может представлять собой аморфное твердое вещество. Как указано в другом месте, твердые вещества могут быть предложены в высушенной форме или могут быть предложены в виде твердых компонентов жидкой смеси. В предпочтительном воплощении смесь по изобретению содержит два или более разных конъюгатов соединений инсулинов, и эти разные конъюгаты соединений инсулинов имеют разные растворимости. В одном воплощении один из комплексов включает липофильный конъюгат соединения инсулина, а другой включает гидрофильный конъюгат соединения инсулина. В еще одном воплощении комплексы могут включать разные конъюгаты соединений инсулинов, где один или более комплексов имеют период полувыведения из кровотока от приблизительно 1 до приблизительно 4 часов, и один или более комплексов имеют период полувыведения из кровотока, который значительно больше периода полувыведения из кровотока первого комплекса. В родственном воплощении один из комплексов имеет профиль быстрого действия, а другой из комплексов имеет профиль от среднего до длительного действия. Кроме того, один из комплексов может иметь профиль, подходящий для базального

5 контроля соединения инсулина, в то время как другой имеет профиль, подходящий для постпрандиального контроля глюкозы. Предпочтительными
10 смесями являются смеси Н1М2 и инсулина, смеси Н1М2 и IN105, смеси IN105 и соединения инсулина, смеси IN105 и инсулина, ацилированного жирной
15 кислотой, смеси Н1М2 и инсулина, ацилированного жирной кислотой. Подходящие инсулины, ацилированные жирными кислотами, описаны в
20 следующих патентах США, полные описания которых включены в данное описание посредством ссылки: в патенте США № 6531448 под названием
25 "Insoluble compositions for controlling blood glucose", опубликованном 11 марта 2003 г.; патенте США № RE37971 под названием "Selective acylation of epsilon-
30 amino groups", опубликованном 28 января 2003 г.; патенте США № 6465426 под названием "Insoluble insulin compositions", опубликованном 15 октября 2002 г.;
35 патенте США № 6444641 под названием "Fatty acid-acylated insulin analogs", опубликованном 3 сентября 2002 г.; патенте США № 6335316 под названием
40 "Method for administering acylated insulin", опубликованном 1 января 2002 г.; патенте США № 6268335 под названием "Insoluble insulin compositions",
45 опубликованном 31 июля 2001 г.; патенте США № 6051551 под названием "Method for administering acylated insulin", опубликованном 18 апреля 2000 г.;
50 патенте США № 5922675 под названием "Acylated Insulin Analogs", опубликованном 13 июля 1999; патенте США № 5700904 под названием
"Preparation of an acylated protein powder", опубликованном 23 декабря 1997; патенте США № 5693609 под названием "Acylated insulin analogs Granted",
опубликованном 2 декабря 1997; патенте США № 5646242 под названием "Selective acylation of epsilon-amino groups", опубликованном 08 июля 1997;
патенте США № 5631347 под названием "Reducing gelation of a fatty acid-acylated protein", опубликованном 20 мая 1997; патенте США № 6451974 под
названием "Method of acylating peptides and novel acylating agents", опубликованном 17 сентября 2002 г.; патенте США № 6011007 под названием
"Acylated insulin", опубликованном 4 января 2000 г.; патенте США № 5750497 под названием "Acylated insulin Granted: 12 мая 1998; патенте США № 5905140
под названием "Selective acylation method", опубликованном 18 мая 1999; патенте США № 6620780 под названием "Insulin derivatives", опубликованном 16
сентября 2003 г.; патенте США № 6251856 под названием "Insulin derivatives",

опубликованном 26 июня 2001 г.; патенте США № 6211144 под названием "Stable concentrated insulin preparations for pulmonary delivery", опубликованном 3 апреля 2001 г.; патенте США № 6310038 под названием "Pulmonary insulin crystals", опубликованном 30 октября 2001 г. и патенте США № 6174856 под названием "Stabilized insulin compositions", опубликованном 16 января 2001 г. Особенно предпочтительными являются инсулины, моноацилированные жирными кислотами, содержащие 12-, 13-, 14-, 15- или 16-углеродные жирные кислоты, ковалентно связанные с Lys(B29) инсулина человека.

В одном воплощении в изобретении предложен сокристалл, имеющий два разных соединения инсулина и/или конъюгата соединения инсулина. Предпочтительно, данный сокристалл имеет одну или более следующих характеристик: по существу гомогенное растворение, одну кривую растворения *in vivo* и/или фармакодинамический профиль с одним пиком. Предпочтительными сокристаллами являются сокристаллы HIM2 и инсулина, сокристаллы HIM2 и IN105, сокристаллы IN105 и соединения инсулина.

В одном воплощении сокристалл включает инсулин человека, и сокристаллизация с инсулином человека уменьшает растворимость кристалла относительно растворимости соответствующего кристалла конъюгата соединения инсулина. В другом воплощении сокристалл включает инсулин человека, и сокристаллизация с инсулином человека уменьшает растворимость кристалла относительно растворимости соответствующего кристалла конъюгата соединения инсулина.

В другом воплощении сокристалл включает быстродействующий, быстро выводящийся и/или высокоэффективный конъюгат соединения инсулина и длительно действующий, медленно выводящийся и/или низкоэффективный конъюгат соединения инсулина. Предпочтительно, данный сокристалл имеет PK/PD (фармакокинетический/фармакодинамический) профиль, подходящий для постпрандиального контроля глюкозы или для ночного базального контроля соединения инсулина.

В другом воплощении в изобретении предложены смесь или сокристалл, которые содержат конъюгат соединения инсулина вместе с инсулином человека или лизпроинсулином. Смеси по изобретению могут включать два разных конъюгата соединения инсулина. Смеси могут включать конъюгат

соединения инсулина и неконъюгированное соединение инсулин. Смеси могут включать разные конъюгаты соединений инсулинов вместе с разными соединениями инсулинами.

Кроме того, в изобретении предложены комплексы, включающие два разных конъюгата соединения инсулина и/или конъюгат соединения инсулина и неконъюгированное соединение инсулин. В изобретении предложены гибридные сокристаллы из двух, трех или более разных конъюгатов соединений инсулинов. В изобретении предложен комплекс, включающий конъюгат соединения инсулина вместе с неконъюгированным соединением инсулином. В изобретении предложен сокристалл с двумя или более разными гидрофильными конъюгатами соединений инсулинов; с двумя или более разными гидрофобными конъюгатами соединений инсулинов; с двумя или более разными амфифильными конъюгатами соединений инсулинов; с гидрофильным конъюгатом соединения инсулина и липофильным конъюгатом соединения инсулина; с гидрофильным конъюгатом соединения инсулина и неконъюгированным соединением инсулином; HIM2 вместе с неконъюгированным соединением инсулином; IN105 вместе с неконъюгированным соединением инсулином; HIM2 вместе с IN105; HIM2 вместе с соединением инсулином и IN105; и другие комбинации вышеупомянутых элементов. Как указано в другом месте, данные комплексы могут быть предложены в виде сухих твердых веществ, в виде растворимых комплексов в растворе и/или в виде нерастворимых комплексов в растворе. Различные комбинации могут быть использованы, например, для получения комплекса или сокристалла, имеющего пролонгированный профиль.

7.8. Растворимость комплексов по изобретению

Предпочтительно, растворимость в воде комплекса конъюгата соединения инсулина с катионом при pH приблизительно 7,4 составляет от приблизительно 1/15, 1/14, 1/13, 1/12, 1/11, 1/10, 1/9, 1/8, 1/7, 1/6, 1/5 вплоть до приблизительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или менее 10 раз растворимости в воде растворимости в воде не находящегося в комплексе конъюгата соединения инсулина. Любые комбинации вышеупомянутых верхних или нижних пределов входят в объем изобретения. Однако предпочтительным диапазоном является диапазон от приблизительно 1/15 до менее 5, более предпочтительным - от

приблизительно 1/10 до приблизительно 2, идеальным - от приблизительно 1/10 до менее 0. В особенно неожиданном аспекте изобретения растворимость в воде конъюгата соединения инсулина с катионом в растворе при рН приблизительно 7,4 зачастую по существу меньше растворимости в воде конъюгата соединения инсулина в растворе при рН приблизительно 7,4. Однако следует принимать во внимание, что в некоторых воплощениях растворимость в воде конъюгата соединения инсулина с катионом в растворе при рН приблизительно 7,4 может быть такой же, выше или существенно выше растворимости в воде конъюгата соединения инсулина в растворе при рН приблизительно 7,4.

В одном неожиданном воплощении растворимость в воде комплекса конъюгата соединения инсулина с катионом при рН приблизительно 7,4 по существу меньше растворимости соответствующего не находящегося в комплексе конъюгата соединения инсулина в растворе при рН приблизительно 7,4, и комплекс конъюгата соединения инсулина с катионом остается растворимым в концентрации более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 или 130 г/л в водном растворе в диапазоне рН, начинающемся при приблизительно 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,1 или 6,9 и заканчивающемся при приблизительно 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9; 8; 8,1; 8,2; 8,3; 8,4; 8,5; 8,6; 8,7; 8,8 или 8,9. В еще одном воплощении растворимость в воде комплекса конъюгата соединения инсулина с катионом при рН приблизительно 7,4 по существу меньше растворимости соответствующего конъюгата соединения инсулина в растворе при рН приблизительно 7,4, и комплекс конъюгата соединения инсулина с катионом остается растворимым в концентрации более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 или 130 г/л в водном растворе в диапазоне рН от приблизительно 5,8 до приблизительно 8,5, предпочтительно в диапазоне рН от приблизительно 6,5 до приблизительно 8, более предпочтительно в диапазоне рН от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,8. **[ВОПРОС: Растворимость, выраженную в г/л, измеряли с использованием массы комплекса или массы конъюгата соединения инсулина?]**

Предпочтительно, конъюгаты соединений инсулинов по изобретению
выбраны таким образом, чтобы получать кристаллы в водном растворе при
значении рН, равном $pI \pm$ приблизительно 2,5, где концентрация конъюгата
соединения инсулина составляет от приблизительно 0,5 мг/мл до
приблизительно 50 мг/мл, предпочтительно от приблизительно 5 мг/мл до
приблизительно 30 мг/мл, более предпочтительно от приблизительно 15 мг/мл
до приблизительно 30 мг/мл, и образование кристаллов начинается при
приблизительно 3, 4 или 5% (масс./масс.) катиона относительно конъюгата
соединения инсулина, где катион предпочтительно представляет собой Z^{++} .
Предпочтительно, кристаллы представляют собой моноконъюгат без протамина
в водном растворе при рН, варьирующем от приблизительно 4; 4,1; 4,2; 4,3 или
4,4 до приблизительно 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7 или 5,8; предпочтительно при
рН от приблизительно 4 до менее 6,5, предпочтительно от приблизительно 4 до
менее 5,8, предпочтительно от приблизительно 4,2 до приблизительно 5,5,
более предпочтительно от приблизительно 4,4 до приблизительно 5,2.
Предпочтительно, кристаллы присутствуют для диконъюгата без протамина при
рН от приблизительно 3,5 до менее 5,8, предпочтительно от приблизительно
3,8 до приблизительно 5,5, более предпочтительно от приблизительно 4,0 до
приблизительно 5,2. Предпочтительно, кристаллы присутствуют для
триконъюгата без протамина при рН от приблизительно 3 до менее 5,5,
предпочтительно от приблизительно 3,3 до приблизительно 5, более
предпочтительно от приблизительно 3,8 до приблизительно 4,8.

7.8.1. Комплексы R-типа

Предпочтительно, растворимость в воде Zn-комплекса конъюгата
соединения инсулина R-типа при рН приблизительно 7,4 составляет от
приблизительно 10 до приблизительно 150 г/л, более предпочтительно от
приблизительно 20 до приблизительно 130 г/л, более предпочтительно от
приблизительно 30 до приблизительно 110 г/л, более предпочтительно от
приблизительно 35 до приблизительно 60 г/л.

Предпочтительно, растворимость в воде Zn-комплекса конъюгата
соединения инсулина R-типа с *протамином* при рН приблизительно 7,4
составляет от приблизительно 10 до приблизительно 110 г/л, более

предпочтительно от приблизительно 20 до приблизительно 85 г/л, более предпочтительно от приблизительно 30 до приблизительно 70 г/л.

7.8.2. Комплексы Т-типа

Предпочтительно, растворимость в воде Zn-комплекса конъюгата соединения инсулина Т-типа при рН приблизительно 7,4 составляет от приблизительно 30 до приблизительно 175 г/л, более предпочтительно от приблизительно 50 до приблизительно 160 г/л, более предпочтительно от приблизительно 70 до приблизительно 150 г/л.

Предпочтительно, растворимость в воде Zn-комплекса конъюгата соединения инсулина Т-типа с *протамином* при рН приблизительно 7,4 составляет от приблизительно 10 до приблизительно 150 г/л, более предпочтительно от приблизительно 20 до приблизительно 130 г/л, более предпочтительно от приблизительно 30 до приблизительно 110 г/л, более предпочтительно от приблизительно 35 до приблизительно 60 г/л.

7.8.3. Комплексы NPH-типа

Предпочтительно, растворимость в воде комплекса NPH-типа конъюгата соединения инсулина при рН приблизительно 7,4 составляет от приблизительно 1 до приблизительно 150 г/л, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 120 г/л, еще более предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 90 г/л.

7.9. Фармацевтические свойства

Образование комплекса конъюгата соединения инсулина с катионом обычно приводит к улучшению фармацевтических свойств конъюгата соединения инсулина относительно приемлемого с научной точки зрения контроля, такого как соответствующий не находящийся в комплексе конъюгат соединения инсулина.

В некоторых случаях находящийся в комплексе конъюгат соединения инсулина будет проявлять пролонгированный или иным образом измененный профиль рК относительно приемлемого с научной точки зрения контроля, такого как соответствующий не находящийся в комплексе конъюгат соединения инсулина. В конкретных случаях профиль рК будет демонстрировать лизпро-подобный профиль. Профиль рК может быть определен с помощью стандартных экспериментов *in vivo*, например, на мышах, крысах, собаках и

людях. Приведенные в данном описании анализы по определению характеристик комплексов конъюгатов соединений инсулинов с катионами представляют собой аспект данного изобретения.

Комплексы могут проявлять улучшенную химическую стабильность. Различные характеристики стабильности могут быть определены, если подвергнуть комплекс воздействию различных условий анализа, таких как присутствие плазмы, присутствие протеаз, присутствие гомогената печени, присутствие кислотных условий и присутствие щелочных условий. Стабильность улучшается относительно не находящегося в комплексе конъюгата соединения инсулина, когда стабильность находящегося в комплексе конъюгата соединения инсулина при любом одном или более, чем одном из данных условий анализа выше стабильности не находящегося в комплексе конъюгата соединения инсулина в тех же условиях. Предпочтительный анализ для определения стабильности в кислой среде включает воздействие на находящийся в комплексе конъюгат соединения инсулина раствором, имеющим рН 2, в течение по меньшей мере 2 часов, где уменьшенная деградация находящегося в комплексе конъюгата соединения инсулина относительно приемлемого с научной точки зрения контроля, такого как соответствующий не находящийся в комплексе конъюгат соединения инсулина, указывает на улучшение стабильности. Для тестирования стабильности могут быть использованы также анализы *in vivo*. Например, стабильность находящегося в комплексе конъюгата соединения инсулина может быть протестирована путем воздействия на него желудочно-кишечного тракта субъекта и сравнения с подходящим контролем.

7.10. Способ приготовления

В изобретении также предложен способ приготовления композиций конъюгатов соединений инсулинов с катионами, приведенных в данном описании. Этот способ обычно включает приведение в контакт одного или более конъюгатов соединений инсулинов, описанных в данном изобретении, с одним или более катионами, как описано в данном изобретении, с образованием твердого вещества.

В случае двухвалентного катиона, такого как Zn^{++} , молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону, используемое для приготовления

композиции в водном растворе с концентрацией соединения инсулина, варьирующей от приблизительно 2 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, обычно может варьировать от приблизительно 1:15 (конъюгат соединения инсулин : катион) до приблизительно 1:0,4, предпочтительно от приблизительно 1:9 до приблизительно 1:2.

Для приготовления твердого вещества Т-типа (с катионом и конъюгатом соединения инсулина и без протамина) в условиях водного раствора, описанных выше, молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону предпочтительно составляет от приблизительно 1:1,5 до 1:3, в идеале приблизительно 1:2. Для приготовления твердого вещества R-типа (с катионом, соединением инсулином и стабилизирующим соединением (например фенольным соединением) и без протамина) в условиях водного раствора, описанных выше, молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону предпочтительно составляет от приблизительно 1:4 до 1:9, предпочтительно от приблизительно 1:7 до приблизительно 1:9, в идеале приблизительно 1:8.

Для приготовления твердого вещества Т-типа с протамином (с катионом и конъюгатом соединения инсулина и с протамином) в условиях водного раствора, описанных выше, молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону предпочтительно составляет от приблизительно 1:1,5 до 1:9, в идеале приблизительно 1:2. Для приготовления твердого вещества R-типа с протамином (с катионом, соединением инсулином и стабилизирующим соединением (например фенольным соединением) и с протамином) в условиях водного раствора, описанных выше, молярное отношение конъюгата соединения инсулина к катиону предпочтительно составляет от приблизительно 1:2 до 1:15, предпочтительно от приблизительно 1:7 до приблизительно 1:9, в идеале приблизительно 1:8.

Конъюгат соединения инсулина предпочтительно добавляют к буферу в количестве, которое, как рассчитано, позволяет достичь концентрации в диапазоне от более 2 до приблизительно 100 г/л, предпочтительно от приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 до приблизительно 40 г/л, более предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 30 г/л.

5 Когда катион является двухвалентным (например Zn^{++} , Ca^{++}), его предпочтительно добавляют в количестве, которое, как рассчитано, позволяет достичь концентрации в диапазоне от приблизительно 0,04 до приблизительно 10 г/л, предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 г/л, более предпочтительно от приблизительно 0,2 до приблизительно 4 г/л. В случае кристаллов Т-типа или кристаллов Т-типа с протамином, концентрация катиона
10 предпочтительно находится в диапазоне от приблизительно 0,04 до приблизительно 1 г/л, более предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,3 г/л. В случае кристаллов R-типа или кристаллов R-типа с протамином, концентрация катиона предпочтительно находится в диапазоне от
15 приблизительно 1 до приблизительно 5 г/л, более предпочтительно от приблизительно 1,5 до приблизительно 4 г/л.

20 Когда катион является одновалентным, его предпочтительно добавляют в количестве, которое, как рассчитано, позволяет достичь концентрации в диапазоне от приблизительно 0,08 до приблизительно 40 г/л, предпочтительно от приблизительно 0,4 до приблизительно 20 г/л, более предпочтительно от
25 приблизительно 0,8 до приблизительно 16 г/л.

30 Способ может дополнительно включать объединение стабилизирующего агента с катионом и конъюгатом соединения инсулина. Предпочтительные стабилизирующие агенты описаны выше. При использовании стабилизирующий агент добавляют в количестве, достаточном для получения большей степени образования твердого вещества по сравнению с той, которая достигается при
35 использовании тех же самых реагентов и условий реакции в отсутствие стабилизирующего агента. Там, где стабилизирующий агент представляет собой фенольное соединение (например фенол, *мета*-крезол, *мета*-парабен), его можно добавлять в количестве, варьирующем от приблизительно 10 до
40 приблизительно 50% масс./масс., более предпочтительно от приблизительно 20 до приблизительно 40% масс./масс., еще более предпочтительно от приблизительно 25 до приблизительно 35% масс./масс. В более предпочтительном воплощении стабилизирующий агент представляет собой фенольное соединение (например фенол, *мета*-крезол, *мета*-парабен), его можно добавлять в количестве, варьирующем от приблизительно 0,01 до
45 приблизительно 10% масс./масс., более предпочтительно от 0,01 до
50

приблизительно 5% масс./масс., еще более предпочтительно от 0,01 до
приблизительно 1% масс./масс. Соответственно, в одном воплощении способ
5 включает объединение конъюгата соединения инсулина, катиона и
стабилизирующего агента в водном растворе с получением композиции
конъюгата соединения инсулина с катионом, где данная комбинация может
10 давать растворимые комплексы и/или кристаллические или некристаллические
твердые вещества.

Способ может дополнительно включать использование
комплексообразующего агента, такого как протамин, который объединен с
15 катионом и конъюгатом соединения инсулина, и возможно также включает
стабилизирующий агент.

Для приготовления твердого вещества в водном растворе, имеющем рН
20 в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 8, протамин
предпочтительно используют в количестве от приблизительно 4 до
приблизительно 45% масс./масс. относительно конъюгата соединения инсулина
(протамин/соединение инсулин), предпочтительно от приблизительно 8 до
25 приблизительно 25% масс./масс., более предпочтительно от приблизительно 9
до приблизительно 20% масс./масс., в идеале от приблизительно 10 до
приблизительно 12% масс./масс. Для твердых веществ Т-типа
30 предпочтительный диапазон рН составляет от приблизительно 5 до
приблизительно 6, более предпочтительно от приблизительно 5 до
приблизительно 5,5, еще более предпочтительно от приблизительно 5,1 до
приблизительно 5,3, в идеале приблизительно 5,2. Для твердых веществ R-
35 типа предпочтительный диапазон рН составляет от приблизительно 6 до
приблизительно 7, более предпочтительно от приблизительно 6,2 до
приблизительно 6,8, еще более предпочтительно от приблизительно 6,4 до
40 приблизительно 6,6, в идеале приблизительно 6,5.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что комплексы Т-типа
могут быть превращены в протаминовые комплексы Т-типа в отсутствие
45 стабилизирующего агента, такого как фенол. Комплекс Т-типа получают в
результате образования комплекса Zn с молекулой соединения инсулина в
водном растворе в отсутствие фенола. Затем добавляют протамин для того,

50

чтобы превратить комплекс Т-типа в протаминовый комплекс Т-типа. Количества и диапазоны являются такими, как описано выше.

5 Соответственно, в одном воплощении способ включает объединение конъюгата соединения инсулина, катиона и комплексообразующего агента в водном растворе с получением композиции конъюгата соединения инсулина с катионом, где данная комбинация может давать растворимые комплексы и/или
10 кристаллические или аморфные твердые вещества. В другом воплощении способ включает объединение конъюгата соединения инсулина, катиона, комплексообразующего агента и стабилизирующего агента в водном растворе с
15 получением композиции конъюгата соединения инсулина с катионом, где данная комбинация может давать растворимые комплексы и/или кристаллические или аморфные твердые вещества.

20 В некоторых воплощениях композиции могут содержать консерванты. Примеры подходящих консервантов включают в себя бензиловый спирт, сложные эфиры *пара*-гидроксибензойной кислоты, глицерин. Стабилизирующие агенты, такие как фенол, *мета*-крезол и *мета*-парабен, также могут быть
25 использованы в качестве консервантов. Соответственно, глицерин и фенол добавляют вместе для повышения противомикробной эффективности.

30 Другие компоненты, полезные в приготовлении твердых веществ, включают в себя изотонические агенты, такие как NaCl, глицерин и моносахариды.

35 Твердые конъюгаты соединений инсулинов с катионами типично могут образовываться относительно быстро. Например, образование твердого вещества обычно завершается в пределах трех суток, часто в пределах 24 часов. В некоторых случаях может оказаться желательным замедлить данную реакцию для того, чтобы улучшить образование кристаллов.

40 В одном воплощении изобретения твердые вещества образуются при комнатной температуре (25°C) без необходимости снижения температуры для индукции осаждения твердых веществ. Например, комнатная температура является эффективной для кристаллов R-типа и T-типа. Температура для
45 образования твердых веществ находится предпочтительно в диапазоне от приблизительно 0 до приблизительно 40°C, предпочтительно от

50

приблизительно 17 до приблизительно 30°C, и более предпочтительно от приблизительно 22 до приблизительно 27°C, в идеале приблизительно 25°C.

5 В одном воплощении способ включает объединение в водном растворе конъюгата соединения инсулина и катиона металла с получением кристаллического или аморфного твердого вещества. Водный раствор, содержащий конъюгат соединения инсулина, к которому будет добавлен катион, представляет собой предпочтительно забуференный раствор, имеющий рН в диапазоне рI конъюгата соединения инсулина +/- приблизительно 1,5, предпочтительно рI +/- приблизительно 1, более предпочтительно рI +/- приблизительно 0,75. Данные диапазоны также применимы к комплексам Т-типа, R-типа и протаминавым комплексам. Однако в случае нейтральных протаминавых комплексов (NPH-типа), предпочтительный рН составляет от приблизительно 7 до приблизительно 8,5, более предпочтительно от приблизительно 7,5 до приблизительно 8. При добавлении катиона металла, рН может слегка измениться, и рН можно довести до заданных диапазонов рН, описанных выше. При использовании фенольных соединений, может иметь место незначительное изменение рН, и для доведения рН до предпочтительных диапазонов можно использовать кислоту или основание.

30 Значения рI для конъюгатов соединений инсулинов обычно требуют рН менее приблизительно 7, предпочтительно менее приблизительно 6, более предпочтительно менее приблизительно 5,5. Моноконъюгаты инсулина человека с нейтральными модифицирующими группировками обычно имеют рI в диапазоне приблизительно 4,75 +/-0,25. Для диконъюгатов инсулина человека диапазон рI обычно составляет 4,25 +/-0,25. Для триконъюгатов инсулина человека диапазон рI обычно составляет 3,5 +/-0,25.

40 Примеры подходящих буферных систем включают в себя аммоний-ацетатный буфер, натрий-фосфатный буфер, трис-буфер, смесь фосфата натрия и ацетата аммония, натрий-ацетатный буфер, смесь ацетата натрия и ацетата аммония и цитратный буфер, и любую из вышеупомянутых буферных систем [А], также содержащую этанол и/или ацетонитрил [Б] (например в процентном соотношении А:Б от приблизительно 1:1 до приблизительно 10:1). Неожиданным аспектом изобретения является то, что твердый конъюгат

соединения инсулина с катионом может быть образован в водной смеси, содержащей органический растворитель, такой как этанол или ацетонитрил.

5 Одним из уникальных признаков изобретения является то, что дополнительно к предложенным полезным комплексам конъюгатов соединений инсулинов с катионами в изобретении также предложен способ отделения конъюгатов соединений инсулинов с катионами от неконъюгированного соединения инсулина в процессе производства. В этом способе конъюгаты соединений инсулинов с катионами можно осаждать из раствора, и растворенное неконъюгированное соединение инсулинов можно удалять, например, фильтрацией. Данный признак исключает 2 стадии в получении конъюгатов соединений инсулинов: стадию концентрирования и стадию лиофилизации.

20 Обработанная чистая твердая композиция может быть получена с помощью стандартных методов, таких как центрифугирование и/или фильтрация с последующими промывкой (например смесью этанол/вода) и лиофилизацией или вакуумной сушкой. Многократные промывки могут быть использованы для регуляции содержания фенола и/или катионов.

7.11. Препарат

30 Комплексы могут быть приготовлены в виде препарата для введения в фармацевтический носитель в соответствии с известными методами. Сммотри, например, Alfonso R. Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (июнь 2003 г.) и Howard C. Ansel, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 7th ed. (октябрь 1999), полные описания которых в части, относящейся к выбору, приготовлению и использованию фармацевтических лекарственных форм, включены в данное описание посредством ссылки

40 Комплексы, обычно в форме аморфного или кристаллического твердого вещества, могут быть объединены с фармацевтически приемлемым носителем. Носитель должен быть приемлемым в смысле его совместимости с любыми другими ингредиентами в фармацевтической композиции и не должен быть чрезмерно вредным для субъекта, что касается пользы, полученной от активного(ых) ингредиента(ов). Носитель может представлять собой твердое вещество или жидкость, или и то и другое. Его приготавливают

предпочтительно в виде препарата в стандартной лекарственной форме, например, в виде таблетки. Данная стандартная лекарственная форма может
5
содержать, например, от приблизительно 0,01 или 0,5% до приблизительно 95% или 99% по массе комплекса соединения инсулина с катионом. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены с помощью любых хорошо известных методов фармации, включая, но не ограничиваясь этим,
10
смешивание компонентов, возможно включение одного или более дополнительных ингредиентов.

Примеры подходящих фармацевтических композиций включают в себя композиции, приготовленные для перорального, ректального, ингаляционного
15
(например с помощью аэрозоля), трансбуккального (например сублингвального), вагинального, парентерального (например подкожного, внутримышечного, интрадермального, внутрисуставного, внутривенного, интраабдоминального, интрацеребрального, интраартериального или
20
внутрибрюшинного), местного введения, для введения через поверхности слизистых оболочек (включая поверхности дыхательных путей), носовые поверхности и для трансдермального введения. Наиболее подходящий путь в любом случае
25
будет зависеть от природы и тяжести состояния, которое лечат, и от природы конкретных комплексов соединений инсулинов с катионами, которые используют. Предпочтительные пероральные композиции представляют собой композиции, приготовленные для проглатывания внутрь субъектом. В идеале пероральные композиции приготавливают таким образом, чтобы они
30
выдерживали или по существу выдерживали прохождение через желудок и полностью или по существу полностью растворялись в кишечнике для доставки активного ингредиента. Примеры подходящих трансдермальных систем
35
включают в себя ультразвуковые, ионтофоретические системы доставки и системы доставки с использованием пластыря.
40

В одном аспекте в изобретения предложены композиции жирных кислот, содержащие одну или более насыщенных или ненасыщенных C₄, C₅, C₆, C₇, C₈,
45
C₉ или C₁₀ и/или солей таких жирных кислот. Предпочтительными жирными кислотами являются каприловая, каприновая, миристиновая и лауриновая. Предпочтительными солями жирных кислот являются натриевые соли каприловой, каприновой, миристиновой и лауриновой кислоты.
50

Предпочтительные композиции жирных кислот содержат одну жирную кислоту или одну соль жирной кислоты и не содержат значительные количества других жирных кислот или солей жирных кислот. В одном аспекте изобретения жирнокислотное содержание композиции более чем на приблизительно 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 99,5; 99,6; 99,7; 99,8 или 99,9% (масс./масс.) представлено одной жирной кислотой. В другом воплощении жирнокислотное содержание композиции находится в диапазоне, имеющем в качестве нижнего предела приблизительно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9 или 3,0 % масс./масс. и имеющем в качестве верхнего предела приблизительно 3,0; 3,1; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5; 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4,0; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7,0; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9; 8,0; 8,1; 8,2; 8,3; 8,4; 8,5; 8,6; 8,7; 8,8; 8,9; 9,0; 9,1; 9,2; 9,3; 9,4; 9,5; 9,6; 9,7; 9,8; 9,9; 10,0; 10,1; 10,2; 10,3; 10,4; 10,5; 10,6; 10,7; 10,8; 10,9; 11,0; 11,1; 11,2; 11,3; 11,4; 11,5; 11,6; 11,7; 11,8; 11,9 или 12,0 % масс./масс. В еще одном воплощении жирнокислотное содержание композиции находится в диапазоне, имеющем в качестве нижнего предела приблизительно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9 или 3,0 % масс./масс. и имеющем в качестве верхнего предела приблизительно 3,0; 3,1; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5; 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4,0; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7,0; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9; 8,0; 8,1; 8,2; 8,3; 8,4; 8,5; 8,6; 8,7; 8,8; 8,9; 9,0; 9,1; 9,2; 9,3; 9,4; 9,5; 9,6; 9,7; 9,8; 9,9; 10,0; 10,1; 10,2; 10,3; 10,4; 10,5; 10,6; 10,7; 10,8; 10,9; 11,0; 11,1; 11,2; 11,3; 11,4; 11,5; 11,6; 11,7; 11,8; 11,9 или 12,0 % масс./масс., и более приблизительно 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 99,5; 99,6; 99,7; 99,8 или 99,9% (масс./масс.) жирнокислотного содержания композиции представлено одной жирной кислотой.

Активные компоненты данных препаратов могут включать в себя конъюгированные или неконъюгированные, находящиеся в комплексе или не находящиеся в комплексе белки и/или пептиды. Предпочтительные белки и/или пептиды представляют собой белки и/или пептиды, описанные в данном изобретении. Предпочтительные конъюгаты представляют собой конъюгаты,

описанные в данном изобретении. Предпочтительные комплексы представляют собой комплексы, описанные в данном изобретении. Предпочтительные пероральные композиции представляют собой композиции, приготовленные для проглатывания внутрь субъектом. В идеале, данные пероральные композиции приготавливают таким образом, чтобы они выдерживали или по существу выдерживали прохождение через желудок и полностью или по существу полностью растворялись в кишечнике для доставки активного ингредиента. В некоторых случаях препарат может включать энтеросолюбильное покрытие, и в некоторых случаях препарат будет конкретно исключать энтеросолюбильное покрытие. Данная композиция предложена предпочтительно в виде таблетки, порошка, твердой желатиновой капсулы или мягкой желатиновой капсулы, хотя другие формы, описанные в данном изобретении, также являются подходящими.

Композиции жирных кислот по изобретению могут содержать инсулины, ацилированные жирными кислотами. Примеры подходящих инсулинов, ацилированных жирными кислотами, описаны в следующих патентах США, полные описания которых включены в данное описание посредством ссылки: в патенте США № 6531448 под названием "Insoluble compositions for controlling blood glucose", опубликованном 11 марта 2003 г.; патенте США № RE37971 под названием "Selective acylation of epsilon-amino groups", опубликованном 28 января 2003 г.; патенте США № 6465426 под названием "Insoluble insulin compositions", опубликованном 15 октября 2002; патенте США № 6444641 под названием "Fatty acid-acylated insulin analogs", опубликованном 3 сентября 2002; патенте США № 6335316 под названием "Method for administering acylated insulin", опубликованном 1 января 2002; патенте США № 6268335 под названием "Insoluble insulin compositions", опубликованном 31 июля 2001 г.; патенте США № 6051551 под названием "Method for administering acylated insulin", опубликованном 18 апреля 2000 г.; патенте США № 5922675 под названием "Acylated Insulin Analogs", опубликованном 13 июля 1999; патенте США № 5700904 под названием "Preparation of an acylated protein powder", опубликованном 23 декабря 1997; патенте США № 5693609 под названием "Acylated insulin analogs Granted", опубликованном 2 декабря 1997; патенте США № 5646242 под названием "Selective acylation of epsilon-amino groups",

опубликованном 08 июля 1997; патенте США № 5631347 под названием
"Reducing gelation of a fatty acid-acylated protein", опубликованном 20 мая 1997;
5 патенте США № 6451974 под названием "Method of acylating peptides and novel
acylating agents", опубликованном 17 сентября 2002; патенте США № 6011007
под названием "Acylated insulin", опубликованном 4 января 2000 г.; патенте США
10 № 5750497 под названием "Acylated insulin Granted: 12 мая 1998; патенте США
№ 5905140 под названием "Selective acylation method", опубликованном 18 мая
1999; патенте США № 6620780 под названием "Insulin derivatives",
опубликованном 16 сентября 2003 г.; патенте США № 6251856 под названием
15 "Insulin derivatives", опубликованном 26 июня 2001 г.; патенте США № 6211144
под названием "Stable concentrated insulin preparations for pulmonary delivery",
опубликованном 3 апреля 2001 г.; патенте США № 6310038 под названием
20 "Pulmonary insulin crystals", опубликованном 30 октября 2001 г.; и патенте США
№ 6174856 под названием "Stabilized insulin compositions", опубликованном 16
января 2001 г. Особенно предпочтительными являются инсулины,
25 моноацилированные жирными кислотами, содержащие 12, 13, 14, 15 или 16-
углеродные жирные кислоты, ковалентно связанные с Lys(B29) инсулина
человека.

Фармацевтические композиции, подходящие для перорального введения,
30 могут быть представлены в виде дискретных единиц, таких как капсулы,
облатки, лепешки или таблетки, каждая из которых содержит заданное
количество смеси конъюгатов соединений инсулинов; в виде порошка или
35 гранул; в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости или в
виде эмульсии типа масло в воде или вода в масле. Такие препараты могут
быть приготовлены с помощью любого подходящего метода фармации,
который включает стадию объединения смеси конъюгатов соединений
40 инсулинов и подходящего носителя (который может содержать один или более
дополнительных ингредиентов, как отмечено выше). Препараты могут включать
суспензии твердых веществ, находящиеся в комплексе конъюгаты соединений
45 инсулинов с катионами, не находящийся в комплексе активный ингредиент
(например соединение нативного инсулина, конъюгаты соединений инсулинов)
и смеси вышеупомянутого.

50

Обычно фармацевтические композиции по изобретению приготавливают путем равномерного и тщательного перемешивания комплексов с жидким или твердым носителем, или и с тем и с другим, и последующего, если необходимо, формования полученной смеси. Например, таблетка может быть приготовлена путем прессования или формования порошка или гранул, содержащих смесь конъюгатов соединений инсулинов, возможно с одним или более дополнительными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть приготовлены путем прессования смеси, находящейся в сыпучей форме, такой как порошок или гранулы, возможно смешанной со связующим веществом, смазывающим веществом, инертным разбавителем и/или поверхностно-активным(и)/диспергирующим(и) агентом(ами), в подходящем устройстве. Формованные таблетки могут быть изготовлены путем формования порошкообразной композиции, увлажненной инертным жидким связующим веществом, в подходящем устройстве.

Фармацевтические композиции, подходящие для трансбуккального (сублингвального) введения, включают в себя лепешки, содержащие смесь конъюгатов соединений инсулинов в ароматной основе, обычно сахарозе и гуммиарабике или трагаканте; и пастилки, содержащие смесь конъюгатов соединений инсулинов в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахараза и гуммиарабик. Примеры подходящих препаратов можно найти в патентных публикациях США № 20030229022 ("Pharmaceutical formulation"); № 20030236192 ("Method of modifying the release profile of sustained release compositions"); № 20030096011 ("Method of producing submicron particles of a labile agent and use thereof"); № 20020037309 ("Process for the preparation of polymer-based sustained release compositions"); № 20030118660 ("Residual solvent extraction method and microparticles produced thereby"); а также в патентах США №№ 6180141 ("Composite gel microparticles as active principle carriers"); 6737045 ("Methods and compositions for the pulmonary delivery insulin compound"); 6730334 ("Multi-arm block copolymers as drug delivery vehicles"); 6685967 ("Methods and compositions for pulmonary delivery of insulin compound"); 6630169 ("Particulate delivery systems and methods of use"); 6589560 ("Stable glassy state powder formulations; 6592904 ("Dispersible macromolecule compositions and methods for their preparation and use"); 6582728 ("Spray drying of

macromolecules to produce inhaleable dry powders"); 6565885 ("Methods of spray
drying pharmaceutical compositions"); 6546929 ("Dry powder dispersing apparatus
and methods for their use"); 6543448 ("Apparatus and methods for dispersing dry
5 powder medicaments"); 6518239 ("Dry powder compositions having improved
dispersivity"); 6514496 ("Dispersible antibody compositions and methods for their
preparation and use"); 6509006 ("Devices compositions and methods for the
10 pulmonary delivery of aerosolized medicaments"); 6433040 ("Stabilized bioactive
preparations and methods of use"); 6423344 ("Dispersible macromolecule
compositions and methods for their preparation and use"); 6372258 ("Methods of
15 spray-drying a drug and a hydrophobic amino acid"); 6309671 ("Stable glassy state
powder formulations"); 6309623 ("Stabilized preparations for use in metered dose
inhalers"); 6294204 ("Method of producing morphologically uniform microcapsules
and microcapsules produced by this method"); 6267155 ("Powder filling systems,
20 apparatus and methods"); 6258341 ("Stable glassy state powder formulations");
6182712 ("Power filling apparatus and methods for their use"); 6165463 ("Dispersible
antibody compositions and methods for their preparation and use"); 6138668
25 ("Method and device for delivering aerosolized medicaments"); 6103270 ("Methods
and system for processing dispersible fine powders"); 6089228 ("Apparatus and
methods for dispersing dry powder medicaments"); 6080721 ("Pulmonary delivery of
active fragments of parathyroid hormone"); 6051256 ("Dispersible macromolecule
30 compositions and methods for their preparation and use"); 6019968 ("Dispersible
antibody compositions and methods for their preparation and use"); 5997848
("Methods and compositions for pulmonary delivery of insulin compound"); 5993783
35 ("Method and apparatus for pulmonary administration of dry powder. alpha.1-
antitrypsin"); 5922354 ("Methods and system for processing dispersible fine
powders"); 5826633 ("Powder filling systems, apparatus and methods"); 5814607
40 ("Pulmonary delivery of active fragments of parathyroid hormone"); 5785049
("Method and apparatus for dispersion of dry powder medicaments"); 5780014
("Method and apparatus for pulmonary administration of dry powder alpha 1-
antitrypsin"); 5775320 ("Method and device for delivering aerosolized medicaments");
45 5740794 ("Apparatus and methods for dispersing dry powder medicaments");
5654007 ("Methods and system for processing dispersible fine powders"); 5607915
("Pulmonary delivery of active fragments of parathyroid hormone"); 5458135
50

5 (“Method and device for delivering aerosolized medicaments”); 6602952 (“Hydrogels derived from chitosan and poly(ethylene glycol) or related polymers”) и 5932462 (“Multiarmed, monofunctional, polymer for coupling to molecules and surfaces”).
Кроме того, подходящие препараты замедленного высвобождения описаны в патенте США № 5968554 (Cardinal Health) под названием “A sustained release pharmaceutical preparation”, опубликованном 19 октября 1999, полное описание
10 которого включено в данное описание посредством ссылки. Подходящие препараты микрочастиц описаны в международной патентной публикации WO/2003-049701 (Spherics, Inc.) под названием “Methods and products useful in the formation and isolation of microparticles”, опубликованной 30 октября 2003 г.
15 Подходящие биоадгезивные препараты описаны в международной патентной публикации WO/2003-051304 (Spherics, Inc.) под названием “Bioadhesive drug delivery system with enhanced gastric retention”, опубликованной 6 мая 2004 г.

20 Фармацевтические композиции согласно воплощениям изобретения, подходящие для парентерального введения, содержат стерильные водные и неводные инъекционные растворы комплексов, препараты которых являются
25 предпочтительно изотоническими относительно крови предполагаемого реципиента. Эти препараты могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, которые делают композицию изотонической относительно крови предполагаемого реципиента. Водные и
30 неводные стерильные суспензии могут содержать суспендирующие агенты и загустители. Композиции могут быть представлены в однократных или многократных контейнерах, например в герметичных ампулах или флаконах, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии,
35 требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например физиологического раствора или воды для инъекций непосредственно перед применением. Инъекционные растворы и суспензии для немедленного приема могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток, виды которых описаны ранее. Например, может быть предложена инъекцируемая
40 стабильная стерильная композиция со смесью комплексов в стандартной лекарственной форме в герметичном контейнере. Смесью комплексов может быть предложена в форме лиофилизата, который может быть растворен в подходящем фармацевтически приемлемом носителе с образованием жидкой
45
50

композиции, подходящей для инъекции субъекту. Парентеральная стандартная лекарственная форма обычно содержит от приблизительно 1 микрограмма до приблизительно 10 мг смеси комплексов. Когда комплексы по существу не растворимы в воде, эмульгирующий агент, который является физиологически приемлемым, может быть использован в количестве, достаточном для эмульгирования данных комплексов в водном носителе. Одним из таких полезных эмульгирующих агентов является фосфатидилхолин.

Твердая лекарственная форма для перорального введения обычно содержит от приблизительно 2 мг до приблизительно 500 мг, предпочтительно от приблизительно 10 мг до приблизительно 250 мг, в идеале от приблизительно 20 мг до приблизительно 110 мг комплексов.

Фармацевтические композиции, подходящие для ректального введения, предпочтительно представлены в виде суппозиториев, содержащих стандартную дозу. Данные фармацевтические композиции могут быть приготовлены путем смешивания комплексов с одним или более традиционными твердыми носителями, например с маслом какао, и последующего формования полученной смеси.

Фармацевтические композиции, подходящие для местного нанесения на кожу, предпочтительно имеют форму мази, крема, лосьона, пасты, геля, спрея, аэрозоля или масла. Носители, которые могут быть использованы, включают в себя вазелин, ланолин, PEG, спирты, трансдермальные усилители и комбинации двух или более таких носителей.

Фармацевтические композиции, подходящие для трансдермального введения, могут быть представлены в виде отдельных пластырей, приспособленных для того, чтобы оставаться в тесном контакте с эпидермисом реципиента в течение длительного периода времени. Композиции, подходящие для трансдермального введения, могут быть доставлены также путем ионтофореза (смотри, например, *Pharmaceutical Research* 3 (6):318 (1986)) и обычно имеют форму возможно забуференного водного раствора смеси конъюгатов соединений инсулинов. Подходящие препараты содержат цитратный или бис/трис-буфер (pH 6) или смесь этанол/вода и содержат от 0,1 до 0,2 М активного ингредиента.

В предпочтительном воплощении комплексы вводят в виде компонентов препаратов твердых жирных кислот, таких, как описано в заявке на патент США № 60/494821, поданной 13 августа 2003 г., Оrawale с соавт., полное описание которой включено в данное описание посредством ссылки.

В некоторых воплощениях конъюгат соединения инсулина может быть предложен отдельно от катионных и/или других компонентов, необходимых для образования твердых веществ. Например, конъюгат соединения инсулина может быть предложен в виде сухого твердого вещества, а буферный раствор, содержащий катион, стабилизирующий агент, консервант и/или другой компонент, может быть предложен отдельно, так что потребитель может комбинировать данные отдельные компоненты для получения комплексов конъюгатов соединений инсулинов с катионами.

7.12. Способы лечения

Композиции конъюгатов соединений инсулинов с катионами и их препараты являются полезными в лечении состояний, при которых увеличение количества циркулирующего соединения инсулина (относительно количества, имеющегося у субъекта в отсутствие введения соединения инсулина из экзогенного источника) дает желаемый терапевтический или физиологический эффект. Например, состояние, которое лечат, может представлять собой диабет типа I или типа II, преддиабет и/или метаболический синдром. В одном воплощении данные композиции вводят для облегчения симптомов диабета. В другом воплощении композиции вводят субъекту, находящемуся в преддиабетическом состоянии, для предупреждения или замедления развития диабета.

Эффективное количество композиции конъюгата соединения инсулина с катионом для введения согласно способам по изобретению будет несколько различаться от смеси к смеси и от субъекта к субъекту и будет зависеть от таких факторов, как возраст и состояние субъекта, путь доставки и состояние, которое лечат. Такие дозировки могут быть определены в соответствии с общепринятыми фармакологическими методами, известными специалистам в данной области.

В качестве общего предложения, терапевтическую эффективность будет иметь пероральная лекарственная форма, содержащая от приблизительно

0,025 до приблизительно 10 мг/кг активного ингредиента (т.е. конъюгата), причем все массы рассчитаны на основе массы смеси конъюгатов соединений инсулинов. Более предпочтительный диапазон составляет от приблизительно 0,06 до приблизительно 1 мг/кг, и еще более предпочтительный диапазон составляет от приблизительно 0,125 до приблизительно 0,5 мг/кг.

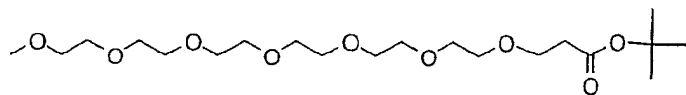
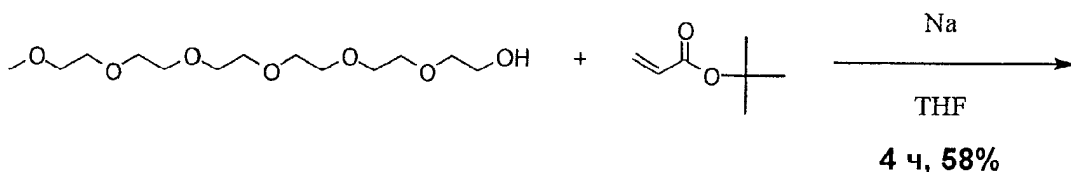
Парентеральная дозировка обычно варьирует от приблизительно 0,5 мкг/кг до приблизительно 0,5 мг/кг, причем все массы рассчитаны на основе массы смеси конъюгатов соединений инсулинов. Более предпочтительный диапазон составляет от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 100 мкг/кг.

Частота введения обычно составляет один, два или три раза в сутки или является такой, как требуется для контроля состояния. Альтернативно, композиции конъюгатов соединений инсулинов с катионами можно вводить путем длительной инфузии. Продолжительность лечения зависит от типа соединения инсулина, недостаточности, которую лечат, и лечение может продолжаться в течение всей жизни субъекта. Комплексы можно вводить, например, за 0-30 минут до еды. Комплексы можно вводить, например, за 0-2 часа до сна.

8. Примеры синтеза

Следующие примеры представлены для иллюстрации и объяснения изобретения.

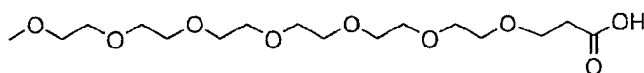
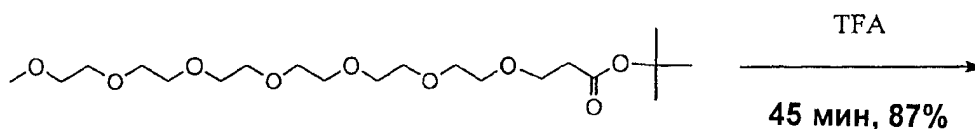
8.1. Синтез защищенного MPEG₆C₃-олигомера (*трет*-бутилового эфира 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси}этокси)этокси]этокси}пропионовой кислоты)



Метилгексаэтиленгликоль (1,0 г, 3,37 ммоль) и *трет*-бутилакрилат (0,216 г, 1,69 ммоль) растворяли в сухом THF (тетрагидрофуране) (10 мл). К раствору добавляли металлический натрий (0,4 мг, 0,016 ммоль). После перемешивания

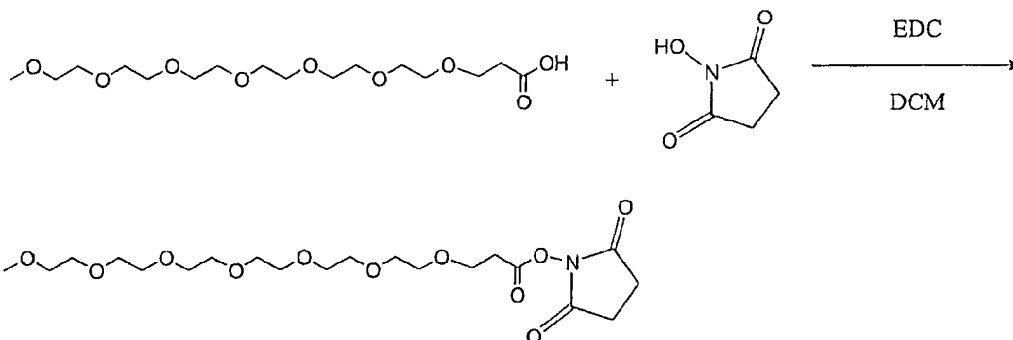
5 в течение 4 ч при комнатной температуре реакцию смесь гасили путем добавления 1 М HCl (15 мл). Затем погашенную реакцию смесь экстрагировали CH₂Cl₂ (1 x 50 мл, 1 x 25 мл). Органический слой сушили (MgSO₄) и концентрировали. После очистки посредством хроматографии на силикагеле (этилацетат в качестве элюента) получали продукт в виде масла (0,832 г, 58%).

10 **8.2. Синтез MPEG₆C₃-олигомерной кислоты (3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси}этокси)этокси]этокси}пропионовой кислоты)**



25 С *tert*-бутилового эфира (0,165 г, 0,0389 ммоль) удаляли защитную группу путем перемешивания при комнатной температуре в трифторуксусной кислоте (2,0 мл). Затем содержимое концентрировали до постоянной массы (0,125 г, 87%).

30 **8.3. Синтез активированного MPEG₆C₃-олигомера (2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси}этокси)этокси]этокси}пропионовой кислоты)**

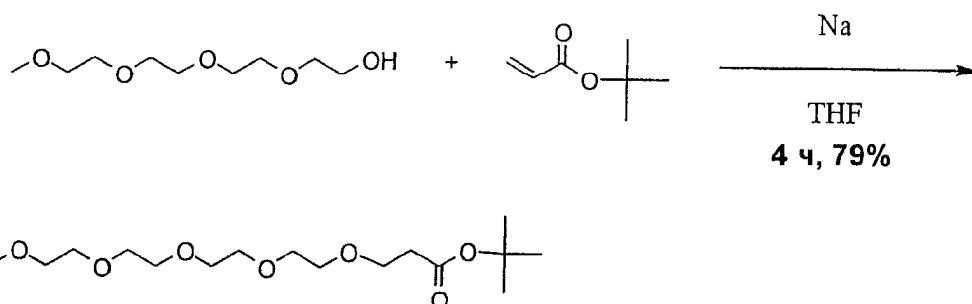


45 Кислоту (0,660 г, 1,79 ммоль) и *N*-гидроксисукцинимид (0,2278 г, 1,97 ммоль) растворяли в сухом CH₂Cl₂ (15 мл). Добавляли гидрохлорид этилдиметиламинопропилкарбодиимида (EDC, 0,343 г, 1,79 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи реакцию смесь разбавляли CH₂Cl₂ и промывали водой (2 x 45 мл). Органический слой сушили

50

(MgSO₄) и концентрировали до постоянной массы. Продукт представлял собой масло (0,441 г, 53%).

8.4. Синтез защищенного MPEG₄C₃-олигомера (*tert*-бутилового эфира 3-(2-{2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси}этокси)пропионовой кислоты)



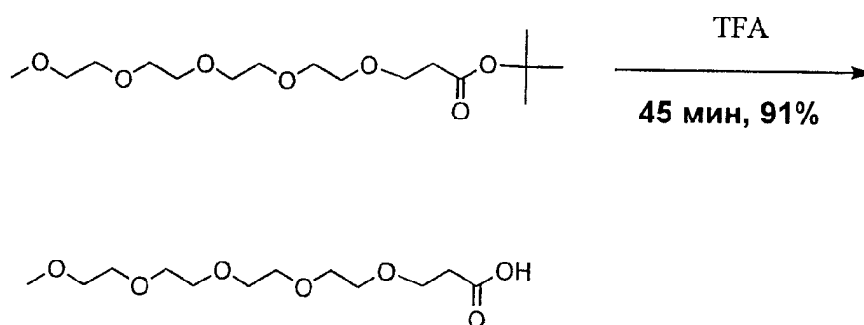
20

25

30

Метилтетраэтиленгликоль (1,0 г, 4,80 ммоль) и *tert*-бутилакрилат (0,308 г, 2,40 ммоль) растворяли в сухом THF (10 мл). К данному раствору добавляли металлический натрий (0,6 мг, 0,024 ммоль). После перемешивания в течение 4 ч при комнатной температуре реакцию смесь гасили путем добавления 1 М HCl (15 мл). Затем погашенную реакцию смесь экстрагировали CH₂Cl₂ (1 x 50 мл, 1 x 25 мл). Органический слой сушили (MgSO₄) и концентрировали. После очистки посредством хроматографии на силикагеле (этилацетат в качестве элюента) получали продукт в виде масла (1,28 г, 79%).

8.5. Синтез MPEG₆C₃-олигомерной кислоты (3-(2-{2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси}этокси)пропионовой кислоты)

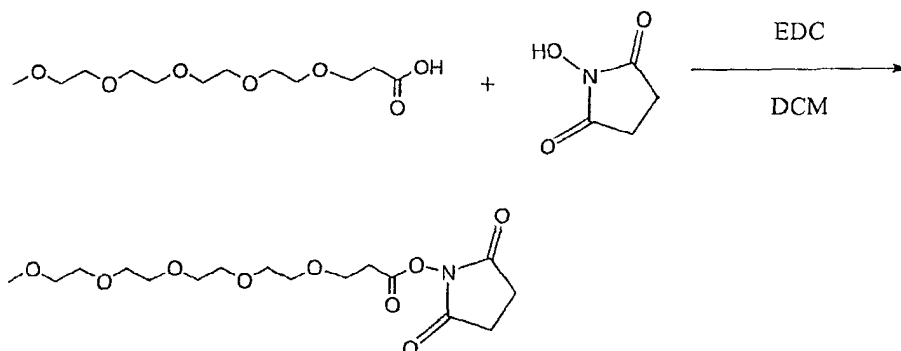


45

50

С *tert*-бутилового эфира (1 г, 3,42 ммоль) удаляли защитную группу путем перемешивания при комнатной температуре в трифторуксусной кислоте (6,0 мл). Затем содержимое концентрировали до постоянной массы (0,87 г, 91%).

8.6. Синтез активированного MPEG₄C₃-олигомера (2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-(2-{2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси}этокси)пропионовой кислоты)

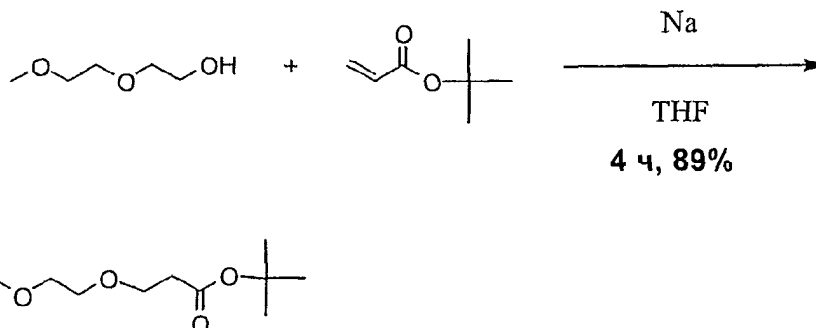


20

25

Кислоту (0,6 г, 2,14 ммоль) и *N*-гидрохсисукцинимид (0,271 г, 2,35 ммоль) растворяли в сухом CH₂Cl₂ (20 мл). Добавляли гидрохлорид этилдиметиламинопропилкарбодиимида (EDC, 0,409 г, 2,14 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи реакционную смесь разбавляли CH₂Cl₂ и промывали водой (2 x 45 мл). Органический слой сушили (MgSO₄) и концентрировали до постоянной массы. Продукт представлял собой масло (0,563 г, 69%).

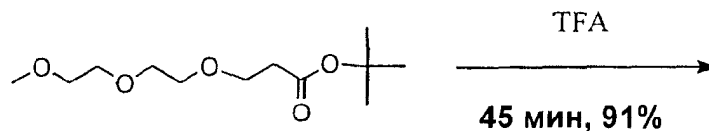
8.7. Синтез защищенного MPEG₄C₃-олигомера (*трет*-бутилового эфира 3-(2-метоксиэтокси)пропионовой кислоты)



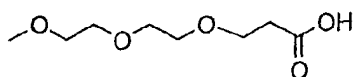
Метилтетраэтиленгликоль (5,0 г, 41,6 ммоль) и *трет*-бутилакрилат (2,66 г, 20,8 ммоль) растворяли в сухом THF (20 мл). К данному раствору добавляли металлический натрий (0,47 мг, 20,8 ммоль). После перемешивания в течение 4 ч при комнатной температуре реакционную смесь гасили путем добавления 1 М HCl (30 мл). Затем погашенную реакционную смесь экстрагировали CH₂Cl₂ (1 x 100 мл, 1 x 50 мл). Органический слой сушили (MgSO₄) и концентрировали. После очистки посредством хроматографии на силикагеле (этилацетат в качестве элюента) получали продукт в виде масла (7,5 г, 89%).

8.8. Синтез MPEG₆C₃-олигомерной кислоты (3-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]пропионовой кислоты)

5



10

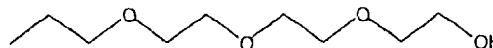


15

С *tert*-бутилового эфира (1 г, 4,90 ммоль) удаляли защитную группу путем перемешивания при комнатной температуре в трифторуксусной кислоте (6,0 мл). Затем содержимое концентрировали до постоянной массы (0,652 г, 89%).

20

8.9. Синтез 2-[2-(2-пропоксиэтокси)этокси]этанола (1)



25

Триэтиленгликоль (19,5 г, 0,13 моль) растворяли в тетрагидрофуране (150 мл) и добавляли порциями гидрид натрия (2,60 г, 0,065 моль) в течение 0,5 ч, и реакцию перемешивали в течение еще 1 ч. Затем через воронку для вливания добавляли по каплям 1-бромпропанол (8,0 г, 0,065 моль), растворенный в тетрагидрофуране (30 мл), и реакцию перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Неочищенную реакционную смесь фильтровали через целит, промывали CH₂Cl₂ и упаривали досуха. Полученное масло растворяли в CH₂Cl₂ (250 мл), промывали насыщенным NaCl (250 мл), H₂O (250 мл), сушили MgSO₄ и упаривали досуха. После колоночной хроматографии (силикагель, этилацетат) получали **1** в виде желтоватого масла (2,24 г, выход 18%).

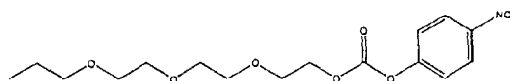
30

35

40

8.10. Синтез 2-[2-(2-пропоксиэтокси)этокси]этилового эфира 4-нитрофенилового эфира угольной кислоты

45

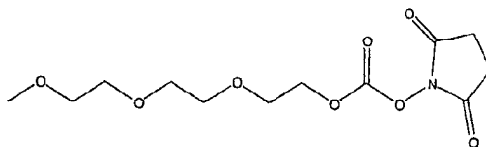


50

4-Нитрохлорформиат (3,45 г, 17,1 ммоль) и **1** (2,2 г, 11,4 ммоль) растворяли в CH₂Cl₂ (20 мл). После перемешивания в течение 10 минут добавляли TEA (2,1 мл, 15 ммоль), и реакцию перемешивали в течение ночи

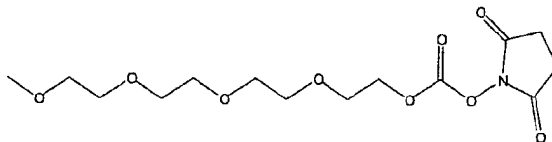
при комнатной температуре. Неочищенную реакцию разбавляли CH_2Cl_2 (50 мл), промывали 1 М HCl (50 мл), H_2O (50 мл), сушили MgSO_4 и упаривали досуха. После колоночной хроматографии (силикагель, этилацетат/гексаны, 3:2) получали **2** в виде желтоватого масла (2,57 г, выход 63%).

8.11. Синтез 2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этилового эфира 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира угольной кислоты



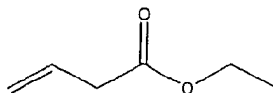
Триэтиленгликоля монометилловый эфир (1,0 г, 6,1 ммоль) и *N,N'*-дисукцинимидилкарбонат (1,87 г, 7,3 ммоль) растворяли в ацетонитриле (10 мл). Затем добавляли триэтиламин (1,3 мл, 9,15 ммоль), и реакцию перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Неочищенную реакцию упаривали досуха, растворяли в насыщенном NaHCO_3 (50 мл), промывали этилацетатом (2 x 50 мл), сушили MgSO_4 и упаривали досуха. После колоночной хроматографии (силикагель, этилацетат) получали **1** в виде прозрачного масла (0,367 г, выход 20%).

8.12. Синтез 2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этилового эфира 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира угольной кислоты (1).



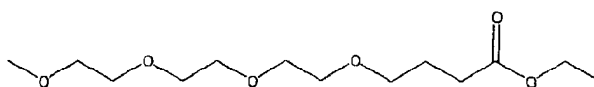
Тетраэтиленгликоля монометилловый эфир (1,0 г, 4,8 ммоль) и *N,N'*-дисукцинимидилкарбонат (1,48 г, 5,8 ммоль) растворяли в ацетонитриле (10 мл). Затем добавляли триэтиламин (1,0 мл, 7,2 ммоль), и реакцию перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Неочищенную реакцию упаривали досуха, растворяли в насыщенном NaHCO_3 (30 мл), промывали этилацетатом (2 x 30 мл), сушили MgSO_4 и упаривали досуха. После колоночной хроматографии (силикагель, этилацетат/ MeOH , 20:1) получали **1** в виде прозрачного масла (0,462 г, выход 28%).

8.13. Синтез этилового эфира бут-3-еновой кислоты



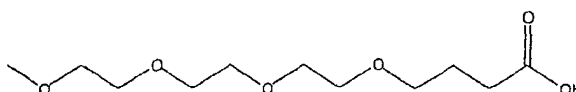
Винилуксусную кислоту (10,0 г, 0,12 моль) растворяли в этаноле (200 мл) и добавляли концентрированную серную кислоту (0,75 мл, 0,014 моль). Реакцию нагревали до температуры дефлегмации в течение 4 ч. Неочищенную реакцию разбавляли этилацетатом (200 мл), промывали H₂O (200 мл), насыщенным NaHCO₃ (200 мл), сушили MgSO₄ и упаривали досуха с получением **1** в виде прозрачного масла (3,17 г, 23%).

8.14. Синтез этилового эфира 4-{2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси}масляной кислоты



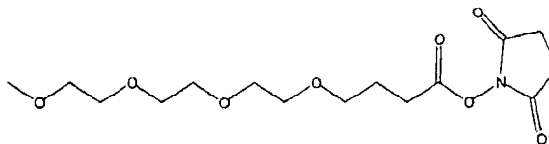
Триэтиленгликоля монометиловый эфир (4,27 г, 0,026 моль) и этиловый эфир бут-3-еновой кислоты (1,5 г, 0,013 моль) растворяли в тетрагидрофуране (10 мл). Затем добавляли кусковой Na⁰ (0,030 г, 0,013 моль), и реакцию перемешивали в течение 4 ч. Неочищенную реакцию гасили 1 М HCl (20 мл), промывали этилацетатом (3 x 20 мл). Органические слои объединяли и промывали H₂O (2 x 10 мл), сушили MgSO₄ и упаривали досуха с получением **2** в виде желтоватого масла (1,07 г, выход 30%).

8.15. Синтез 4-{2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси}масляной кислоты



Этиловый эфир 4-{2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси}масляной кислоты (1,07 г, 4,0 ммоль) растворяли в 1 М NaOH (10 мл), и реакцию перемешивали в течение 2 ч. Неочищенную реакцию разбавляли насыщенным NaCl (40 мл), подкисляли до pH примерно 2 концентрированной HCl, промывали CH₂Cl₂ (2 x 50 мл), сушили MgSO₄ и упаривали досуха с получением **3** в виде прозрачного масла (0,945 г, выход 94%).

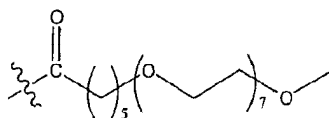
8.16. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 4-{2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси}масляной кислоты



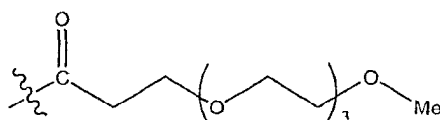
N-гидроксисукцинимид (0,55 г, 4,8 ммоль) и EDCI (1,15 г, 6,0 ммоль) растворяли в CH_2Cl_2 (7 мл). Затем добавляли 4-{2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси}масляную кислоту (0,940 г, 3,8 ммоль), растворенную в CH_2Cl_2 (2 мл). Реакцию перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Неочищенную реакцию разбавляли CH_2Cl_2 (21 мл), промывали 1 М HCl (30 мл), H_2O (30 мл), сушили MgSO_4 и упаривали досуха. После колоночной хроматографии (силикагель, этилацетат) получали **4** в виде прозрачного масла (0,556 г, выход 43%).

9. Получение комплексов

Изучали способы получения цинковых комплексов конъюгатов соединений инсулинов. Для получения цинкового комплекса HIM2 разработали новые способы, необычные относительно опубликованных способов, используемых для комплексообразования/кристаллизации соединения инсулина и аналогов соединения инсулина. HIM2 представляет собой моноконъюгат инсулина человека с модифицирующей группировкой, связанной в положении В29, где модифицирующая группировка имеет следующую структуру:



Другие комплексы получали с использованием IN105, моноконъюгата инсулина человека с модифицирующей группировкой, связанной в положении В29, где модифицирующая группировка имеет следующую структуру:



Данные способы давали три основных типа катионных комплексов твердых конъюгатов соединений инсулинов: комплекс "Т-типа" и "R-типа" и "протаминовый" комплекс.

9.1. Получение и анализ твердых веществ Т-типа

9.1.1. Попытка получения Zn-комплекса HIM2 Т-типа (2 г/л)

Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 2 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Ледяную уксусную кислоту добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 10 мл (20 мг белка) до конечной концентрации 0,25 М. К данному образцу добавляли двадцать (или сорок) мкл 2% (масс./масс.) раствора $ZnCl_2$. pH доводили до 5,1 (или 5,5) концентрированным гидроксидом аммония. Раствор перемешивали в течение 15 минут при комнатной температуре (или +5°C) и затем оставляли стоять в течение одних суток при комнатной температуре (или +5°C), чтобы дать возможность образоваться твердому веществу. После того, как реакции позволили стоять одни сутки при комнатной температуре (или при +5°C), не образовалось никаких кристаллов или осадка. См. Пример 2 патента США № 5504188 под названием "Preparation of stable zinc insulin compound analog crystals".

9.1.2. Zn-комплекс HIM2 Т-типа (концентрация 10 г/л)

Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 10 г/л доводили 10% HCl до получения конечного pH примерно 3. Ледяную уксусную кислоту добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 10 мл (100 мг белка) до конечной концентрации 0,25 М. К данному образцу добавляли сорок мкл 10% (масс./масс.) раствора $ZnCl_2$. pH доводили до 5,2 концентрированным гидроксидом аммония. Раствор перемешивали в течение 15 минут при +5°C и затем оставляли стоять в течение пять суток при +5°C, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 5 мл холодной DI (деионизированной) воды. Этот раствор центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут перед тем, как декантировать воду, и твердые вещества промывали дополнительно 5 мл холодной DI воды. Снова образец

центрифугировали приблизительно при 2000 об/мин в течение приблизительно 10 минут перед тем, как декантировать H₂O. Образец промывали 5 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут перед тем, как декантировать EtOH. Образец сушили в лиофилизаторе с получением белого твердого вещества.

9.1.3. Zn-комплекс HIM2 Т-типа (концентрация 20 г/л)

Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 20 г/л довели 10% HCl до получения конечного pH примерно 3. Ледяную уксусную кислоту добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 10 мл (200 мг белка) до конечной концентрации 0,25 М. К данному образцу добавляли восемьдесят мкл 10% (масс./масс.) раствора ZnCl₂. pH довели до 5,37 концентрированным гидроксидом аммония. Раствор перемешивали в течение 15 минут при +5°C и затем оставляли стоять в течение четырех суток при +5°C, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 5 мл холодной DI воды. Раствор центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать воду, и твердые вещества промывали дополнительно 5 мл холодной DI воды. Снова образец центрифугировали приблизительно при 2600 об/мин в течение приблизительно 20 минут перед тем, как декантировать H₂O. Образец промывали 5 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать EtOH. Образец сушили в лиофилизаторе с получением белого твердого вещества.

9.1.4. Zn-комплекс HIM2 Т-типа (концентрация 30 г/л)

Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 30 г/л довели 10% HCl до получения конечного pH примерно 3. Ледяную уксусную кислоту добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 50 мл (1,5 г белка) до конечной концентрации 0,25 М. К данному образцу добавляли шестьсот мкл 10% (масс./масс.) раствора ZnCl₂. pH довели до 5,34 концентрированным гидроксидом аммония. Раствор оставляли стоять при +5°C в течение пяти суток, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

5 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали три раза 10 мл холодной DI
10 воды, центрифугируя и декантируя H₂O при каждой промывке. Образец затем промывали три раза 10 мл стандартного холодного EtOH 200. Его центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут и декантировали после
15 каждой промывки образец. Образец сушили в лиофилизаторе с получением белого твердого вещества.

15 На фиг. 1 и 2 представлены микрофотографии, полученные с использованием микроскопа Zeiss Axiovert, показывающие кристаллы, выросшие в течение 24 часов. На фиг. 1 размер кристалла составляет
20 приблизительно 11,3 мкм в длину и приблизительно 5,3 мкм в диаметре. На фиг. 2 размер кристалла слева составляет приблизительно 15,1 мкм в длину и приблизительно 5,9 мкм в диаметре, а размер кристалла справа составляет
25 приблизительно 9,1 мкм в длину и приблизительно 5,3 мкм в диаметре. На фиг. 3 представлена микрофотография, полученная с использованием микроскопа Zeiss Axiovert, показывающая кристаллы, выросшие в течение 5 суток. В одном
30 аспекте изобретение включает кристаллы, имеющие такую морфологию, как показано на фиг. 1, 2 или 3.

30 9.1.5. Zn-комплекс HIM2 T-типа (концентрация 50 г/л)

35 Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 50 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Ледяную уксусную кислоту добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 10 мл до конечной концентрации 0,25 М. К
40 данному образцу добавляли двести мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. pH доводили до 5,23 концентрированным гидроксидом аммония. Раствор перемешивали при +5°C в течение 15 минут и затем оставляли стоять в течение четырех суток при
45 +5°C, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

45 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 5 мл холодной DI H₂O. Раствор
50 центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H₂O, и твердое вещество промывали дополнительно 5 мл холодной DI H₂O. Снова образец центрифугировали при 2600 об/мин в течение

20 минут перед тем, как декантировать H_2O . Образец промывали 5 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать EtOH. Образец сушили в лиофилизаторе в течение трех суток.

9.1.6. Zn-комплекс HIM2 Т-типа (масштаб 1 г)

Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 10 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Ледяную уксусную кислоту добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 50 мл (500 мг белка) до конечной концентрации 0,25 М. К данному образцу добавляли двести мкл 10%-ного раствора $ZnCl_2$. pH доводили до 5,49 концентрированным гидроксидом аммония. Раствор перемешивали при $+5^\circ C$ в течение 15 минут и затем оставляли стоять при $+5^\circ C$ в течение семи суток, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 10 мл холодной DI H_2O . Раствор центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H_2O . Промывки водой повторяли еще два раза. Образец затем промывали 10 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать EtOH. Таким же образом осуществляли еще две промывки EtOH перед тем, как образец помещали сушиться в лиофилизатор на четверо суток.

9.1.7. Zn-комплекс HIM2 Т-типа при нейтральном pH (масштаб 5 г)

Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 10 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. К данному образцу добавляли два миллилитра 10%-ного раствора $ZnCl_2$. pH доводили до 7,05 концентрированным гидроксидом аммония. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

Молочную реакционную смесь Zn-HIM2 (500 мл) добавляли частями в воронку объемом 350 мл с пористым (4,5-5 мкм) диском (ChemGlass CG1402-28, диаметр 90 мм). Фильтрат собирали в колбу с боковым отводом в течение приблизительно 4-6 ч, создавая в ней вакуум. В качестве одного из вариантов, осадок можно промыть 100 мл холодного 1% $ZnCl_2$, и фильтрат можно собрать

отдельно. Осадок промывали 100 мл ледяной воды, и фильтрат снова собирали. Осадок также дополнительно промывали 100 мл ледяного 100% этанола, и фильтрат собирали еще раз. Конечную промывку осадка осуществляли 100 мл свежей ледяной воды и собирали конечный фильтрат. Осадок сушили под вакуумом и/или сушили на воздухе в течение 12-18 ч. После сушки осадок соскребали с воронки, взвешивали и измеряли содержания влажности/белка посредством ВЭЖХ. Фильтраты, собранные на разных стадиях промывки, также анализировали с помощью ВЭЖХ для того, чтобы определить концентрацию потерянного Zn-NIM2 во время процесса. В результате фильтрации получали 2,5% (масс./масс.) содержание Zn с общим выходом 98%.

9.1.8. Zn-комплекс NIM2 T-типа при нейтральном pH (масштаб 500 мг)

Раствор NIM2 в концентрации приблизительно 10 г/л довели 10% HCl до конечного pH примерно 3. К данному образцу добавляли двести мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. pH довели до 7,06 концентрированным гидроксидом аммония. Раствор перемешивали при +5°C в течение 15 минут и затем оставляли стоять при +5°C в течение двух суток, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 10 мл холодной DI H₂O. Раствор центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут перед тем, как декантировать H₂O. Промывки водой повторяли еще два раза. Образец затем промывали 10 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать EtOH. Таким же образом осуществляли еще две промывки EtOH перед тем, как образец помещали сушиться в лиофилизатор на двое суток.

9.1.9 Результаты для твердых композиций Т-типа

Реакция	Наблюдения	Растворимость мг/мл	% (масс./масс.) Zn
9.1.1	Твердое вещество не сформировано	N/A	N/A
9.1.2	Белое твердое вещество	NEM	NEM
9.1.3	Белое твердое вещество	NEM	NEM
9.1.4	Белое твердое вещество	NEM	0,53
9.1.5	Белое твердое вещество	146	0,66
9.1.6	Белое твердое вещество	109	0,55
9.1.7	Белое твердое вещество	ND	2,50
9.1.8	Белое твердое вещество	ND	1,63

N/A = не анализировали

NEM = недостаточно вещества

ND = нет данных

9.1. Получение и анализ твердых веществ R-типа

9.2.1. Zn-комплекс HIM2 R-типа с фенолом при концентрации 2 г/л

Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 2 г/л доводили ледяной уксусной кислотой до конечного pH примерно 3. Тридцать три мкл жидкого фенола добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 10 мл. pH доводили до 5,89 концентрированным гидроксидом аммония. К данному образцу добавляли сто шестьдесят мкл 10% (масс./масс.) раствора ZnCl₂. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут и затем оставляли стоять при комнатной температуре в течение трех суток, чтобы дать возможность сформироваться большему количеству осадка.

Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 3400 об/мин в течение 15 минут. Супернатант декантировали, и твердое вещество промывали 5 мл холодной DI воды. Образец затем промывали 5 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 3200 об/мин в течение 15 минут перед тем, как декантировать EtOH. Образец снова промывали 5 мл холодного EtOH, однако его не центрифугировали. Твердому веществу давали возможность осесть на дно пробирки и затем помещали в быструю вакуумную сушилку для сушки.

9.2.2. Получение Zn-комплекса HIM2 R-типа при концентрации 20 г/л

5 Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 20 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Шестьдесят шесть мкл жидкого фенола добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 10 мл. pH доводили до 6,43 концентрированным гидроксидом аммония. К данному образцу добавляли триста двадцать мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут и затем оставляли стоять при комнатной температуре в течение четырех суток, чтобы дать возможность сформироваться большему количеству осадка.

15 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 5 мл холодной DI H₂O. Раствор центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H₂O, и твердое вещество промывали дополнительно 5 мл холодной DI H₂O. Образец снова центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H₂O. Образец промывали 5 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать EtOH. Образец подвергали лиофилизации в течение трех суток.

9.2.3. Получение Zn-комплекса HIM2 R-типа при концентрации 30 г/л

30 Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 30 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Девяносто девять мкл жидкого фенола добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 10 мл. pH доводили до 6,47 концентрированным гидроксидом аммония. Затем к данному образцу добавляли 480 мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут и затем оставляли стоять при комнатной температуре в течение четырех суток, чтобы дать возможность сформироваться большему количеству осадка.

45 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 5 мл холодной DI H₂O. Раствор центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H₂O, и твердое вещество промывали дополнительно 5 мл

холодной DI H₂O. Образец снова центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H₂O. Образец промывали 5 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать EtOH. Образец подвергали лиофилизации в течение трех суток.

На **фиг. 4** показано твердое вещество, образовавшееся в течение 4 суток. Фотография получена с использованием микроскопа Zeiss Axiovert. Средняя длина кристаллов составляет приблизительно 9,7 мкм.

9.2.4. Получение Zn-комплекса HIM2 R-типа при концентрации 50 г/л

Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 50 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Сто шестьдесят пять мкл жидкого фенола добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 10 мл. pH доводили до 6,82 концентрированным гидроксидом аммония. К данному образцу добавляли восемьсот мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут и затем оставляли стоять при комнатной температуре в течение четырех суток, чтобы дать возможность сформироваться большему количеству осадка.

Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 5 мл холодной DI H₂O. Раствор центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H₂O, и твердое вещество промывали дополнительно 5 мл холодной DI H₂O. Образец снова центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H₂O. Образец промывали 5 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать EtOH. Образец подвергали лиофилизации в течение трех суток.

9.2.5. Получение Zn-комплекса HIM2 R-типа в масштабе 1 г

Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 10 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Сто шестьдесят пять мкл жидкого фенола добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 50 мл. pH доводили до 6,42 концентрированным гидроксидом аммония. К данному образцу добавляли восемьсот мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. Раствор перемешивали при

комнатной температуре в течение 15 минут и затем оставляли стоять при комнатной температуре в течение семи суток, чтобы дать возможность сформироваться большему количеству осадка.

5 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 10 мл холодной DI H₂O. 10 Раствор центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H₂O. Таким же образом осуществляли еще две промывки водой. Образец затем промывали 10 мл стандартного холодного EtOH 200 и 15 центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать EtOH. Таким же образом осуществляли еще две промывки EtOH перед тем, как поместить образец в лиофилизатор на четверо суток.

20 9.2.6. Zn-комплекс HIM2 R-типа в масштабе 5 г

20 Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 10 г/л довели 10% HCl до конечного pH примерно 3. Одну тысячу пятьсот мкл жидкого фенола добавляли к 450 мкл вышеуказанного раствора. pH довели до 7,1 25 концентрированным гидроксидом аммония. К данному образцу добавляли одну тысячу восемьсот мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут и затем оставляли стоять при 30 комнатной температуре в течение ночи, чтобы дать возможность сформироваться большему количеству осадка.

Полученную выше реакционную смесь разделяли на три пробы для 35 фильтрации. Реакционную смесь из первой пробы фильтровали через мелкопористую воронку и затем промывали 1%-ным раствором ZnCl₂. Вещество сушили в течение ночи путем вакуумной фильтрации. Вторую пробу фильтровали через среднепористый фильтр, который также содержал 40 фильтровальную бумагу. Вещество затем промывали этанолом и водой и сушили в течение ночи путем вакуумной фильтрации. Наконец, третью пробу фильтровали через мелкопористую воронку, промывали 1%-ным раствором 45 ZnCl₂ и также промывали этанолом и водой. Вещество также сушили в течение ночи путем вакуумной фильтрации.

50

	Проба 1 (мелкопорист., ZnCl ₂ промывка, нет H ₂ O/EtOH промывки)	Проба 2 (фильтровальная бумага, среднепорист., EtOH/H ₂ O промывка)	Проба 3 (мелкопорист., EtOH/H ₂ O промывки)
Выход	74%	93%	58%
% (масс./масс.) Zn	1,99	2,83	2,06%
% (масс./масс.) фенола	0,033	0,45	1,28

9.2.7. Zn-комплекс HIM2 R-типа при нейтральном pH

Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 10 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Сто шестьдесят пять мкл жидкого фенола добавляли к 50 мл вышеуказанного раствора. Затем к данному образцу добавляли двести мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. pH доводили до 7,18 концентрированным гидроксидом аммония. Раствор находился при комнатной температуре в течение двух суток, чтобы дать возможность сформироваться осадку.

Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 20 минут. Однако сначала вещество не оседало на дно пробирки, и поэтому его центрифугировали в течение приблизительно 2 ч. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 5 мл холодной DI H₂O. Раствор центрифугировали при 2800 об/мин в течение 60 минут перед тем, как декантировать H₂O. Промывку водой повторяли еще два раза. Образец затем промывали 5 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 60 минут перед тем, как декантировать EtOH. Таким же образом осуществляли еще две промывки EtOH. После третьей промывки EtOH реакция оставалась мутной, и ее помещали на ночь в холодильник, чтобы дать возможность продуктам реакции осесть более полно. Растворитель декантировали, и вещество помещали в лиофилизатор на 2 суток.

9.2.8. Результаты для твердых композиций R-типа

Реакция	Наблюдения	Растворимость (мг/мл)	% (масс./масс.) Zn	Фенол
5 9.2.1	Белое твердое вещество	NEM	NEM	NEM
9.2.2	Белое твердое вещество	44,75	1,21	0,097
9.2.3	Белое твердое вещество	50,49	1,74	0,41
10 9.2.4	Белое твердое вещество	36,24	2,32	0,52
9.2.5	Белое твердое вещество	47,7	1,06	0,16
9.2.6	Белое твердое вещество	ND	см. выше	см. выше
15 9.2.7	Белое твердое вещество	ND	1,74	1,62

NEM = недостаточно вещества

ND = нет данных

9.3. Получение и анализ твердых веществ с протамином

9.3.1. Получение Zn-комплекса HIM2 T-типа с протамином при кислом pH

Протамин добавляли к исходному раствору HIM2 с концентрацией 10 г/л, который имел конечный pH примерно 3, подведенный 10% HCl. Ледяную уксусную кислоту добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 10 мл (100 мг белка) до конечной концентрации 0,25 М. К данному образцу добавляли двести мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. pH доводили до pH приблизительно 5 концентрированным гидроксидом аммония. Раствор перемешивали при +5°C в течение 15 минут и затем оставляли стоять при +5°C в течение двух суток, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 10 мл холодной DI H₂O. Раствор центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H₂O. Таким же образом осуществляли еще две промывки H₂O. Образец затем промывали 10 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать EtOH. Таким же образом осуществляли еще две промывки EtOH перед тем, как поместить образец в лиофилизатор на двое суток.

9.3.2. Получение Zn-комплекса HIM2 T-типа с протамином при нейтральном pH

5 Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 30 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Один миллилитр ледяной уксусной кислоты добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 50 мл (1,5 г белка). К данной реакции добавляли шестьсот мкл 10%-ного раствора ZnCl₂ с 10 последующим добавлением 225 миллиграммов протамина. pH доводили до 6,95 концентрированным гидроксидом аммония, и реакцию оставляли стоять в течение двух суток при +5°C, чтобы дать возможность образоваться твердому 15 веществу.

Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 10 мл холодной DI H₂O. 20 Раствор центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H₂O. Таким же образом осуществляли еще две промывки H₂O. Образец затем промывали 10 мл стандартного холодного EtOH 200 и 25 центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать EtOH. Таким же образом осуществляли еще две промывки EtOH перед тем, как поместить образец в лиофилизатор на трое суток.

9.3.3. Получение Zn-комплекса HIM2 R-типа с протамином при кислом pH

30 Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 10 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Жидкий фенол (2,48 мл) добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 150 мл (1,5 г белка). pH реакции доводили 35 концентрированным гидроксидом аммония до pH примерно 6,57. К этой реакции добавляли двенадцать мкл 10%-ного раствора ZnCl₂ с последующим добавлением 225 миллиграммов протамина. Реакционную смесь 40 перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут перед тем, как ее оставляли стоять в течение двух суток при комнатной температуре, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

45 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 50 мл холодной DI H₂O. Раствор центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут перед тем, как 50

5 декантировать H₂O. Таким же образом осуществляли еще две промывки H₂O. Образец затем промывали 10 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут перед тем, как
 10 декантировать EtOH. Таким же образом осуществляли еще две промывки EtOH перед тем, как поместить образец в лиофилизатор на двое суток.

9.3.4. Получение Zn-комплекса HIM2 R-типа с протамином при 15 нейтральном pH

20 Раствор HIM2 в концентрации приблизительно 10 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Жидкий фенол (495 мл) добавляли к 150 мл реакции. Затем к реакции добавляли 600 мкл 10%-ного раствора ZnCl₂ с последующим добавлением 75 мг протаминa. pH доводили концентрированным гидроксидом аммония до pH 7,01. Реакцию оставляли стоять в течение трех
 25 суток при комнатной температуре, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

30 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 50 мл холодной DI H₂O. Раствор центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут перед тем, как
 35 декантировать H₂O. Таким же образом осуществляли еще две промывки H₂O. Образец затем промывали 50 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут перед тем, как
 40 декантировать EtOH. Таким же образом осуществляли еще две промывки EtOH перед тем, как поместить образец в лиофилизатор на двое суток.

9.3.5. Результаты для твердых композиций с протамином

Реакция	Наблюдения	Растворимость (мг/мл)	% (масс./масс.) Zn	Фенол
9.3.1	Белое твердое вещество	ND	0,66	N/A
9.3.2	Белое твердое вещество	ND	2,47	N/A
9.3.3	Белое твердое вещество	36,78	1,22	9,87
9.3.4	Белое твердое вещество	NEM	NEM	NEM

45 NEM = недостаточно вещества

ND = нет данных

9.4. Получение и анализ комплексов диконъюгатов соединений инсулинов

9.4.1. Zn-комплекс Т-типа (А1 и В29)-диконъюгата соединения инсулина

5 Диконъюгат соединения инсулина, содержащий модифицирующую группировку $-C(O)(CH_2)_5(OCH_2CH_2)_7OCH_3$, связанную в положениях В29 и А1
10 инсулина человека (DICON-1), добавляли к раствору в концентрации приблизительно 10 г/л и доводили 10% HCl до конечного pH 3,15. Ледяную уксусную кислоту добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 3,75 мл до конечной концентрации 0,25 М. Затем к данному образцу добавляли 15 мкл 10%-ного раствора $ZnCl_2$. pH доводили до pH 4,90 концентрированным гидроксидом аммония. Раствор перемешивали в течение 15 минут при $+5^\circ C$ и
15 затем оставляли стоять в течение шести суток при $+5^\circ C$, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу (с выходом белого твердого вещества).

9.4.2. Zn-комплекс R-типа (А1 и В29)-диконъюгата соединения инсулина

20 DICON-1 добавляли к раствору в концентрации приблизительно 10 г/л и доводили 10% HCl до конечного pH 3,15. Приблизительно 12 мкл жидкого
25 фенола добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 3,75 мл. pH доводили до 5,75 концентрированным гидроксидом аммония. К данному образцу добавляли 60 мкл 10%-ного раствора $ZnCl_2$. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут и затем оставляли стоять при
30 комнатной температуре в течение шести суток, чтобы дать возможность сформироваться большему количеству осадка (с выходом белого твердого вещества).

35 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 5 мл холодной DI H_2O . Раствор
40 центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H_2O , и твердое вещество промывали дополнительно 5 мл холодной DI H_2O . Образец снова центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать H_2O . Образец промывали 5 мл
45 стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2600 об/мин в течение 20 минут перед тем, как декантировать EtOH. Образец подвергали лиофилизации в течение шести суток.

50

9.4.3. Диконъюгат В1, В29 (10 мг/мл)

5 DICON-1 добавляли к раствору в концентрации приблизительно 10 г/л и добавляли 33 мкл жидкого фенола. pH доводили до 5,34 концентрированным гидроксидом аммония. Затем к данному образцу добавляли 160 мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. Раствор оставляли стоять при комнатной температуре в течение двух недель, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу (с выходом белого твердого вещества).

10 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали три раза 5 мл холодной DI H₂O. Раствор центрифугировали в течение 15 минут при 2800 об/мин и декантировали после каждой промывки. Образец затем промывали три раза 5 мл стандартного холодного EtOH 200. Образец снова центрифугировали при 2600 об/мин в течение 15 минут и декантировали после каждой промывки. Образец подвергали лиофилизации в течение двух суток.

9.4.4. Диконъюгат В1, В29 (20 мг/мл)

25 DICON-1 добавляли к раствору в концентрации приблизительно 20 г/л и добавляли 66 мкл жидкого фенола. pH доводили до 7,65 концентрированным гидроксидом аммония. Затем к данному образцу добавляли 320 мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. Раствор оставляли стоять при комнатной температуре в течение двух недель, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу (с выходом белого твердого вещества).

35 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали три раза 5 мл холодной DI H₂O. Раствор центрифугировали в течение 15 минут при 2800 об/мин и декантировали после каждой промывки. Образец затем промывали три раза 5 мл стандартного холодного EtOH 200. Образец снова центрифугировали при 2600 об/мин в течение 15 минут и декантировали после каждой промывки. Образец подвергали лиофилизации в течение двух суток.

9.5. Получение и анализ твердых веществ IN105 Т-типа

9.5.1. Zn-комплекс Т-типа моноконъюгата IN105 (концентрация 10 г/л)

5 Раствор IN105 в концентрации приблизительно 10 г/л (100 мг) доводили 10% HCl до получения конечного pH примерно 3. К данному образцу добавляли 50 мкл 10%-ного раствора (масс./сассу) ZnCl₂. pH доводили до 7,52 концентрированным гидроксидом аммония. Мутный раствор перемешивали и 10 затем оставляли стоять в течение пяти суток при комнатной температуре, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и 15 центрифугировали при 2900 об/мин в течение 15 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 3x10 мл холодной DI воды. Раствор центрифугировали при 2900 об/мин в течение 10 минут перед тем, как 20 декантировать воду, и твердые вещества промывали новой порцией холодной DI воды. Образец затем промывали 3x10 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2900 об/мин в течение 10 минут перед тем, как декантировать EtOH. Образец сушили под вакуумом с получением белого 25 твердого вещества (90 мг).

9.5.2. Zn-комплекс Т-типа моноконъюгата IN105 (масштаб 1 г)

30 Раствор IN105 в концентрации приблизительно 10 г/л (1 г) доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. К данному образцу добавляли пятьсот мкл 10%-ного раствора ZnCl₂. pH доводили до примерно 7,4 концентрированным гидроксидом аммония. Мутный раствор перемешивали в течение 15 минут и 35 затем оставляли стоять при комнатной температуре в течение примерно 2 суток перед фильтрацией.

40 Реакционную смесь фильтровали через воронку с пористым стеклом (мелкопористым) под вакуумом. Воронку с пористым стеклом с отфильтрованным веществом выдерживали в стеклянном эксикаторе под вакуумом в течение ночи с получением белого тонкого порошка (900 мг).

9.5.3. Zn-комплекс Т-типа моноконъюгата IN105 при нейтральном pH (масштаб 5 г)

45 Раствор IN105 в концентрации приблизительно 10 г/л (5 г, lot#Nobex040706L) доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. К данному образцу добавляли два миллилитра 10%-ного раствора ZnCl₂. pH доводили до 50

примерно 7,4 концентрированным гидроксидом аммония. Затем мутный раствор оставляли стоять при комнатной температуре в течение ночи, чтобы
 5 дать возможность образоваться твердому веществу перед фильтрацией.

Полученную выше реакцию распределяли в 4x50 мл центрифужные пробирки и сначала центрифугировали при 3200 об/мин в целом в течение 2 ч. Затем вещество центрифугировали при 9000 об/мин в течение 20 минут и
 10 хранили при 5°C в течение ночи. Супернатант декантировали, и твердое вещество в каждой пробирке промывали 10 мл холодной DI H₂O. Пробирки переворачивали и центрифугировали при 3200 об/мин в течение примерно 1 ч
 15 перед тем, как декантировать H₂O, и твердые вещества промывали дополнительно 10 мл холодной DI H₂O. Образец снова центрифугировали при 3200 об/мин в течение примерно 1 ч перед тем, как декантировать H₂O. Образец промывали 2x10 мл стандартного холодного EtOH 200 и
 20 центрифугировали при 3200 об/мин в течение 1 ч перед тем, как декантировать EtOH. Образец сушили под вакуумом в течение двух суток с получением 1,64 г (lot#Nobex040730L-A) белого порошка.

9.5.4. Результаты для твердых композиций IN105 T-типа

Реакция	Наблюдения	Растворимость (мг/мл) в 0,1 М фосфатном буфере, pH приблизительно 7,4	% (масс./масс.) Zn
9.5.1	Белое твердое вещество	80-85	0,0
9.5.2	Белое твердое вещество	10-20	1,67
9.5.3	Белое твердое вещество	ND	1,88

9.6. Получение и анализ твердых веществ IN105 R-типа

9.6.1. Zn-комплекс R-типа конъюгата IN105 с фенолом при нейтральном pH

Раствор IN105 в концентрации приблизительно 10 г/л (500 мг) довели до
 40 10% HCl до конечного pH примерно 3. К вышеуказанному раствору добавляли двести мкл 10%-ного раствора ZnCl₂ и 165 мкл жидкого фенола. pH довели до примерно 7,37 концентрированным гидроксидом аммония. Мутный раствор находился при комнатной температуре в течение 2 суток для того, чтобы дать
 45 возможность образоваться твердому веществу перед фильтрацией.

Реакционную смесь фильтровали через воронку с пористым стеклом (мелкопористым) под вакуумом. Воронку с пористым стеклом с
 50

отфильтрованным веществом выдерживали в стеклянном эксикаторе под вакуумом в течение ночи с получением белого тонкого порошка (440 мг).

9.6.2. Zn-комплекс R-типа конъюгата IN105 в масштабе 5 г

Раствор IN105 в концентрации приблизительно 10 г/л (4,2 г, lot#Nobex040706L) доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. К вышеуказанному раствору добавляли 1,5 жидкого фенола и 1,8 мл 10%-ного раствора ZnCl₂ и 165 мкл. pH доводили до примерно 7,4 концентрированным гидроксидом аммония. Данный очень мутный раствор оставляли стоять при комнатной температуре в течение ночи, чтобы дать возможность сформироваться большему количеству осадка.

Полученную выше реакцию распределяли в 4x50 мл центрифужные пробирки и сначала центрифугировали при 3200 об/мин в целом в течение 2 ч. Затем вещество центрифугировали при 9000 об/мин в течение 20 минут и хранили при 5°C в течение ночи. Супернатант декантировали, и твердое вещество в каждой пробирке промывали 10 мл холодной DI H₂O. Пробирки переворачивали и центрифугировали при 3200 об/мин в течение примерно 1 ч перед тем, как декантировать H₂O, и твердые вещества промывали дополнительно 10 мл холодной DI H₂O. Образец снова центрифугировали при 3200 об/мин в течение примерно 1 ч перед тем, как декантировать H₂O. Образец промывали 2x10 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 3200 об/мин в течение 1 ч перед тем, как декантировать EtOH. Образец сушили под вакуумом в течение 2 суток с получением 2,34 г белого порошка.

9.6.3. Результаты для твердых композиций IN105 R-типа

Реакция	Наблюдения	Растворимость (мг/мл)*	% (масс./масс.) Zn	% (масс./масс.) фенола
9.6.1	Белое твердое вещество	ND	1,85	2,37
9.6.2	Белое твердое вещество	10-25	1,71	2,66

ND = нет данных

* В фосфатном буфере, pH приблизительно 7,4

9.7. Получение и анализ твердых веществ IN105 с протамином

9.7.1. Получение Zn-комплекса R-типа моноконъюгата IN105 с протамином при кислом pH

5 Раствор IN105 в концентрации приблизительно 10 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Жидкий фенол (248 мкл) добавляли к аликвоте вышеуказанного раствора объемом 15 мл (150 мг белка). pH реакции доводили
10 концентрированным гидроксидом аммония до pH примерно 6,50. К этой реакции добавляли один мкл 10%-ного раствора ZnCl₂ с последующим добавлением 22,5 миллиграмма протамина. Реакционную смесь перемешивали при
15 комнатной температуре в течение 15 минут перед тем, как ее оставляли стоять в течение двух суток при комнатной температуре, чтобы дать возможность образоваться твердому веществу.

20 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 5 мл холодной DI H₂O. Раствор центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут перед тем, как
25 декантировать H₂O. Таким же образом осуществляли еще две промывки H₂O. Образец затем промывали 10 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут перед тем, как
30 декантировать EtOH. Таким же образом осуществляли еще две промывки EtOH перед тем, как образец сушили под вакуумом в течение двух суток.

9.7.2. Получение Zn-комплекса R-типа конъюгата IN105 с протамином при нейтральном pH

35 Раствор IN105 в концентрации приблизительно 10 г/л доводили 10% HCl до конечного pH примерно 3. Жидкий фенол (49,5 мкл) добавляли к реакции объемом 15 мл. Затем к реакции добавляли 60 мкл 10%-ного раствора ZnCl₂ с
40 последующим добавлением 7,5 мг протамина. pH доводили концентрированным гидроксидом аммония до pH 7,00. Реакцию оставляли стоять в течение трех суток при комнатной температуре, чтобы дать
45 возможность образоваться твердому веществу.

50 Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут. Раствор декантировали, и твердое вещество промывали 5,0 мл холодной DI H₂O.

5 Раствор центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут перед тем, как декантировать H₂O. Таким же образом осуществляли еще две промывки H₂O. Образец затем промывали 50 мл стандартного холодного EtOH 200 и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут перед тем, как декантировать EtOH. Таким же образом осуществляли еще две промывки EtOH перед тем, как образец сушили под вакуумом в течение двух суток.

10 9.7.3. Получение кристаллического Zn-комплекса IN105 R-типа

15 Неочищенный раствор IN105 в концентрации 15 мг/мл, содержащий 25% органического вещества, доводили до pH 3,47 с помощью 1 М HCl. Твердый фенол плавил на водяной бане при 40-60°C, и 0,218 мл добавляли в реакционную колбу. Затем к реакции добавляли 0,4 мл 4%-ного подкисленного водного раствора ZnCl₂. pH раствора доводили 1 М NaOH до конечного pH 6,6. Во время подведения pH отбирали аликвоты объемом 10 мл при следующих значениях pH: 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8; 6,0; 6,2; 6,4 и 6,6. Данные образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. Под микроскопом наблюдали иглоподобные кристаллы.

25 9.7.4. Получение кристаллического Zn-комплекса IN105 R-типа, содержащего 30% органического вещества

30 Свежий раствор соединения MPEG₃-пропионилинсулина в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,81 с помощью 1 М HCl. К данному раствору добавляли 0,040 мл жидкого фенола и 4,25 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 0,400 мл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,7 до 5,4, используя 50% NH₄OH, и отбирали аликвоты объемом 1 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4. Образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны иглообразные кристаллы (смотри фиг. 5) для pH в диапазоне от 4,0 до 5,2.

45 9.7.5. Получение кристаллического Zn-комплекса IN105 R-типа в 100 мМ аммоний-ацетатном буфере (30, 20 и 10% EtOH)

50 Свежий раствор соединения MPEG₃-пропионилинсулина в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 100 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,8 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 0,040 мл жидкого

5 фенола и 4,25 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 0,400
мл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 2,9
до 5,6 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,5 мл при каждом
10 из следующих желательных значений pH: 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6. Эти
образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках,
полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны иглообразные
15 кристаллы для pH в диапазоне от 4,4 до 4,8.

Свежий раствор соединения MPEG₃-пропионилинсулина в концентрации
15 мг/мл приготавливали в 100 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили
до 2,8 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 0,040 мл жидкого
фенола и 95% EtOH, 2,25 мл. Затем к этой реакционной смеси добавляли 0,400
мл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 2,9
до 5,6 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,5 мл при каждом
20 из следующих желательных значений pH: 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6. Эти
образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках,
полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны сферообразные
25 кристаллы для pH в диапазоне от 4,8 до 5,4.

Свежий раствор соединения MPEG₃-пропионилинсулина в концентрации
15 мг/мл приготавливали в 100 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили
30 до 2,8 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 0,040 мл жидкого
фенола и 1,15 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 0,400
мл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 2,8
до 5,6 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,5 мл при каждом
35 из следующих желательных значений pH: 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6. Эти
образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках,
полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны иглообразные
40 кристаллы для pH в диапазоне от 5,0 до 5,6.

9.7.6. Получение кристаллического Zn-комплекса IN105 R-типа в 20% органического вещества с 0,1 и 0,2% фенола

45 Свежий раствор соединения MPEG₃-пропионилинсулина в концентрации
15 мг/мл приготавливали в 100 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили
до 3,0 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 0,010 мл жидкого
фенола и 2,5 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 0,400
50

мл 4%-ного подкисленного раствора $ZnCl_2$. pH раствора корректировали от 3,2 до 5,6 с помощью 5 М NH_4OH и отбирали аликвоты объемом 0,5 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны сферообразные кристаллы для pH в диапазоне от 4,4 до 5,4.

Свежий раствор соединения MPEG₃-пропионилинсулина в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 100 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 3,0 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 0,020 мл жидкого фенола и 2,5 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 0,400 мл 4%-ного подкисленного раствора $ZnCl_2$. pH раствора корректировали от 3,3 до 5,6 с помощью 5 М NH_4OH и отбирали аликвоты объемом 0,5 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны сферообразные кристаллы для pH в диапазоне от 4,4 до 5,2.

9.7.7. Получение кристаллического Zn-комплекса IN105 R-типа в масштабе 8,0 граммов при pH 4,8 и комнатной температуре

Свежий раствор соединения MPEG₃-пропионилинсулина в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,0 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 2,13 мл жидкого фенола и 225 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 21,3 мл 4%-ного подкисленного раствора $ZnCl_2$. pH раствора доводили до 4,8 с помощью 5 М NH_4OH . Раствор оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч перед тем, как собирать кристаллы. На снимках, полученных с помощью микроскопа, были видны иглообразные кристаллы при T=0.

Кристаллы собирали путем распределения реакционной смеси в 6 x 250 мл центрифужных пробирок. Пробирки центрифугировали при 10000 об/мин в течение 8 минут при 10°C перед тем, как декантировать супернатант. Затем, перед объединением содержимого 6 пробирок в 2 пробирках, в каждую пробирку добавляли 10 мл холодной H_2O . Процесс центрифугирования повторяли еще раз с холодной водой и два раза с холодным EtOH. Кристаллы

затем сушили в настольном лиофилизаторе в течение 2 суток. Данный способ давал выход 93% (масс./масс.) относительно исходного вещества.

9.7.8. Получение кристаллического Zn-комплекса IN105 R-типа в масштабе 1,5 грамма при pH 4,8 и комнатной температуре

Свежий раствор соединения MPEG₃-пропионилинсулина (IN105) приготавливали путем растворения 1,52 г твердого IN105 в 100 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 2,8 с помощью 5 М HCl / 5 М NH₄OH. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 400 мкл жидкого фенола и 42,5 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 4 мл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Полученный раствор затем доводили до pH 4,8 с помощью 5 М NH₄OH. Реакцию затем оставляли стоять без перемешивания в течение 48 ч перед тем, как собирать кристаллы. Образование иглообразных кристаллов наблюдали через 21 час через микроскоп.

Кристаллы собирали путем распределения реакционной смеси в 4 x 50 мл центрифужные пробирки. Сначала пробирки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 8 минут. Затем декантировали супернатант. Кристаллы в каждой из пробирок промывали 1 x 5 мл аликвотой ледяной H₂O, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 8 минут. Затем декантировали супернатант. Процедуру промывки/центрифугирования повторяли с 1 x 5 мл аликвотой ледяной H₂O, затем с 1 x 5 мл аликвотой ледяного EtOH. Кристаллы затем сушили в вакуумном эксикаторе в течение ночи. Способ давал выход 73% (масс./масс.) относительно исходного вещества.

9.7.9. Получение кристаллического Zn-комплекса IN105 R-типа в масштабе 1,5 грамма при pH 4,4 и комнатной температуре

Свежий раствор соединения MPEG₃-пропионилинсулина (IN105) приготавливали путем растворения 1,50 г твердого IN105 в 100 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 2,6 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 400 мкл жидкого фенола и 42,5 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 4 мл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Полученный раствор затем доводили до pH 4,4 с помощью 5 М NH₄OH. Реакцию затем оставляли стоять без перемешивания в течение 22 ч перед тем,

как собирать кристаллы. Смесь из образующихся иглообразных кристаллов и осадка наблюдали через 2 ч через микроскоп. Данная реакционная смесь, по-видимому, становится полностью кристаллической через 21 час (при наблюдении через микроскоп).

Кристаллы собирали путем переноса реакционной смеси в 1 x 250 мл центрифужную пробирку. Сначала пробирку центрифугировали при 10000 об/мин в течение 8 минут. Затем декантировали супернатант. Кристаллы промывали 1 x 20 мл аликвотой ледяной H₂O, затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 8 минут. Затем декантировали супернатант. Процедуру промывки/центрифугирования повторяли с 1 x 20 мл аликвотой ледяной H₂O, затем с 2 x 20 мл аликвотами ледяного EtOH и в конце с 1 x 20 мл аликвотой ледяной H₂O. Кристаллы затем сушили в вакуумном эксикаторе в течение ночи. Способ давал выход 67% (масс./масс.) относительно исходного вещества.

9.7.10. Получение кристаллического Zn-комплекса IN105 R-типа в масштабе 8 граммов при pH 4,8 и комнатной температуре

Свежий раствор соединения MPEG₃-пропионилинсулина (IN105) приготавливали путем растворения 7,98 г твердого IN105 в 533 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 2,4 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 2,13 мл жидкого фенола и 225 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 21,3 мл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Полученный раствор затем доводили до pH 4,8 с помощью 5 М NH₄OH. Реакцию затем оставляли стоять без перемешивания в течение 21 ч перед тем, как собирать кристаллы. Данная реакционная смесь, по-видимому, становится полностью кристаллической через 2 ч (при наблюдении через микроскоп).

Кристаллы собирали путем распределения реакционной смеси в 6 x 250 мл центрифужных пробирок. Сначала пробирки центрифугировали при 10000 об/мин в течение 8 минут. Затем декантировали супернатант. Кристаллы в каждой пробирке промывали 1 x 10 мл аликвотой ледяной H₂O, затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 8 минут. Затем декантировали супернатант. Процедуру промывки/центрифугирования повторяли с 1 x 10 мл аликвотой ледяной H₂O, затем с 2 x 10 мл аликвотами ледяного EtOH и в конце с 1 x 10 мл аликвотой ледяной H₂O. Кристаллы затем сушили в вакуумном

эксикаторе в течение 2 суток. Способ давал выход 87% (масс./масс.) относительно исходного вещества.

9.7.11. Получение кристаллического Zn-комплекса IN105 R-типа в масштабе 10,0 граммов при pH 4,8 и комнатной температуре

Свежий раствор соединения MPEG₃-пропионилинсулина (IN105) приготавливали путем растворения 10,06 г твердого IN105 в 670 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 2,6 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 2,7 мл жидкого фенола и 285 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 27 мл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Полученный раствор затем доводили до pH 4,8 с помощью 5 М NH₄OH. Реакцию затем оставляли стоять без перемешивания в течение 21 ч перед тем, как собирать кристаллы. Данная реакционная смесь, по-видимому, становится полностью кристаллической через 2,5 ч (при наблюдении через микроскоп).

Кристаллы собирали путем распределения реакционной смеси в 6 x 250 мл центрифужных пробирок. Сначала пробирки центрифугировали при 10°C, 10000 об/мин в течение 8 минут. Затем декантировали супернатант. Кристаллы в каждой пробирке промывали 1 x 10 мл аликвотой ледяной H₂O и объединяли в 2 x 250 мл центрифужных пробирках, затем центрифугировали при 10°C, 10000 об/мин в течение 8 минут. Затем декантировали супернатант. Процедуру промывки/центрифугирования повторяли с 1 x 30 мл аликвотой ледяной H₂O, затем с 2 x 30 мл аликвотами ледяного EtOH и в конце с 1 x 30 мл аликвотой ледяной H₂O. Кристаллы затем сушили с помощью настольного лиофилизатора в течение 3 суток. Способ давал выход 89% (масс./масс.) относительно исходного вещества.

9.8. Получение и анализ кристаллического Zn-комплекса HIM2 с использованием органического растворителя

9.8.1. Получение Zn-комплексов HIM2 R-типа

Свежий раствор HIM2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,95 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 40 мкл жидкого фенола и 3,5 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 600 мкл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,14 до 6,0 с помощью 5 М NH₄OH и

отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,2; 4,4 (смотри фиг. 6А); 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4 (смотри Фиг. 6Б); 5,6; 5,8; 6,0. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны иглообразные кристаллы при pH 4,4. При pH в диапазоне от 4,6 до 6,0 видны большие кристаллообразные твердые частицы различных форм и размеров.

Свежий раствор НІМ2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,95 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 40 мкл жидкого фенола и 3,5 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 400 мкл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,22 до 6,0 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2 (смотри фиг. 7А); 5,4; 5,6; 5,8; 6,0. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, видны кристаллообразные твердые частицы различных форм и размеров при pH 4,2-6,0.

Свежий раствор НІМ2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,95 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 40 мкл жидкого фенола и 3,5 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 200 мкл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,19 до 6,0 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0 (смотри фиг. 7Б); 5,2; 5,4; 5,6; 5,8; 6,0. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны кристаллообразные твердые частицы различных форм и размеров при pH 4,4-4,6. При pH в диапазоне от 4,8 до 5,2 видны более однородные иглообразные кристаллы.

Свежий раствор НІМ2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,95 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 40 мкл жидкого фенола и 2,6 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 600 мкл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,04 до 6,0 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных

значений pH: 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4 (смотри **фиг. 8А**); 5,6; 5,8; 6,0. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны плоские, похожие на снежинки, кристаллы при pH 4,6-5,4.

Свежий раствор HIM2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,95 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 40 мкл жидкого фенола и 2,6 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 400 мкл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,05 до 6,0 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0 (смотри **фиг. 8Б**); 5,2; 5,4; 5,6; 5,8; 6,0. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны иглообразные кристаллы при pH 5,0, кристаллообразные твердые частицы при pH 5,2, и плоские, похожие на снежинки, кристаллы при pH 5,4.

Rxn 6 Свежий раствор HIM2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,95 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 40 мкл жидкого фенола и 2,6 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 200 мкл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,09 до 6,0 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,2; 4,4; 4,6; 4,8 (смотри **фиг. 9А**); 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8; 6,0. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны иглообразные кристаллы и кристаллообразное твердое вещество при pH 4,8-5,6.

Свежий раствор HIM2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,76 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 40 мкл жидкого фенола и 4,25 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 250 мкл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 2,97 до 5,8 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8. Эти образцы

оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, было видно образование кристаллообразного осадка при pH 4,6-5,8.

5

Свежий раствор HIM2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,76 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 40 мкл жидкого фенола и 4,25 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 200 мкл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,06 до 5,8 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4 (смотри **фиг. 9Б**); 5,6; 5,8. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, было видно образование кристаллообразного осадка при pH 4,6-5,6.

10

15

20

Свежий раствор HIM2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,76 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 40 мкл жидкого фенола и 4,25 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 150 мкл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,09 до 5,8 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны кристаллы различных размеров и форм при pH 5,0-5,2.

25

30

35

Свежий раствор HIM2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,76 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 40 мкл жидкого фенола и 4,25 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 100 мкл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,09 до 5,8 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0 (смотри **фиг. 10А**); 5,2; 5,4 (смотри **фиг. 10Б**); 5,6; 5,8. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были

40

45

50

видны иглообразные кристаллы при pH 5,0, и кристаллическое вещество различных форм и размеров при pH 5,2-5,6.

5 Свежий раствор НІМ2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,76 с помощью 5 М НСІ. К
данному раствору добавляли 20 мкл жидкого фенола и 4,25 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 250 мкл 4%-ного подкисленного
10 раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,08 до 5,8 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8. Эти образцы
15 оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, было видно образование кристаллообразного осадка при pH 4,8-5,8.

20 Свежий раствор НІМ2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,76 с помощью 5 М НСІ. К данному раствору добавляли 20 мкл жидкого фенола и 4,25 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 200 мкл 4%-ного подкисленного
25 раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,05 до 5,8 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8. Эти образцы
30 оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны очень маленькие кристаллообразные твердые частицы.

35 Свежий раствор НІМ2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,76 с помощью 5 М НСІ. К данному раствору добавляли 20 мкл жидкого фенола и 4,25 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 200 мкл 4%-ного подкисленного
40 раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,05 до 5,8 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8. Эти образцы
45 оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны очень маленькие кристаллообразные твердые частицы.

50

Свежий раствор HIM2 в концентрации 15 мг/мл приготавливали в 250 мМ аммоний-ацетатном буфере, и pH доводили до 2,76 с помощью 5 М HCl. К данному раствору добавляли 20 мкл жидкого фенола и 4,25 мл 95% EtOH. Затем к этой реакционной смеси добавляли 100 мкл 4%-ного подкисленного раствора ZnCl₂. pH раствора корректировали от 3,06 до 5,8 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 500 мкл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны очень маленькие кристаллообразные твердые частицы.

9.9. Сокристаллизация HIM2 и IN105с цинком

9.9.1. Получение сокристаллизованных Zn-комплексов HIM2 и IN105 R-типа

9.9.2. 50:50 (HIM2:IN105)

Свежий раствор HIM2 и IN105 приготавливали путем растворения 37,3 мг HIM2 и 36,4 мг IN105 в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 2,84 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл жидкого фенола и 1,75 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 80 мкл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Затем pH раствора корректировали от 3,19 до 5,60 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4 и 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 4 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 4 ч, видны кристаллы различных размеров и форм в диапазоне pH от 4,4 до 5,6.

Свежий раствор HIM2 и IN105 приготавливали путем растворения 37,1 мг HIM2 и 35,9 мг IN105 в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 3,03 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл жидкого фенола и 1,75 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 40 мкл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Затем pH раствора корректировали от 3,38 до 5,60 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0 (смотри фиг. 11А); 5,2 (смотри фиг. 11Б); 5,4 и 5,6 (смотри фиг. 12А). Эти образцы оставляли

стоять без перемешивания в течение 4 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 4 ч, видны в основном короткие иглообразные кристаллы в диапазоне рН от 4,6 до 5,6.

9.9.3. 70:30 (HIM2:IN105)

Свежий раствор HIM2 и IN105 приготавливали путем растворения 53,4 мг HIM2 и 23,2 мг IN105 в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, рН 7,5. Раствор доводили до рН 2,62 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл жидкого фенола и 1,75 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 80 мкл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Затем рН раствора корректировали от 3,02 до 5,60 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений рН: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2 (смотри фиг. 12Б); 5,4 и 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 1 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 1 час, видно образование кристаллообразного осадка различных размеров и форм в диапазоне рН от 4,6 до 5,6.

Свежий раствор HIM2 и IN105 приготавливали путем растворения 53,6 мг HIM2 и 23,5 мг IN105 в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, рН 7,5. Раствор доводили до рН 2,89 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл жидкого фенола и 1,75 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 40 мкл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Затем рН раствора корректировали от 3,28 до 5,60 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений рН: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2 (смотри фиг. 13А); 5,4 и 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 1 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 1 час, видно образование в основном кристаллообразного осадка различных размеров и форм в диапазоне рН от 4,6 до 4,8 и большое количество коротких иглообразных кристаллов в диапазоне рН от 5,0 до 5,4.

9.9.4. 30:70 (HIM2:IN105)

Свежий раствор HIM2 и IN105 приготавливали путем растворения 23,3 мг HIM2 и 54,7 мг IN105 в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, рН 7,5. Раствор доводили до рН 2,84 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане

при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл жидкого фенола и 1,75 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 80 мкл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Затем pH раствора корректировали от 3,27 до 5,60 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4 и 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 1 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 1 час, видно образование в основном кристаллообразного осадка различных размеров и форм в диапазоне pH от 4,4 до 5,0 и несколько иглообразных кристаллов в диапазоне pH от 5,2 до 5,6.

Свежий раствор HIM2 и IN105 приготавливали путем растворения 24,8 мг HIM2 и 54,9 мг IN105 в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 3,09 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл жидкого фенола и 1,75 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 40 мкл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Затем pH раствора корректировали от 3,47 до 5,60 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4 и 5,6 (смотри **фиг. 13Б**). Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 1 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 1 час, видно образование в основном кристаллообразного осадка различных размеров и круглой формы в диапазоне pH от 4,4 до 5,0 и кристаллы различных форм и размеров в диапазоне pH от 5,2 до 5,6.

9.9.5. Получение сокристаллизованных Zn-комплексов HIM2 и IN105 R-типа

9.9.6. 50:50 (HIM2:IN105)

Свежий раствор HIM2 и IN105 приготавливали путем растворения 37,4 мг HIM2 и 35,9 мг IN105 в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 2,60 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл жидкого фенола и 1,75 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 40 мкл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Затем pH раствора корректировали от 2,15 до 5,60 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4 и 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках,

полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны кристаллические твердые частицы различных форм и размеров при pH=4,6-5,6.

9.9.7. 70:30 (HIM2:IN105)

5 Свежий раствор HIM2 и IN105 приготавливали путем растворения 57,0 мг HIM2 и 24,5 мг IN105 в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 2,43 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл жидкого фенола и 1,75 мл 10 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 40 мкл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Затем pH раствора корректировали от 2,92 до 15 5,60 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6 (смотри фиг. 14А); 4,8; 5,0; 5,2; 5,4 и 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны 20 иглообразные кристаллы при pH 5,0-5,2.

9.9.8. 30:70 (HIM2:IN105)

25 Свежий раствор HIM2 и IN105 приготавливали путем растворения 24,1 мг HIM2 и 53,8 мг IN105 в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 2,35 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл жидкого фенола и 1,75 мл 30 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 40 мкл 4%-ного подкисленного водного ZnCl₂. Затем pH раствора корректировали от 2,60 до 5,60 с помощью 5 М NH₄OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0 (смотри фиг. 14Б); 35 5,2; 5,4 и 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были видны иглообразные кристаллы при pH 5,0-5,2.

40 9.9.9. Получение сокристаллизованных Zn-комплексов HIM2 и инсулина человека R-типа

9.9.10. 50:50 (HIM2:инсулин)

45 Свежий раствор HIM2 и инсулина приготавливали путем растворения 39,2 мг HIM2 и 38,7 мг инсулина в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 2,53 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в 50 теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл

жидкого фенола и 1,75 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 40 мкл 4%-ного подкисленного водного $ZnCl_2$. Затем pH раствора корректировали от 2,82 до 5,60 с помощью 5 М NH_4OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2 (смотри **фиг. 15А**); 5,4 и 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, было видно кристаллообразное твердое вещество различных форм и размеров при pH 5,2 и 5,4. Большое количество очень маленьких иглообразных кристаллов наблюдали при pH 5,6.

9.9.11. 70:30 (Н1М2:инсулин)

Свежий раствор Н1М2 и инсулина приготавливали путем растворения 56,5 мг Н1М2 и 20,2 мг инсулина в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 3,23 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл жидкого фенола и 1,75 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 40 мкл 4%-ного подкисленного водного $ZnCl_2$. Затем pH раствора корректировали от 2,82 до 5,60 с помощью 5 М NH_4OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4 и 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, было видно кристаллообразное твердое вещество различных форм и размеров при pH 5,2 и 5,6.

9.9.12. 30:70 (Н1М2:инсулин)

Свежий раствор Н1М2 и инсулина приготавливали путем растворения 21,8 мг Н1М2 и 49,2 мг инсулина в 4 мл 250 мМ ацетата аммония, pH 7,5. Раствор доводили до pH 3,23 с помощью 5 М HCl. Твердый фенол плавил в теплой водяной бане при 40-60°C. В реакционную колбу добавляли 16 мкл жидкого фенола и 1,75 мл 95% EtOH. Затем в реакционную колбу добавляли 40 мкл 4%-ного подкисленного водного $ZnCl_2$. Затем pH раствора корректировали от 2,93 до 5,60 с помощью 5 М NH_4OH и отбирали аликвоты объемом 0,500 мл при каждом из следующих желательных значений pH: 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4 (смотри **фиг. 15Б**) и 5,6. Эти образцы оставляли стоять без перемешивания в течение 24 ч. На снимках, полученных с помощью микроскопа через 24 ч, были

видны плоские, похожие на снежинки, кристаллы при pH 4,8. При pH 5,0 получали смесь иглообразных и похожих на снежинки кристаллов. При pH 5,2-5,6 наблюдали большое количество очень маленьких иглообразных кристаллов.

10. Растворимость в воде Zn-комплексов

Двести мкл 0,1 М фосфатно-солевого буфера (PBS, фильтрованный, pH = 7,4) добавляли в коническую реакционную пробирку объемом 1 мл. В данную пробирку медленно добавляли небольшое количество образца до тех пор, пока не наблюдали насыщения. Этот раствор периодически встряхивали. После достижения насыщения данную пробирку помещали в маленькую центрифужную пробирку, и образец центрифугировали при 2000 об/мин в течение 3 минут при комнатной температуре. После центрифугирования из супернатанта отбирали 10 мкл образца и разбавляли в 490 мкл буфера (0,1 М PBS). Разведенный образец анализировали посредством ВЭЖХ для определения его концентрации.

Конъюгат	Растворимость	Zn	Фенол
IN105	примерно 26 мг/мл	N/A	N/A
ZnIN105	15 мг/мл - 20 мг/мл	0,44%	0,76%
ZnIN105	примерно 24 мг/мл	0,61%	1,11%
ZnIN105	15 мг/мл - 20 мг/мл	0,63%	1,04%

11. Примеры ферментативной устойчивости *in vitro* Zn-комплексов IN105

Конъюгаты соединений инсулинов (IN105) присутствовали в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (pH приблизительно 7,4), и их концентрацию определяли посредством ВЭЖХ (растворы разводили буфером, чтобы можно было сделать эквимольные сравнения исходного соединения и конъюгатов, примерно 0,6 мг/мл). Лиофилизированный фермент химотрипсин ресуспендировали в 1 мМ HCl до концентрации примерно 7,53 ед./мл. Аликвоту каждого образца объемом 1,53 мл добавляли в пробирки для образцов и в контрольные пробирки объемом 0,850 мл. Образцы тестировали с двойной повторностью вместе с четырьмя контрольными пробирками на образец. Аликвоты инкубировали при 37°C в термомиксере в течение 15 минут. Затем в каждую пробирку с образцом добавляли 17 мкл фермента химотрипсина. В каждую контрольную пробирку добавляли пять мкл HCl. Сразу после этих добавлений из пробирок с образцами и контрольных пробирок брали 200 мкл и помещали в 50 мкл 1% TFA (трифторуксусной кислоты), алиquotы которой

предварительно вносили в центрифужные пробирки. Данный образец служит в качестве T=0.

Отбор образцов соединения инсулина (без цинка), IN105 (без цинка) и соединения инсулина (стандартного соединения инсулина) повторяли в следующие моменты времени: 0, 2, 5, 8, 12, 15 и 30 минут. Процедуру контроля повторяли в следующие моменты времени: 0, 8, 15, 30 минут. Для образцов T-типа и R-типа процедуру повторяли в следующие моменты времени: 0, 5, 8, 12, 30, 40 и 60 минут. Процедуру контроля для Zn-комплексов повторяли в следующие моменты времени: 0, 12, 40 и 60 минут. Образцы хранили при -20°C до тех пор, пока не осуществляли их анализ посредством ВЭЖХ. ВЭЖХ осуществляли для определения процента деградации относительно соответствующего T=0 минут для каждого перевара. Строили график зависимости натурального логарифма количества оставшегося образца, выраженного в процентах, от времени, и для каждого перевара осуществляли линейную регрессию. Период полужизни вычисляли с помощью уравнения $t_{1/2} = -0,693/\text{угловой коэффициент}$.

Результаты для концентрации белка 0,6 мг/мл

Образец	T _{1/2}	Содержание цинка	Содержание фенола
Соединение инсулин (без цинка)	4,9 мин	0,0	--
IN105 (без цинка)	12,5 мин	0,0	--
IN105 (без цинка)	11,1 мин	0,0	-
Соединение инсулин, USP (стандартное соединение инсулин)	11,6 мин	0,3-1% масс./масс.	--
IN105 (цинковый комплекс R-типа)	55,3 мин	1,85% масс./масс.	2,37% масс./масс.
IN105 (цинковый комплекс T-типа)	54,8 мин	1,88% масс./масс.	-

USP – Фармакопея США

12. Примеры препаратов

12.1.1. Примеры жидких препаратов

12.1.1.1. Буферный раствор для Zn-NIM2 R6-типа. Исследование буфера

Компоненты	Количество в 1 мл раствора
Фосфат натрия двухосновный	1,88 мг
Компонент инсулин	3,7 мг (100 ед.)
Глицерин	16,0 мг
Фенол (или мета-крезол)	3,0 мг
Цинк	0,037 мг (1% масс./масс. инсулина)*
pH	7,4-7,8**

* Регулирование количества цинка до 0,037 мг/мл на 3,7 мг/мл инсулина путем добавления хлорида цинка и с учетом содержания цинка в твердом веществе Цинк-NIM2.

** pH может быть подведено 10% HCl и/или 10% гидроксида натрия

12.1.2. Приготовление перорального жидкого разбавителя для препарата с каприновой кислотой/лауриновой кислотой

Приблизительно 60% требуемого объема стерильной воды переносили в подходящий контейнер. В данный контейнер добавляли соответствующее количество (как указано в таблице ниже) трометамин, троламина, безводной лимонной кислоты и гранул гидроксида натрия и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворятся. Температуру доводили до 21-25°C (или до комнатной температуры) и измеряли pH этой жидкости. В случае необходимости, pH доводили до 7,7-7,9 с помощью 1 н. гидроксида натрия или 1 н. соляной кислоты. Затем температуру доводили до 45-50°C путем нагревания на плитке и поддерживали эту температуру. Затем к теплomu раствору добавляли каприновую кислоту и перемешивали до тех пор, пока она не растворится. Температуру доводили до 21-25°C (или до комнатной температуры) и измеряли pH этой жидкости. При необходимости, pH доводили до 7,7-7,9 с помощью 1 н. гидроксида натрия или 1 н. соляной кислоты. Затем раствор перемешивали в течение 5 минут. Добавляли соответствующее количество стерильной воды до объема, равного 100% требуемого объема, и хорошо перемешивали.

Компонент	Процентное соотношение (% масс./об.)
Трометамин	4,24
Троламин	5,22
Безводная лимонная кислота	6,72
Гранулы гидроксида натрия	1,88
Каприновая кислота	0,50
Лауриновая кислота	0,50
Гидроксид натрия, 1 н.	При необходимости для подведения pH до 7,7-7,9
Соляная кислота, 1 н.	При необходимости для подведения pH до 7,7-7,9
Стерильная вода	Для разбавления до требуемого объема

IN105, NIM2 или ZnNIM2 взвешивали в количествах, необходимых для достижения соответствующей концентрации в исследованиях доз, например взвешивали 1 мг IN105 (белка) и смешивали с 1 мл препарата с получением 1 мг/мл IN105 в препарате.

12.1.3. Приготовление перорального жидкого разбавителя для препарата с олеиновой кислотой/лауриновой кислотой/холатом

Приготавливали пероральный жидкий препарат Zn NIM2 R-типа, содержащий компоненты, приведенные в таблице ниже:

Компонент	Процентное соотношение (% масс./об.)
Трометамин	4,24
Троламин	5,22
Безводная лимонная кислота	6,72
Гранулы гидроксида натрия	1,88
Хлорат натрия	3,00
Олеиновая кислота	1,00
Каприновая кислота	0,50
Лауриновая кислота	0,50
Раствор сукралозы, 25%	0,80
Земляничный корригент	0,40
Гидроксид натрия, 1 н.	При необходимости для подведения pH до 7,7-7,9
Соляная кислота, 1 н.	При необходимости для подведения pH до 7,7-7,9
Стерильная вода	Для разбавления до требуемого объема

Приготавливали пероральные жидкие образцы, содержащие 1 мг/мл белкового эквивалента Zn NIM2 R-типа (ZnNIM2-R). ZnNIM2-R извлекали из морозильной камеры (-20°C), помещали в эксикатор и оставляли нагреваться до комнатной температуры. 1 мг/мл белкового эквивалента ZnNIM2-R приготавливали в растворе перорального жидкого разбавителя следующим образом. Взвешивали 6,4 мг ZnNIM2-R. Затем 5,0 мл перорального жидкого разбавителя переносили в контейнер и мягко вращали для перемешивания. Растворение происходило в течение приблизительно 45 минут. Полученный раствор представлял собой суспензию (мутную по виду). Перед дозированием

раствор мягко вращали в течение 60 секунд, чтобы убедиться, что раствор является гомогенным раствором. Для ZnНІМ2-Р содержание белка составляло 78,6%, 1 мг/мл белкового эквивалента, количество = 5 мл. Количество ZnНІМ2-Р = (1 мг/мл)/(0,786) x (5,0 мл) = 6,4 мг. Концентрация ZnНІМ2-Р = (6,4 мг)/(5,0 мл) = 1,28 мг/мл (эквивалентно 1 мг/мл в пересчете на содержание белка).

12.1.4. Приготовление жидких препаратов с каприновой кислотой

Приблизительно 60% требуемого объема стерильной воды переносили в подходящий контейнер. В данный контейнер добавляли соответствующее количество (как указано в таблице ниже) трометамин, троламин, безводной лимонной кислоты и гранул гидроксида натрия и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворятся. Температуру доводили до 21-25°C (или до комнатной температуры) и измеряли рН этой жидкости. В случае необходимости, рН доводили до 7,7-7,9 с помощью 1 н. гидроксида натрия или 1 н. соляной кислоты. Затем температуру доводили до 45-50°C путем нагревания на плитке и поддерживали эту температуру. Затем к теплому раствору добавляли каприновую кислоту и перемешивали до тех пор, пока каприновая кислота не растворится. Температуру доводили до 21-25°C (или до комнатной температуры) и измеряли рН этой жидкости. При необходимости, рН доводили до 7,7-7,9 с помощью 1 н. гидроксида натрия или 1 н. соляной кислоты. Затем раствор перемешивали в течение 5 минут. Добавляли соответствующее количество стерильной воды до объема, равного 100% требуемого объема, и хорошо перемешивали.

Компонент	% масс./об.
Трометамин	4,24
Троламин	5,22
Безводная лимонная кислота	6,72
Гранулы гидроксида натрия	1,88
Каприновая кислота	0,9; 1,5; 3,0 или 6,0
Гидроксид натрия, 1 н.	При необходимости для подведения рН
Соляная кислота, 1 н.	При необходимости для подведения рН
Стерильная вода	До требуемого объема

ІN105 взвешивали в количествах, необходимых для достижения соответствующей концентрации в исследованиях дозирования, например взвешивали 1 мг ІN105 (белка) и смешивали с 1 мл препарата с получением 1 мг/мл ІN105 в препарате.

12.1.5. Капрат и/или лаурат в жидких препаратах с фосфатным буфером

Приготовление 100 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,8 или 8,2. 1,17 грамма моногидрата мононатрия фосфата переносили в колбу объемом 1 л. Добавляли приблизительно 500 мл стерильной воды и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворится. Затем добавляли 24,58 грамма гептагидрата фосфата натрия двухосновного и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворится. Разбавляли до соответствующего объема стерильной водой и хорошо перемешивали. Фильтровали через 0,22 мкм фильтр. рН доводили до 7,8 или 8,2 с помощью 1 н. HCl или 1 н. NaOH.

Для IN105 60% соответствующего объема фосфатного буфера рН 7,8 или 8,2 переносили в подходящий контейнер. Затем добавляли капрат в количестве, рассчитанном таким образом, чтобы получить концентрацию 3% (масс./об. конечного раствора), и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворится. Затем доводили рН до 7,8 или 8,2 с помощью 1 н. HCl или 1 н. NaOH. Разбавляли до соответствующего объема (например до 100 мл) фосфатным буфером рН 7,8 или 8,2.

Компонент	% масс./об.
Капрат натрия	3,0
100 мМ натрий-фосфатный буфер рН 7,8 или 8,2	Сколько требуется до 100%

Для VN-054 взвешивали 400 граммов 100 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,8, в подходящем контейнере. Добавляли 9,7 грамма капрата натрия и 11,1 грамма лаурата натрия и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворятся. Добавляли соответствующее количество 100 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,8, так чтобы чистый вес был равен 500 граммам.

Компонент	% масс./масс.
Капрат натрия	1,94
Лаурат натрия	2,22
100 мМ натрий-фосфатный буфер рН 7,8	Сколько требуется до 100%

12.1.6. Жидкий препарат с аргинином или троламином

Приготовление 100 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,8. 1,17 грамма моногидрата мононатрия фосфата переносили в колбу объемом 1 л. Добавляли приблизительно 500 мл стерильной воды и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворится. Затем добавляли 24,58 грамма гептагидрата фосфата натрия двухосновного и хорошо перемешивали до тех пор, пока не

растворится. Разбавляли до соответствующего объема стерильной водой и хорошо перемешивали. Фильтровали через 0,22 мкм фильтр. pH доводили до 7,8 с помощью 1 н. HCl или 1 н. NaOH.

60% соответствующего объема фосфатного буфера pH 7,8 переносили в подходящий контейнер. В данный контейнер добавляли соответствующее количество (как указано в таблице ниже) аргинина или троламина и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворятся. Затем добавляли капрат в количестве, рассчитанном таким образом, чтобы получить концентрацию 3% (масс./об. конечного раствора), и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворится. Затем доводили pH до 7,8 с помощью 1 н. HCl или 1 н. NaOH. Разбавляли до соответствующего объема (например до 100 мл) фосфатным буфером pH 7,8.

Компонент	% масс./об.
Капрат натрия	3,0
Аргинин или троламин	0,4 или 1,2
100 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7,8	Сколько требуется до 100%

IN105 взвешивали в количестве, необходимом для достижения соответствующей концентрации в исследованиях дозирования, например взвешивали 1 мг IN105 (белка) и смешивали с 1 мл препарата с получением 1 мг/мл IN105 в препарате.

12.1.7. Жидкий препарат с каприловой кислотой

Приблизительно 60% требуемого объема стерильной воды переносили в подходящий контейнер. В данный контейнер добавляли соответствующее количество (как указано в таблице ниже) трометамина, троламина, безводной лимонной кислоты и гранул гидроксида натрия и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворятся. Температуру доводили до 21-25°C (или до комнатной температуры) и измеряли pH этой жидкости. В случае необходимости, pH доводили до 7,7-7,9 с помощью 1 н. гидроксида натрия или 1 н. соляной кислоты. Затем температуру доводили до 45-50°C путем нагревания на плитке и поддерживали эту температуру. Затем к теплому раствору добавляли каприловую кислоту и перемешивали до тех пор, пока каприловая кислота не растворится. Температуру доводили до 21-25°C (или до комнатной температуры) и измеряли pH этой жидкости. При необходимости, pH доводили до 7,7-7,9 с помощью 1 н. гидроксида натрия или 1 н. соляной кислоты. Затем

раствор перемешивали в течение 5 минут. Добавляли соответствующее количество стерильной воды до объема, равного 100% требуемого объема, и хорошо перемешивали.

5

Компонент	% (масс./об.)
Трометамин	4,24
Троламин	5,22
Безводная лимонная кислота	6,72
Гранулы гидроксида натрия	1,88
Каприловая кислота	3,00
Гидроксид натрия, 1 н.	По необходимости для подведения pH
Соляная кислота, 1 н.	По необходимости для подведения pH
Стерильная вода	До требуемого объема

10

15

IN105 взвешивали в количестве, необходимом для достижения соответствующей концентрации в исследованиях дозирования, например взвешивали 1 мг IN105 (белка) и смешивали с 1 мл препарата с получением 1 мг/мл IN105 в препарате.

20

12.1.8. Жидкий препарат с линолевой кислотой

Приготовление 100 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7,8. 1,17 грамма моногидрата мононатрия фосфата переносили в колбу объемом 1 л. Добавляли приблизительно 500 мл стерильной воды и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворится. Затем добавляли 24,58 грамма гептагидрата фосфата натрия двухосновного и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворится. Разбавляли до соответствующего объема стерильной водой и хорошо перемешивали. Фильтровали через 0,22 мкм фильтр. pH доводили до 7,8 с помощью 1 н. HCl или 1 н. NaOH.

25

30

35

60% соответствующего объема фосфатного буфера pH 7,8 переносили в подходящий контейнер. Затем добавляли натриевую соль линолевой кислоты в количестве, рассчитанном таким образом, чтобы получить концентрацию 3% (масс./об. конечного раствора), и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворится. Затем доводили pH до 7,8 с помощью 1 н. HCl или 1 н. NaOH. Разбавляли до соответствующего объема (например до 100 мл) фосфатным буфером pH 7,8.

40

45

50

Компонент	% масс./об.
Натриевая соль линолевой кислоты	3,0
100 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7,8	Сколько требуется до 100%

5

12.1.9. Приготовление жидких препаратов с каприновой кислотой и лауриновой кислотой

10

15

20

25

30

Приблизительно 60% требуемого объема стерильной воды переносили в подходящий контейнер. В данный контейнер добавляли соответствующее количество (как указано в таблице ниже) трометамин, троламин, безводной лимонной кислоты и гранул гидроксида натрия и хорошо перемешивали до тех пор, пока не растворятся. Температуру доводили до 21-25°C (или до комнатной температуры) и измеряли pH этой жидкости. В случае необходимости, pH доводили до 7,7-7,9 с помощью 1 н. гидроксида натрия или 1 н. соляной кислоты. Затем температуру доводили до 45-50°C путем нагревания на плитке и поддерживали эту температуру. Затем к теплому раствору добавляли каприновую кислоту и/или лауриновую кислоту и перемешивали до тех пор, пока каприновая кислота и/или лауриновая кислота не растворились. Температуру доводили до 21-25°C (или до комнатной температуры) и измеряли pH этой жидкости. При необходимости, pH доводили до 7,7-7,9 с помощью 1 н. гидроксида натрия или 1 н. соляной кислоты. Затем раствор перемешивали в течение 5 минут. Добавляли соответствующее количество стерильной воды до объема, равного 100% требуемого объема, и хорошо перемешивали.

35

40

Компонент	% масс./об.
Трометамин	4,24
Троламин	5,22
Безводная лимонная кислота	6,72
Гранулы гидроксида натрия	1,88
Каприновая кислота	0; 0,1 или 0,9
Лауриновая кислота	0; 0,9 или 0,1
Гидроксид натрия, 1 н.	При необходимости для подведения pH
Соляная кислота, 1 н.	При необходимости для подведения pH
Стерильная вода	До требуемого объема

45

IN105 взвешивали в количестве, необходимом для достижения соответствующей концентрации в исследованиях дозирования, например взвешивали 1 мг IN105 (белка) и смешивали с 1 мл препарата с получением 1 мг/мл IN105 в препарате.

50

12.2. Примеры твердых лекарственных препаратов

12.2.1. Приготовление и профиль растворения твердого лекарственного препарата с капратом/лауратом с использованием Nobex-IN105-[854]

Приблизительно 58 мг капрата натрия, 57 мг лаурата натрия, 286 мг маннита, 30 мг натрия крахмал гликолята и 6 мг (белка) Nobex-IN105 переносили на кусок бумаги для взвешивания и тщательно перемешивали. Смесь переносили в пресс и прессовали под давлением 350 psi (2413,25 кПа) с получением таблетки.

Препарат Nobex-IN105-[854] в твердой лекарственной форме (таблетки), 58

мг капрата и 57 мг лаурата на таблетку

Компонент	мг на таблетку
Капрат натрия	58
Лаурат натрия	57
Маннит	286
Explotab (натрия крахмал гликолят)	30
Nobex IN105 (белок)	6

Тестирование растворения осуществляли с использованием USP аппарата с 2 секциями для растворения. В качестве среды использовали воду, скорость вращения составляла 50 об/мин, и объем среды составлял 500 мл. Образцы для растворения анализировали посредством ВЭЖХ с использованием градиентной системы. Подвижные фазы представляли собой воду с 0,1% TFA (подвижная фаза А) и ацетонитрил с 0,1% TFA (подвижная фаза Б). Использовали следующий градиент: 0 минут - 100% подвижная фаза А, 11 минут - 65% подвижная фаза А, 15 минут - 20% подвижная фаза А, 16 минут - 20% подвижная фаза А, 17 минут - 100% подвижная фаза А. Длина волны составляла 214 нм, колонка представляла собой C18 (150 x 2 мм). Нижеследующие таблицы и графики суммируют данные по растворению, полученные при тестировании растворения таблетированного препарата Nobex-Zn-IN105 [854], содержащего 6 мг Zn-IN105 (белка), 286 мг маннита, 58 мг капрата натрия, 57 мг лаурата натрия и 30 мг натрия крахмал гликолята (Explotab):

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105**[854], % растворенного IN105**

5

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	71	72	72
10	86	94	90
15	87	96	92
30	89	96	93
45	90	96	93
60	87	96	92

10

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105**[854], % растворенного капрата**

15

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	98	93	96
10	102	104	103
15	101	104	103
30	102	105	104
45	102	104	103
60	102	105	104

20

25

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105**[854], % растворенного лаурата**

30

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	72	75	74
10	90	89	90
15	91	90	91
30	88	91	90
45	89	91	90
60	91	90	91

35

40

12.2.2. Приготовление препарата в твердой лекарственной форме (таблетка), 143 мг капрата и 140 мг лаурата на таблетку

Приготовление препарата Nobex-IN105 [856]

45

Приблизительно 143 мг капрата натрия, 140 мг лаурата натрия, 150 мг маннита, 30 мг натрия крахмал гликолята и 6 мг (белка) Nobex-IN105 переносили на кусок бумаги для взвешивания и тщательно перемешивали. Смесь переносили в пресс и прессовали под давлением 350 psi (2413,25 кПа) с получением таблетки.

50

**Препарат Nobex-IN105-[856] в твердой лекарственной форме (таблетки),
143 мг капрата и 140 мг лаурата на таблетку**

Компонент	мг на таблетку
Капрат натрия	143
Лаурат натрия	140
Маннит	150
Explotab (натрия крахмал гликолят)	30
Nobex IN105 (белок)	6

Тестирование растворения осуществляли с использованием USP аппарата с 2 секциями для растворения. В качестве среды использовали воду, скорость вращения составляла 50 об/мин, и объем среды составлял 500 мл. Образцы для растворения анализировали посредством ВЭЖХ с использованием градиентной системы. Подвижные фазы представляли собой воду с 0,1% TFA (подвижная фаза А) и ацетонитрил с 0,1% TFA (подвижная фаза Б). Использовали следующий градиент: 0 минут - 100% подвижная фаза А, 11 минут - 65% подвижная фаза А, 15 минут - 20% подвижная фаза А, 16 минут - 20% подвижная фаза А, 17 минут - 100% подвижная фаза А. Длина волны составляла 214 нм, колонка представляла собой C18 (150 x 2 мм). Нижеследующие таблицы и графики суммируют данные по растворению, полученные при тестировании растворения таблеток Nobex-Zn-IN105, содержащих 6 мг Zn-IN105 (белка), 150 мг маннита, 143 мг капрата натрия, 140 мг лаурата натрия и 30 мг натрия крахмал гликолята (Explotab):

**Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105
[856], % растворенного IN105**

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	43	31	37
10	66	53	60
15	81	72	77
30	98	97	98
45	98	99	99
60	96	98	97

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105**[856], % растворенного капрата**

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	36	32	34
10	68	57	63
15	89	79	84
30	105	103	104
45	105	103	104
60	105	104	105

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105**[856], % растворенного лаурата**

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	35	25	30
10	61	44	53
15	74	61	68
30	93	88	91
45	93	91	92
60	93	92	93

12.2.3. Приготовление препарата в твердой лекарственной форме**(таблетка), 143 мг капрата на таблетку****Приготовление препарата Nobex-IN105 [859]**

Приблизительно 143 мг капрата натрия, 150 мг маннита, 30 мг натрия крахмал гликолята и 6 мг (белка) Nobex-IN105 переносили на кусок бумаги для взвешивания и тщательно перемешивали. Данную смесь переносили в пресс и прессовали под давлением 350 psi (2413,25 кПа) с получением таблетки.

Препарат Nobex-IN105-[859] в твердой лекарственной форме (таблетки),**143 мг капрата на таблетку**

Компонент	мг на таблетку
Капрат натрия	143
Маннит	150
Explotab (натрия крахмал гликолят)	30
Nobex IN105 (белок)	6

Тестирование растворения осуществляли с использованием USP аппарата с 2 секциями для растворения. В качестве среды использовали воду, скорость вращения составляла 50 об/мин, и объем среды составлял 500 мл.

Образцы для растворения анализировали посредством ВЭЖХ с использованием градиентной системы. Подвижные фазы представляли собой воду с 0,1% TFA (подвижная фаза А) и ацетонитрил с 0,1% TFA (подвижная фаза Б). Использовали следующий градиент: 0 минут - 100% подвижная фаза А, 11 минут - 65% подвижная фаза А, 15 минут - 20% подвижная фаза А, 16 минут - 20% подвижная фаза А, 17 минут - 100% подвижная фаза А. Длина волны составляла 214 нм, колонка представляла собой C18 (150 x 2 мм). Нижеследующие таблицы и графики суммируют данные по растворению, полученные при тестировании растворения таблеток Nobex-Zn-IN105, содержащих 6 мг Zn-IN105 (белка), 150 мг маннита, 143 мг капрата натрия и 30 мг натрия крахмал гликолята (Explotab):

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105

[859], % растворенного IN105

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	11	26	19
10	63	58	61
15	84	80	82
30	86	88	87
45	88	88	88
60	87	89	88

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105

[859], % растворенного капрата

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	61	43	52
10	93	72	83
15	99	95	97
30	99	100	100
45	99	100	100
60	99	100	100

12.2.4. Приготовление препарата в твердой лекарственной форме (таблетка), 286 мг капрата на таблетку

Приготовление препарата Nobex-IN105 [860]

Приблизительно 286 мг капрата натрия, 150 мг маннита, 30 мг натрия крахмал гликолята и 6 мг (белка) Nobex-IN105 переносили на кусок бумаги для

взвешивания и тщательно перемешивали. Данную смесь переносили в пресс и прессовали под давлением 350 psi (2413,25 кПа) с получением таблетки.

Препарат Nobex-IN105-[860] в твердой лекарственной форме (таблетки),
286 мг капрата на таблетку

Компонент	мг на таблетку
Капрат натрия	286
Маннит	150
Explotab (натрия крахмал гликолят)	30
Nobex IN105 (белок)	6

Тестирование растворения осуществляли с использованием USP аппарата с 2 секциями для растворения. В качестве среды использовали воду, скорость вращения составляла 50 об/мин, и объем среды составлял 500 мл. Образцы для растворения анализировали посредством ВЭЖХ с использованием градиентной системы. Подвижные фазы представляли собой воду с 0,1% TFA (подвижная фаза А) и ацетонитрил с 0,1% TFA (подвижная фаза Б). Использовали следующий градиент: 0 минут - 100% подвижная фаза А, 11 минут - 65% подвижная фаза А, 15 минут - 20% подвижная фаза А, 16 минут - 20% подвижная фаза А, 17 минут - 100% подвижная фаза А. Длина волны составляла 214 нм, колонка представляла собой C18 (150 x 2 мм). Нижеследующие таблицы и графики суммируют данные по растворению, полученные при тестировании растворения таблеток Nobex-Zn-IN105, содержащих 6 мг Zn-IN105 (белка), 150 мг маннита, 286 мг капрата натрия и 30 мг натрия крахмал гликолята (Explotab):

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105
[860], % растворенного IN105

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	28	19	24
10	53	44	49
15	70	68	69
30	92	90	91
45	92	92	92
60	92	93	93

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105**[860], % растворенного капрата**

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	29	35	32
10	52	66	59
15	70	84	77
30	99	99	99
45	99	99	99
60	99	100	100

12.2.5. Приготовление препарата в твердой лекарственной форме**(таблетка), 100 мг капрата на таблетку****Приготовление препарата Nobex-IN105 [861]**

Приблизительно 100 мг капрата натрия, 150 мг маннита, 25 мг натрия крахмал гликолята и 6 мг (белка) Nobex-IN105 переносили на кусок бумаги для взвешивания и тщательно перемешивали. Данную смесь переносили в пресс и прессовали под давлением 350 psi (2413,25 кПа) с получением таблетки.

Препарат Nobex-IN105-[861] в твердой лекарственной форме (таблетки),**100 мг капрата на таблетку**

Компонент	мг на таблетку
Капрат натрия	100
Маннит	150
Explotab (натрия крахмал гликолят)	25
Nobex IN105 (белок)	6

Тестирование растворения осуществляли с использованием USP аппарата с 2 секциями для растворения. В качестве среды использовали воду, скорость вращения составляла 50 об/мин, и объем среды составлял 500 мл. Образцы для растворения анализировали посредством ВЭЖХ с использованием градиентной системы. Подвижные фазы представляли собой воду с 0,1% TFA (подвижная фаза А) и ацетонитрил с 0,1% TFA (подвижная фаза Б). Использовали следующий градиент: 0 минут - 100% подвижная фаза А, 11 минут - 65% подвижная фаза А, 15 минут - 20% подвижная фаза А, 16 минут - 20% подвижная фаза А, 17 минут - 100% подвижная фаза А. Длина волны составляла 214 нм, колонка представляла собой C18 (150 x 2 мм). Нижеследующие таблицы и графики суммируют данные по растворению, полученные при тестировании растворения таблеток Nobex-Zn-IN105,

содержащих 6 мг Zn-IN105 (белка), 150 мг маннита, 100 мг капрата натрия и 25 мг натрия крахмал гликолята (Explotab):

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105

[861], % растворенного IN105

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	77	41	59
10	94	84	89
15	96	90	93
30	95	91	93
45	95	91	93
60	97	89	93

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105

[861], % растворенного капрата

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	97	77	87
10	101	99	100
15	101	103	102
30	101	103	102
45	101	104	103
60	101	104	103

12.2.6. Приготовление препарата в твердой лекарственной форме

(таблетка), 150 мг капрата на таблетку

Приготовление препарата Nobex-IN105 [862]

Приблизительно 150 мг капрата натрия, 150 мг маннита, 25 мг кроскармеллозы натрия и 6 мг (белка) Nobex-IN105 переносили на кусок бумаги для взвешивания и тщательно перемешивали. Данную смесь переносили в пресс и прессовали под давлением 350 psi (2413,25 кПа) с получением таблетки.

Препарат Nobex-IN105-[862] в твердой лекарственной форме (таблетки), 150 мг капрата на таблетку

Компонент	мг на таблетку
Капрат натрия	150
Маннит	150
Explotab (кроскармеллоза натрия)	25
Nobex IN105 (белок)	6

Тестирование растворения осуществляли с использованием USP аппарата с 2 секциями для растворения. В качестве среды использовали воду, скорость вращения составляла 50 об/мин, и объем среды составлял 500 мл. Образцы для растворения анализировали посредством ВЭЖХ с использованием градиентной системы. Подвижные фазы представляли собой воду с 0,1% TFA (подвижная фаза А) и ацетонитрил с 0,1% TFA (подвижная фаза Б). Использовали следующий градиент: 0 минут - 100% подвижная фаза А, 11 минут - 65% подвижная фаза А, 15 минут - 20% подвижная фаза А, 16 минут - 20% подвижная фаза А, 17 минут - 100% подвижная фаза А. Длина волны составляла 214 нм, колонка представляла собой C18 (150 x 2 мм). Нижеследующие таблицы и графики суммируют данные по растворению, полученные при тестировании растворения таблеток Nobex-Zn-IN105, содержащих 6 мг Zn-IN105 (белка), 150 мг маннита, 150 мг капрата натрия и 25 мг кроскармеллозы натрия (Explotab):

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105

[862], % растворенного IN105

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	76	41	59
10	93	87	90
15	95	99	97
30	96	98	97
45	97	98	98
60	98	97	98

Суммарные данные для профиля растворения таблеток Nobex-Zn-IN105

[862], % растворенного капрата

Время отбора образца (минуты)	Контейнер 1 (% растворенного вещества)	Контейнер 2 (% растворенного вещества)	Среднее (% растворенного вещества)
5	84	51	68
10	98	88	93
15	98	97	98
30	98	98	98
45	98	98	98
60	98	98	98

13. Примеры *in vitro* устойчивости к ферменту

Конъюгаты соединений инсулинов (Н1М2) присутствовали в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (рН приблизительно 7,4), и их концентрацию

определяли посредством ВЭЖХ (данные растворы разводили буфером для того, чтобы можно было осуществить эквимольные сравнения исходного соединения и конъюгатов, примерно 0,6 мг/мл). Лيوфилизированный фермент химотрипсин ресуспендировали в 1 мМ HCl до концентрации 7,53 ед./мл. Аликвоту каждого образца объемом 1,53 мл добавляли в пробирки для образцов и в контрольные пробирки объемом 0,850 мл. Образцы тестировали с двойной повторностью вместе с четырьмя контрольными пробирками на образец. Аликвоты инкубировали при 37°C в термомиксере в течение 15 минут. Затем в каждую пробирку с образцом добавляли 17 мкл фермента химотрипсина. В каждую контрольную пробирку добавляли пять мкл HCl. Сразу после добавления из пробирок с образцами и из контрольных пробирок брали 200 мкл и помещали в 50 мкл 1% TFA, аликвоты которой предварительно вносили в центрифужные пробирки. Этот образец служит в качестве T=0.

Процедуру отбора образцов инсулина (без цинка), N1M2 (без цинка) и инсулина (стандартного соединения инсулина) повторяли в следующие моменты времени: 0, 2, 5, 8, 12, 15 и 30 минут. Процедуру контроля повторяли в следующие моменты времени: 0, 8, 15, 30 минут. Для образцов T-типа и R-типа эту процедуру повторяли в следующие моменты времени: 0, 5, 8, 12, 30, 40 и 60 минут. Процедуру контроля для Zn-комплексов повторяли в следующие моменты времени: 0, 12, 40 и 60 минут. Образцы хранили при -20°C до тех пор, пока не осуществляли их анализ посредством ВЭЖХ. ВЭЖХ осуществляли для определения процента деградации относительно соответствующего T=0 минут для каждого перевара. Строили график зависимости натурального логарифма количества оставшегося образца, выраженного в процентах, от времени, и для каждого перевара осуществляли линейную регрессию. Период полужизни вычисляли с помощью уравнения $t_{1/2} = -0,693/\text{угловой коэффициент}$.

Результаты для концентрации белка 0,6 мг/мл

Образец	T _{1/2}	Содержание цинка	Содержание фенола
Инсулин (без цинка)	7-9 мин	--	--
HIM2 (без цинка)	12-15 мин	--	--
Инсулин, USP (стандартное соединение инсулин)	26 -29 мин	0,3-1% масс./масс.	---
HIM2 (цинковый комплекс R-типа)	51-78 мин	1,1% масс./масс.	0,1-0,25% масс./масс.
HIM2 (цинковый комплекс T-типа)	51 мин	0,55% масс./масс.	---
HIM2 (цинк/протаминавый комплекс R-типа)	95-120 мин	2,0-2,1% масс./масс.	5,3-6,2% масс./масс.
DICON-1 (цинковый комплекс R-типа)	24-26 мин	N/D	N/D

Результаты для концентрации белка 0,3 мг/мл

Образец	T _{1/2}	Содержание цинка	Содержание фенола
Инсулин (без цинка)	4-5 мин	--	--
HIM2 (без цинка)	7-9 мин	--	--
Инсулин, USP (стандартное соединение инсулин)	7-8 мин	0,4 -1% масс./масс.	---
HIM2 (цинковый комплекс R-типа)	19-21 мин	1,1% масс./масс.	0,1-0,25% масс./масс.
HIM2 (цинковый комплекс T-типа)	12-15 мин	0,55% масс./масс.	---

14. Примеры *in vivo***14.1. Пролонгированный анализ глюкозы в крови у мышей (MBGA)**

Шесть групп для парного дозирования из 5 самцов мышей CF-1 (Charles River Laboratories; 25-30 г) получали подкожные инъекции либо конъюгата соединения инсулина (тестируемый продукт), либо рекомбинантного инсулина человека. Тестируемый продукт растворяли в фосфатном буфере (0,01 М, pH приблизительно 7,4), содержащем 0,1% (масс./масс.) бычьего сывороточного альбумина, и вводили в количестве 100; 66,6; 43,3; 30; 20 и 13,3 мкг/кг. Инсулин растворяли в фосфатном буфере (0,01 М, pH приблизительно 7,4), содержащем 0,1% (масс./масс.) бычьего сывороточного альбумина, и вводили в количестве 50; 33,3; 21,7; 15; 10 и 6,7 мкг/кг. После того, как животные получали

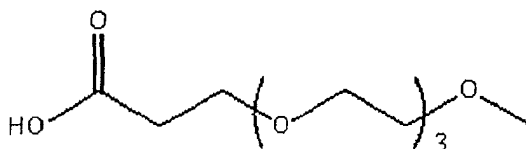
5 подкожную дозу в углубление, образованное бедром и пахом, их возвращали в клетки на 30 минут при комнатной температуре и затем быстро анестезировали и брали кровь. Образцы крови собирали в пробирки с гепарином для анализа глюкозы. Если анализ глюкозы откладывался, то пробирки хранили в ледяной

10 Глюкозу в плазме крови измеряли с помощью глюкометра (например One Touch[®] Basic; Lifescan), который калибровали в начале каждого дня, когда его использовали, в соответствии с инструкциями производителя. Затем активность конъюгата соединения инсулина рассчитывали относительно стандартной кривой, которую строили для ответа на рекомбинантный инсулин человека. Вычисления основаны на предположении, что рекомбинантный инсулин человека имеет активность 27,4 МЕ/мг.

20 Результаты приведены на фиг. 16-20. На фиг. 16 показаны MBGA-профили биологической активности HIM2. На фиг. 17 показаны MBGA-профили биологической активности продукта соединения инсулина Zn-HIM2 R-типа. На фиг. 18 показаны MBGA-профили биологической активности продукта соединения инсулина Zn-HIM2 T-типа. На фиг. 19 показаны MBGA-профили биологической активности продукта соединения инсулина Zn-HIM2 с протамином. На фиг. 20 показано снижение глюкозы при действии протаминового комплекса R-типа через 30 и 90 минут после введения дозы. Эти результаты показывают, что биологическая активность HIM2 уменьшается незначительно в результате образования комплекса с Zn⁺⁺. Протаминовый комплекс R-типа (смотри фиг. 17 [7]) показывает более значительное снижение глюкозы через 30 и 90 минут.

40 Дополнительно, на фиг. 21-24 показаны MBGA-профили биологической активности IN-186, IN-192, IN-190, IN-191, IN-189, IN-178, IN-193, IN-194, IN-185, IN-196 и IN-197, имеющих следующие структуры:

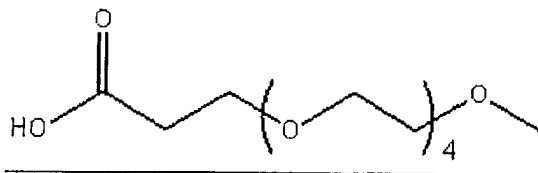
B1 моноконъюгат, IN-186:



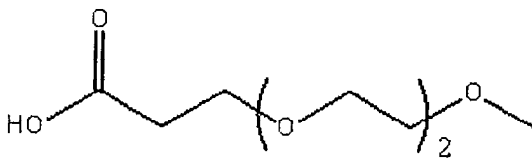
50

В29 моноконъюгат, IN-194:

5

**В29 моноконъюгат, IN-197:**

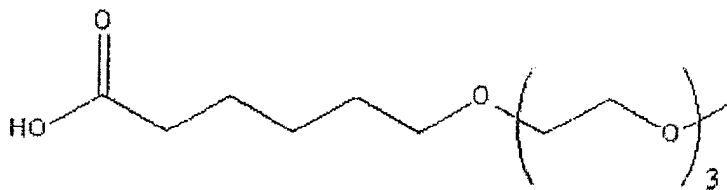
10



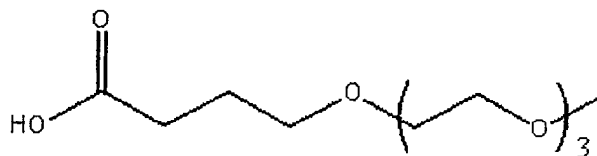
15

В29 моноконъюгат, IN-178:

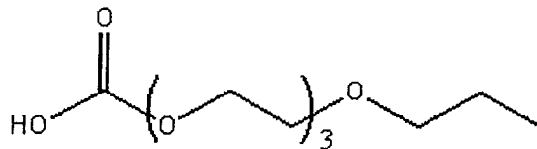
20

**В29 моноконъюгат, IN-190:**

25

**В29 моноконъюгат, IN-196:**

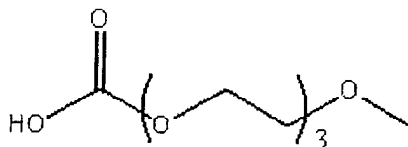
30



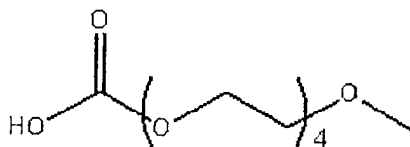
35

В29 моноконъюгат, IN-191:

40

**В29 моноконъюгат, IN-189:**

45



50

14.2. Исследования с фиксированным уровнем глюкозы у собак

14.2.1. Первоначальные исследования HIM2

5 Хирургическая подготовка собак (n=3 или 6) заключалась в установке катетера в бедренной артерии (анастезия изофлураном). Животным давали возможность восстановиться в течение 16-17 дней, после чего им не давали корм в течение ночи и проводили исследования на животных, находящихся в
10 сознании. После 60-минутного периода установления равновесия следовал контрольный период 20 минут, после которого через рот вводили лекарство. Соединение инсулин Zn⁺⁺-HIM2 R-типа тестировали в буферном растворе, приготовленном, как показано в Примере **Ошибка! Ссылка не найдена**. Кроме
15 того, комплексы R-типа и NPH-типа тестировали в пероральном жидком препарате, который содержит каприновую кислоту и лауриновую кислоту, приготовленном, как показано в Примере **Ошибка! Ссылка не найдена**.

20 Все три анализируемых образца тестировали с использованием только одного дозового уровня (дозовый уровень определяли на основе предварительных экспериментальных результатов). Уровень глюкозы в плазме крови затем фиксировали на эугликемическом уровне путем инфузии D-20
25 через ножную вену в течение 4 ч. Для измерения глюкозы, соединения инсулина и С-пептида образцы крови (4 мл) отбирали в моменты времени -20, 0, 5, 10, 20, 30, 45, 90, 120, 180 и 240 минут. Образцы артериальной крови получали по мере необходимости, чтобы поддерживать фиксированный
30 уровень глюкозы в плазме. В итоге в каждом эксперименте отбирали 72 мл крови.

35 Осуществляли следующие измерения: скорости инфузии глюкозы, концентрации соединения инсулина, концентрации С-пептида и уровней С-пептида в плазме (что позволяло оценить эндогенное высвобождение соединения инсулина). Скорость инфузии глюкозы, необходимая для
40 поддержания эугликемии, является показателем действия соединения инсулина.

45 После эксперимента свободный конец катетера скрывали в подкожной ткани и собакам давали возможность восстановиться в течение двух недель перед другим исследованием, в котором использовали другой анализируемый

50

продукт. Животных рандомизировали для введения дозы и использовали в целом 3 раза. Общее число собак равнялось 6.

Данные результаты приведены на **фиг. 25 и 26**.

14.2.2. Первоначальные исследования IN105

Данное исследование проводили на шести (6) нечистокровных собаках, не получавших корм в течение ночи, находящихся в сознании, которые до этого получали корм, содержащий 34% белка, 46% углеводов, 14,5% жира и 5,5% волокон по массе на сухой вес. Каждое животное имело силиконовый катетер, вставленный в бедренную артерию, как описано ранее (1), приблизительно за три недели до эксперимента. В день эксперимента катетер извлекали из подкожного углубления под местной анестезией. Тестируемый продукт: Nobex-IN105 (Lot.# KJ-173-095 & KJ-173-116) присутствовал в пероральном препарате жирных кислот (Nobex-IN-[753]-040422) в концентрации 1,0 мг/мл. Каждая собака получала 0,25 мг/кг пероральной дозы Nobex-IN105 (объем вводимых доз составлял 0,25 мл/кг; 1,0 мг/мл). Nobex-IN105 давали в момент времени $t=0$, и глюкозу (D-20) вводили через головную вену для поддержания эугликемии. Образцы артериальной крови отбирали для измерения инсулина и глюкозы, как описано ранее (1). После завершения эксперимента артериальный катетер скрывали в подкожной ткани, где он был размещен во время первичной хирургической манипуляции.

Во время эксперимента у одной из собак была рвота сразу после введения дозы, и была введена только часть дозы. Поэтому результаты данного эксперимента представлены с учетом данных, полученных на этой собаке, и без них.

После перорального введения Nobex-IN105 уровни инсулина в артериальной плазме повышались у всех шести собак, включая выброс (Oral-2i). Средний уровень артериального инсулина повышался от $6,0 \pm 1,4$ мкед./мл ($6,3 \pm 1,7$ мкед./мл, $n = 5$) до максимального значения $109,4 \pm 31,4$ мкед./мл ($127,8 \pm 30,1$ мкед./мл, $n = 5$) через 10 минут после введения и затем падал, так что к 150 минуте у всех собак уровни инсулина вернулись к базальному уровню (**Фиг. 27 и 28**).

Эугликемию поддерживали путем инфузии глюкозы. Скорость инфузии глюкозы, необходимая для поддержания эугликемии, была наиболее высокой у

животных, у которых наблюдался большой подъем артериального инсулина (Фиг. 27 и 28). Средняя площадь под кривой скорости инфузии глюкозы (AUC0-240) составляла $578,5 \pm 144,5$ мг/кг/мин ($669,4 \pm 137,7$ мг/кг/мин, $n=5$)

14.2.3. Твердые препараты

Скрининговые исследования препаратов с использованием модели с фиксированным уровнем глюкозы проводили на нечистокровных собаках, не получавших корм в течение ночи, находящихся в сознании, которые до этого получали корм, содержащий 34% белка, 46% углеводов, 14,5% жира и 5,5% волокон по массе на сухой вес. Каждое животное имело силиконовый катетер, вставленный в бедренную артерию, как описано ранее (1), приблизительно за три недели до эксперимента. В день эксперимента катетер извлекали из подкожного углубления под местной анестезией. Анализируемый продукт содержал 1,0 мг/мл Zn IN105 в различных жидких препаратах или 5-6 мг IN105 на капсулу или таблетку. Каждая собака в каждом эксперименте получала пероральную жидкую дозу приблизительно 0,25 мг/кг или капсулу или таблетку, содержащую 5 или 6 мг IN105 два раза подряд: первый раз в момент времени $t=0$ и второй раз в момент времени $t=120$ минут. Для поддержания эугликемии через головную вену вводили глюкозу (D-20). В некоторых случаях, когда после введения дозы эффект длился более 120 минут, время исследования удлиняли. Образцы артериальной крови отбирали для измерения инсулина, глюкозы и C-пептида, как описано ранее (1). После завершения эксперимента артериальный катетер возвращали обратно в подкожную ткань.

Препараты, как в виде раствора, так и в виде твердых лекарственных форм, приготавливали с использованием различных уровней жирных кислот, буферов, разбавителей и разрыхлителей. Чтобы свести к минимуму количество переменных, жидкие и твердые препараты содержали постоянные уровни IN105 и каждого эксципиента (капринового, лауринового, каприлового, миристинового и линолевого), соответственно, варьировали только относительные количества жирных кислот, буфера, разбавителей (маннита или микрокристаллической целлюлозы) и/или разрыхлителя (Explotab). Для каждого дозированного препарата проводили оценку и сравнение скорости инфузии глюкозы и данных по абсорбции IN105 (иммунореактивности инсулина плазмы).

Сначала осуществляли эксперименты для упрощения и улучшения оптимизированного жидкого препарата (ссылка 2) до жидкого препарата, который можно было бы легко превращать в твердую лекарственную форму. Это осуществляли путем замены свободной жирной кислоты на соответствующую натриевую соль (например, каприновую кислоту заменяли на капрат натрия), а также путем удаления буферных компонентов (лимонной кислоты, троламина, трометамина, гидроксида натрия), которые, как считали, больше не требуются. Кроме того, исследовали влияние других жирных кислот, таких как линолевая, каприловая и миристиновая кислоты, и аминокислоты аргинина на абсорбцию IN105.

После скрининга первоначальной группы протипов с использованием одной или двух собак на эксперимент, выбрали несколько препаратов-прототипов и тестировали их с использованием дополнительных собак для того, чтобы лучше определить вариабельность и согласованность действия препаратов на индивидуальных животных.

Разработали способ растворения, и исследования по растворению осуществляли на нескольких препаратах-кандидатах для оценки профилей растворения IN105 и содержания жирных кислот.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первоначальных экспериментах собаки, которым вводили IN105 в 3% (масс./об.) натриевой соли каприновой кислоты в фосфатном буфере без дополнительных эксципиентов, продемонстрировали (Фиг. 29-30) похожий ответ при сравнении с оптимизированным жидким препаратом, содержащим 3% (масс./об.) каприновой кислоты в буфере тролламин/лимонная кислота/трометамин/гидроксид натрия. Это показывает, что жирная кислота в форме натриевой соли ведет себя сравнительно так же, как в кислотной форме, и что дополнительные компоненты буфера не вносят вклад в данный препарат.

В отдельных исследованиях, где оценивали альтернативные жирные кислоты, заменяя 3% капрата либо 3% каприловой кислотой, либо 3% линолиновой кислотой, ни одна из данных альтернатив не показала значительных эффектов. Применение каприловой кислоты привело к необходимости в уровнях глюкозы от низких до средних, тогда как применение линолиновой кислоты не вызывало необходимости инфузии глюкозы, что

свидетельствовало об отсутствии эффекта. Оба препарата продемонстрировали относительно низкие уровни артериального инсулина. Жидкий препарат, содержащий аргинин, не показал никаких преимуществ в отношении GIR (скорости инфузии глюкозы) или уровней IN105.

В предварительных исследованиях твердые препараты оценивали как в виде порошковой смеси, которой заполнены твердые желатиновые капсулы, так и в виде таблеток, прессованных вручную с использованием Carver Press. Капсулы с порошковой смесью, содержащей 6 мг IN105 (инсулиновый эквивалент, 0,25 мг/кг) и 57 мг капрата/57 мг лаурата, не продемонстрировали никаких значительных эффектов при первом введении вплоть до 120 минут, а при повторном введении наблюдался значительный эффект с GIR, согласованной с абсорбцией IN105, где уровни были намного выше базального уровня в период времени от 0 до 120 минут. Эти данные свидетельствуют о непостоянной, но потенциальной замедленной реакции на IN105 в капсульной лекарственной форме. Растворение только слегка замедляется капсулой, если сравнивать с таблетками, хотя корреляция *in-vitro/in-vivo* может быть небольшой или отсутствует.

В первоначальных скрининговых исследованиях таблеток-прототипов, таблетки, содержащие 6 мг IN105 и 150 мг маннита, 30 мг натрия крахмал гликолята с 143 мг капрата и 143 мг лаурата или без него, демонстрировали значительно более высокую GIR и абсорбцию IN105, чем такие же таблетки с 54 мг капрата и/или 54 мг лаурата (Фиг. 31, 32 и 33). Это свидетельствует о надлежащем дозовом ответе на более высокие GIR и уровни IN105 относительно увеличивающихся уровней капрата и лаурата. Данные таблетки демонстрировали быстрый и согласованный GIR ответ во времени относительно капсул, наполненных IN105. Кроме того, таблетки с IN105 демонстрировали увеличение инсулина в артериальной плазме у всех собак, которым вводили дозу.

В серии заключительных исследований были выбраны три препарата таблеток-прототипов [препарат [856] содержал 143 мг капрата и 140 мг лаурата, [860] содержал 286 мг капрата, и [862] содержал 150 мг капрата] для оценки у 5 собак (три разных собаки для каждого препарата), чтобы определить согласованность действия (Фиг. 34-37). Уровни инсулина в артериальной

5 плазме повышались у всех трех собак и для всех 18 доз (3 собаки x 3 таблетки x 2 дозы на каждую) с соответствующим GIR-ответом после перорального введения 6 мг (инсулиновый эквивалент) IN105, приготовленного в виде
10 таблеток, содержащих либо 150 мг или 280 мг капрата, либо 143 мг/140 мг капрата/лаурата (Фиг. 31-32 и 38-40). Уровни С-пептида (нг/мл), для таблеток с 150 мг и 280 мг капрата, в среднем ($n = 2$), показали снижение от первоначального уровня $0,30 \pm 0,05$ до $0,22 \pm 0,02$ во время первого введения дозы и от $0,1 \pm 0,05$ до $0,02 \pm 0,0$ при повторном введении дозы, и, для таблеток с 140 мг/140 мг капрата/лаурата, показали снижение от $0,21 \pm 0,05$ до $0,05 \pm 0,02$ во время первого введения дозы и от $0,18 \pm 0,05$ до $0,18 \pm 0,1$. Это указывает на подавление секреции С-пептида поджелудочной железой в результате введения экзогенного IN105.

20 Все три препарата таблеток-прототипов IN105 показали согласованные уровни абсорбции IN105 и полученной скорости инфузии глюкозы между дозами и для одной собаки и между собаками, в том числе в разные дни.

25 Во время заключительных исследований, в которых использовали группу из 6 собак, одна собака (собака #3) давала меньший ответ на все жидкие и твердые дозировки. Для более точного представления результатов данные представлены как с учетом результатов, полученных на собаке #3, так и без них. Данные, полученные на собаках, которые не получили полную дозу (плохое кормление через желудочный зонд, рвота и так далее) или имели эндогенный инсулин, исключены.

35 Изучение растворимости: типичные образцы таблеток и капсул тестировали на растворимость (описано выше).

Обсуждение

40 В данных исследованиях показано, что таблетка-прототип IN105, содержащая капрат или капрат и лаурат (натриевые соли) с маннитом и рахрыхлитель натрия крахмал гликолят и содержащая 6 мг IN105 (приблизительно 0,25 мг/кг), доставляемая пероральным путем, вызывала значительное и согласованное повышение уровня инсулина в артериальной плазме, которое для сохранения эугликемии требует инфузии глюкозы.

45 Данные таблетки-прототипы приводили к таким уровням IN105 и скоростям GIR, которые являются по меньшей мере такими же хорошими или,
50

возможно, лучшими, чем жидкие препараты, содержащие сравнимые уровни капрата или лаурата. Данные таблетки-прототипы сохраняют профиль абсорбции перорального жидкого препарата. Относительная пероральная биоэффективность выбранных препаратов таблеток-прототипов (например таблеток, содержащих 280 мг и 150 мг капрата, $n=6$, AUC для GIR = 496 ± 117 и 500 ± 275), по-видимому, лучше, чем у жидких препаратов (например у жидкого препарата с 3% каприновой кислоты, $n=5$, AUC для GIR = 182 ± 92 и 198 ± 119).

Эти данные свидетельствуют о том, что таблетки, содержащие капрат натрия в качестве единственной жирной кислоты вместе с маннитом и разрыхлителем, натрия крахмал гликолятом, были бы полезны для дальнейшей разработки твердых лекарственных форм для использования в клинических исследованиях. Эти данные также свидетельствуют о том, что уровни инсулина после перорального введения IN105 в выбранных таблетированных формах - прототипах с капратом (капрат натрия в количестве либо 150 мг, либо 286 мг) монотонно повышаются, с типичным T_{max} около 20 минут после введения дозы и C_{max} приблизительно $59,0 \pm 20,1$ и $62,9 \pm 25,4$ мкед./мл, для обеих доз. Уровни инсулина в плазме остаются повышенными и близкими к уровню C_{max} в течение 10-15 минут и выше базальных уровней в течение 120 минут после каждой дозы. GIR, необходимая для поддержания эугликемии, при использовании данных таблеток достигала T_{max} в момент времени или около 30-40 минут для обеих доз, и GIR C_{max} достигала среднего значения $8,4 \pm 1,99$ и $7,41 \pm 2,18$ мг/кг/мин. Таблетированные лекарственные формы требовали более высокого GIR C_{max} (7,4-8,4 против 4,5-5,4) и требовали инфузии глюкозы в течение более продолжительного периода (100-120 минут против 60-90 минут) для поддержания эугликемии, чем оптимизированный жидкий препарат.

При сравнении с уровнями инсулина в артериальной плазме исторического инсулина, вводимого SQ (подкожным) или ингаляционным путем, оказывается, что данные таблетки-прототипы обеспечивают максимальные уровни инсулина, схожие с теми, которые имеют место при доставке SQ или ингаляционным путем, и имеют профиль инсулина, сравнимый с профилем инсулина для инсулина, вводимого ингаляционным путем (**Фиг. 34-37**).

Эксперименты с таблетками-прототипами свидетельствуют о том, что выбранные таблетки-прототипы подходят в качестве твердых лекарственных

препаратов для дальнейшей оценки IN105, при этом дальнейшая разработка должна быть сфокусирована на создании клинического препарата, который может быть получен с использованием таблет-пресса.

5 Данное описание разделено на разделы с предметным указателем только для удобства при ссылке. Предполагается, что разделы и предметный указатель не ограничивают объем изобретения. Воплощения, описанные в
10 данном изобретении, имеют цель проиллюстрировать многие аспекты и признаки изобретения, и предполагается, что они не ограничивают объем изобретения.

15 Формула изобретения

1. Комплекс, включающий:

конъюгат инсулина, содержащий нативный инсулин или его полипептидный аналог, конъюгированные с модифицирующей группировкой, где полипептидный
20 аналог проявляет сходную активность относительно нативного инсулина, и где модифицирующая группировка содержит полиалкиленгликолевый (PAG) компонент и алкильный компонент, и

катион, где конъюгат инсулина образует комплекс с двухвалентным катионом металла группы II или переходного металла.

2. Комплекс по п.1, где полипептидный аналог выбран из группы, состоящей из нативного проинсулина, искусственного проинсулина, препроинсулина, содержащего проинсулин и лидерный пептид или белок-носитель, соединенный с С-концом или N-концом проинсулина; и минипроинсулина.

3. Комплекс по п.2, где полипептидный аналог имеет лидерный пептид, который является отщепляемым или неотщепляемым.

4. Комплекс по п.1, где полипептидный аналог представляет собой одноцепочечный предшественник инсулина, содержащий А-цепь-В-цепь инсулина, где А-цепь и/или В-цепь может быть укорочена в точке присоединения к другой цепи
35 на 1, 2 или 3 аминокислоты.

5. Комплекс по п.1, где модифицирующая группировка выбрана так, чтобы сделать конъюгат инсулина более гидрофильным или более амфифильным, чем соответствующий неконъюгированный инсулин.

6. Комплекс по п.1, где гидрофильность конъюгата инсулина уменьшена путем добавления цинка.

7. Комплекс по п.6, где:

модифицирующая группировка выбрана так, чтобы сделать конъюгат инсулина таким же или более растворимым, чем соответствующий неконъюгированный
45 инсулин; и

растворимость в воде конъюгата инсулина уменьшена путем добавления цинка.

8. Комплекс по п.7, где:

конъюгат инсулина представляет собой ацилированный инсулин; катион
50 представляет собой цинк; и

растворимость в воде конъюгата инсулина уменьшена путем добавления цинка.

9. Комплекс по п.1, где относительная липофильность конъюгата инсулина по отношению к соответствующему исходному инсулину равна 1 или меньше 1.

10. Комплекс по п.1, где модифицирующая группировка содержит от 2 до 10 полиалкаленгликолевых группировок.

11. Комплекс по п.1, где растворимость комплекса конъюгата инсулина с катионом при рН приблизительно 7,4 меньше, равна или больше растворимости конъюгата инсулина.

12. Комплекс по п.1, представляющий собой твердое вещество.

13. Комплекс по п.1, где:

(а) растворимость комплекса конъюгата инсулина с катионом при рН приблизительно 7,4 по существу меньше растворимости конъюгата инсулина в растворе при рН приблизительно 7,4, и

(б) конъюгат инсулина с катионом остается растворимым при концентрации более чем приблизительно 1 г/л в водном растворе в диапазоне рН от 5,8 до приблизительно 8,5.

14. Комплекс по п.1, где:

(а) этот комплекс представляет собой Zn-комплекс R-типа, содержащий протамин; и

(б) при рН приблизительно 7,4 растворимость комплекса в воде составляет от приблизительно 10 до приблизительно 110 г/л, от приблизительно 20 до приблизительно 85 г/л или от приблизительно 30 до приблизительно 70 г/л.

15. Комплекс по п.1, где:

(а) этот комплекс представляет собой Zn-комплекс T-типа, содержащий протамин; и

(б) при рН приблизительно 7,4 растворимость комплекса в воде составляет от приблизительно 10 до приблизительно 150 г/л, от приблизительно 20 до приблизительно 130 г/л, от приблизительно 30 до приблизительно 110 г/л или от приблизительно 35 до приблизительно 60 г/л.

16. Комплекс по п.1, где:

(а) конъюгат инсулина представляет собой моноконъюгат; и

(б) комплекс образует кристаллы в водном растворе при рН от приблизительно 4 до менее 6,5.

17. Комплекс по п.1, где конъюгат инсулина образует кристаллы в водном растворе при рН, равном рI плюс или минус 2,5.

18. Комплекс по п.1, где:

(а) РАG (полиалкиленгликоль) и/или РАG-компонент связан с липофильным компонентом, где данный липофильный компонент выбран из группы, состоящей из алкилов, жирных кислот и линейных или разветвленных липидов, и

(б) где либо РАG-компонент, либо липофильный компонент связан с одной или более аминоклуппами в нативном инсулине или его полипептидном аналоге.

19. Комплекс по п.4, где модифицирующая группировка связана с карбоксильным концом А-цепи, и/или модифицирующая группировка связана с карбоксильным концом В-цепи нативного инсулина или его полипептидного аналога.

20. Комплекс по п.18, где:

(а) нативный инсулин или его полипептидный аналог содержит аминоклуппу в положении А1, В1 и/или В29; и

(б) по меньшей мере одна модифицирующая группировка связана с одиночной аминоклуппой в нативном инсулине или его полипептидном аналоге в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из А1, В1 и В29.

21. Комплекс по п.18, где модифицирующая группировка связана со свободной

аминогруппой в нативном инсулине или его полипептидном аналоге с образованием карбаматной связи.

22. Комплекс по п.18, где:

(а) нативный инсулин или его полипептидный аналог содержит свободную гидроксильную группу, и

(б) модифицирующая группировка связана со свободной гидроксильной группой с образованием карбоксильной, простой эфирной или карбонатной связи.

23. Комплекс по п.1, где катионный компонент содержит катион металла, выбранный из группы, состоящей из Zn^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , Fe^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} , Co^{++} и Mg^{++} .

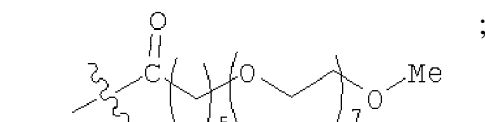
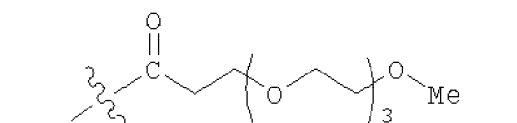
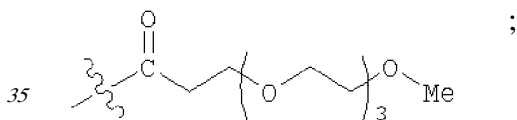
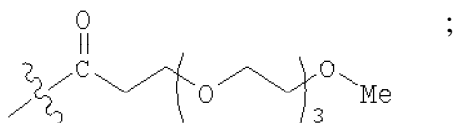
24. Комплекс по п.1, где катионный компонент содержит Zn^{++} .

25. Комплекс по п.1, где молярное отношение конъюгата инсулина к катионному компоненту составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:100, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:12 или от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:7.

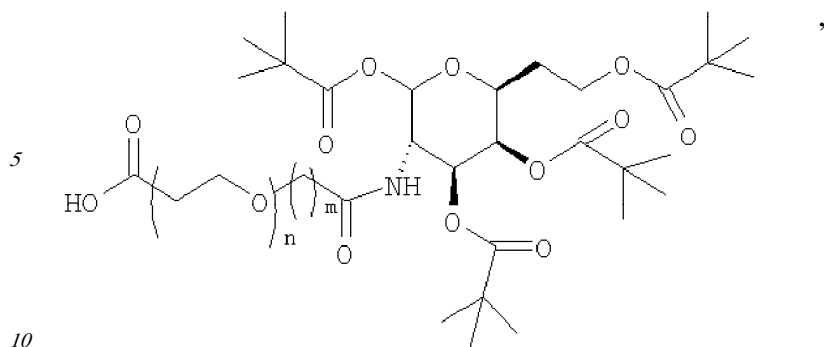
26. Комплекс по п.1, где устойчивость к расщеплению химотрипсином находящегося в комплексе конъюгата инсулина выше, чем устойчивость к расщеплению химотрипсином соответствующего не находящегося в комплексе конъюгата инсулина.

27. Комплекс по п.1, где устойчивость к расщеплению химотрипсином находящегося в комплексе конъюгата инсулина выше, чем устойчивость к расщеплению химотрипсином соответствующего находящегося в комплексе, но неконъюгированного инсулина.

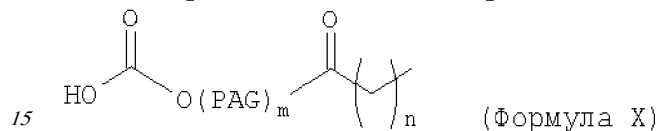
28. Комплекс по п.1, где конъюгат инсулина состоит из инсулина человека, связанного в положении А1, В1 и/или В29 с модифицирующей группировкой, имеющей структуру, выбранную из группы, состоящей из:



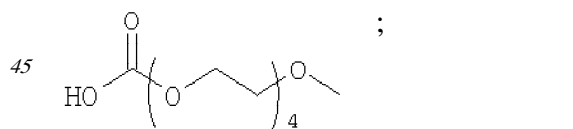
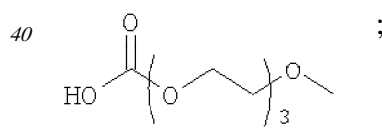
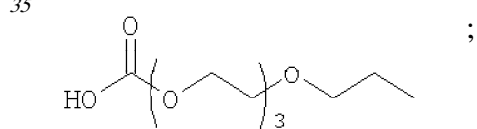
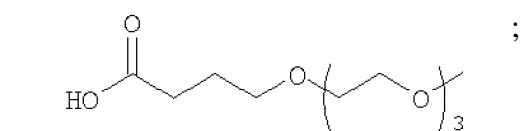
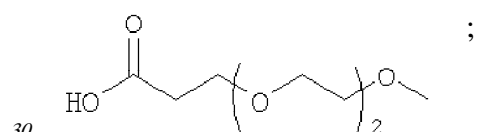
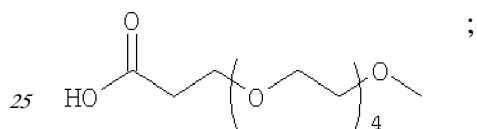
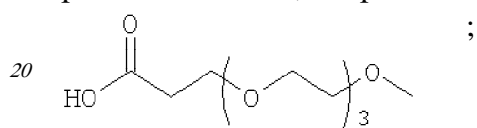
50

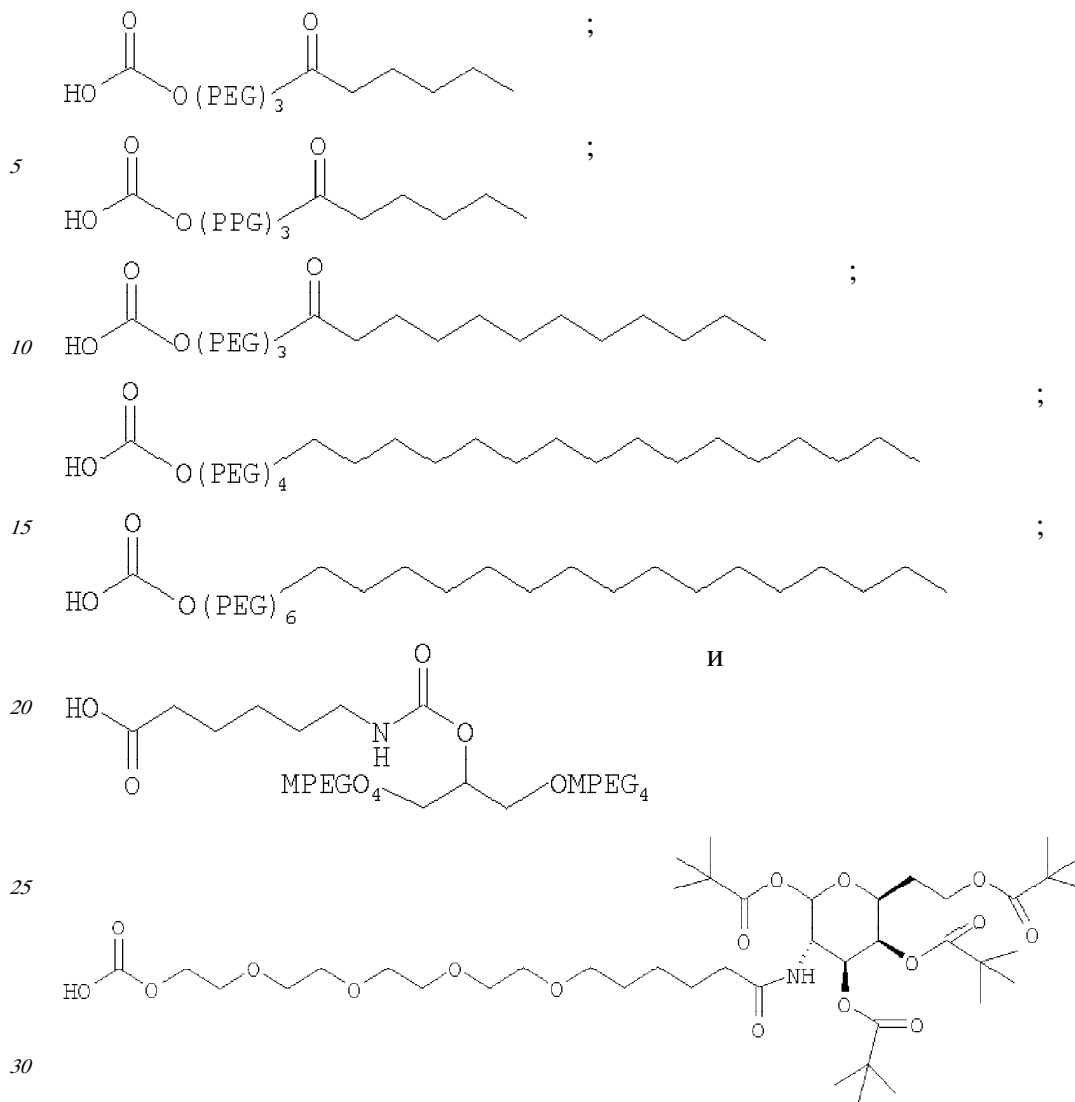


где m равно от 1 до 20, и n равно от 1 до 20;



где PAG представляет собой PAG-группировку, имеющую m субъединиц, и m равно от 1 до 20, и n равно от 1 до 20;





29. Комплекс по п.1, где конъюгат инсулина связан в положении A1, B1 и/или B29 с линейной или разветвленной PEG-группировкой, содержащей от 2 до 20 PEG-субъединиц, от 2 до 15 PEG-субъединиц или от 2 до 10 PEG-субъединиц.

30. Композиция для лечения недостаточности инсулина у человека, содержащая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из комплексов по пп.1-29 и фармацевтически приемлемый носитель.

31. Композиция по п.30, дополнительно содержащая второй компонент, содержащий конъюгат инсулина или неконъюгированный инсулин.

32. Композиция по п.31, где комплекс представляет собой форму, выбранную из группы, состоящей из кристаллического твердого вещества, аморфного твердого вещества и сокристалла, содержащего по меньшей мере два конъюгата инсулинов, причем данные конъюгаты инсулинов являются одинаковыми или разными.

33. Композиция по п.30, представленная в виде лиофилизованного порошка, твердой смеси или гибридного комплекса.

34. Композиция по п.30, содержащая более одного комплекса, где конъюгаты инсулина данных комплексов содержат разные инсулины или разные конъюгаты инсулина.

35. Композиция по п.34, где разные конъюгаты инсулина имеют разные характеристики, выбранные из группы, состоящей из разных растворимостей, разных периодов полувыведения из кровотока и разных модифицирующих

группировок.

36. Композиция по п.35, где один из комплексов имеет профиль быстрого действия; а другой из комплексов имеет профиль от среднего до длительного действия.

5 37. Композиция по п.35, где один из комплексов имеет профиль, подходящий для базального контроля инсулина, а другой из комплексов имеет профиль, подходящий для постпрандиального контроля глюкозы.

10 38. Композиция по п.31, представляющая собой сокристалл по меньшей мере двух компонентов, выбранных из группы, состоящей из Н1М2, инсулина и IN105.

39. Композиция по п.31, представляющая собой сокристалл, имеющий РК/PD (фармакокинетический/фармакодинамический) профиль, подходящий для постпрандиального контроля глюкозы или для ночного базального контроля инсулина.

15 40. Композиция по п.31, содержащая неконъюгированный инсулин, выбранный из группы, состоящей из инсулина человека или лизпроинсулина.

41. Композиция по п.30, дополнительно содержащая комплексообразующий агент.

20 42. Композиция по п.41, где комплексообразующий агент выбран из группы, состоящей из протаминов, сурфена, глобиновых белков, спермина, спермидина, альбумина, аминокислот, карбоновых кислот, поликатионных полимерных соединений, катионных полипептидов, полилизина, анионных полипептидов, нуклеотидов и антисмысловых последовательностей.

43. Композиция по п.30, по существу не содержащая протамина.

25 44. Композиция по п.32, где комплекс находится в форме кристаллического твердого вещества, палочковидного кристалла, кристалла, имеющего нерегулярную морфологию, смеси аморфных и кристаллических твердых веществ или порошка.

30 45. Композиция по п.30 в форме порошка, содержащего твердый конъюгат инсулина с катионом и один или более дополнительных фармацевтически приемлемых компонентов.

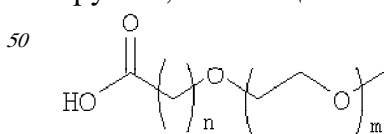
46. Композиция по п.30, где в сухом состоянии твердое вещество содержит: более чем приблизительно 71% мас./мас. конъюгата инсулина и от приблизительно 0,5 до приблизительно 4% мас./мас. Zn^{++} , и возможно от приблизительно 0,1 до приблизительно 5% мас./мас. фенола.

47. Композиция по п.45, содержащая стабилизирующий агент, выбранный из группы, состоящей из фенола, мета-крезола и парабена.

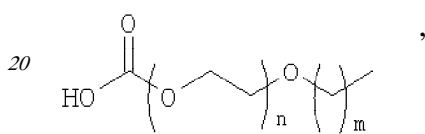
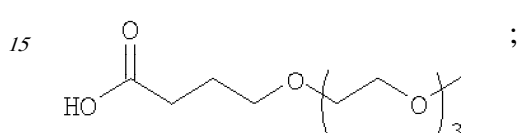
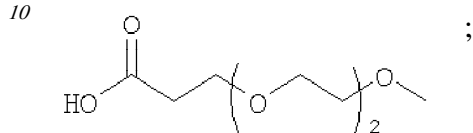
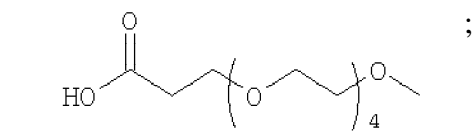
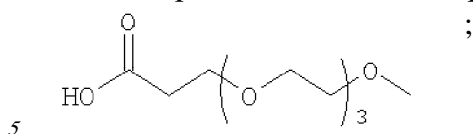
40 48. Применение комплексов или композиций по пп.1-46 в изготовлении лекарства для лечения диабета.

49. Применение по п.48, где композицию приготавливают для доставки путем, выбранным из группы, состоящей из перорального, перорального проглатывания внутрь, парентерального, трансбуккального, сублингвального, назального, ингаляционного и трансдермального.

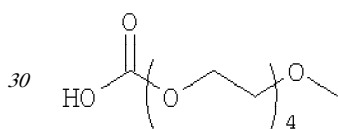
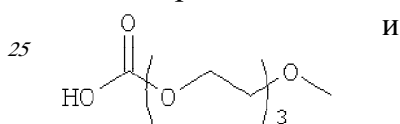
45 50. Кристаллический Zn комплекс, содержащий конъюгат инсулина, находящийся в комплексе с Zn, где конъюгат инсулина содержит нативный инсулин или его полипептидный аналог, связанные с модифицирующей группировкой, выбранной из группы, состоящей из:



где n равно от 1 до 4, и m равно от 1 до 5;



где n равно 1, 2, 3, 4 или 5, и m равно 1, 2, 3 или 4;



51. Кристаллический Zn комплекс по п.50, где модифицирующая группировка выбрана так, чтобы сделать конъюгат инсулина таким же или более растворимым, чем соответствующий неконъюгированный инсулин.

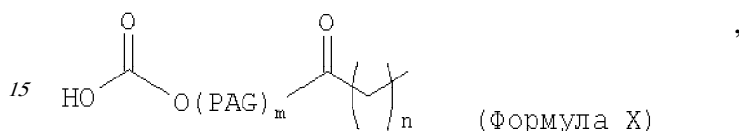
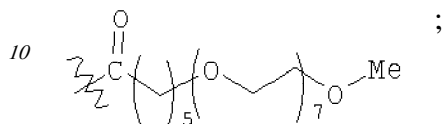
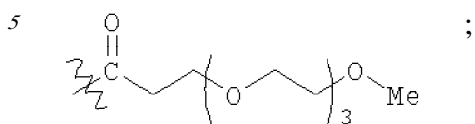
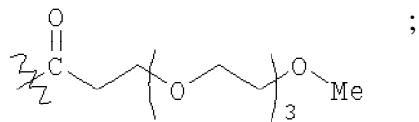
52. Кристаллический Zn комплекс по п.50, где растворимость в воде конъюгата инсулина уменьшена путем добавления цинка.

53. Способ конъюгирования нативного инсулина или его полипептидного аналога, включающий активирование модифицирующей группировки по п.50 и связывание активированной модифицирующей группировки с нативным инсулином или его полипептидным аналогом.

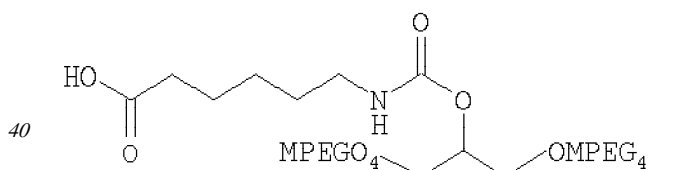
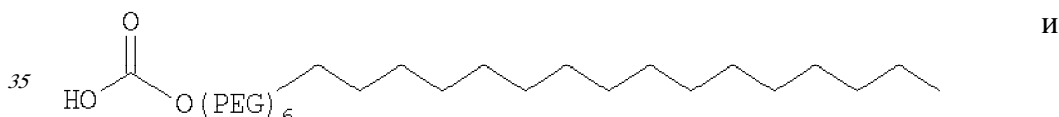
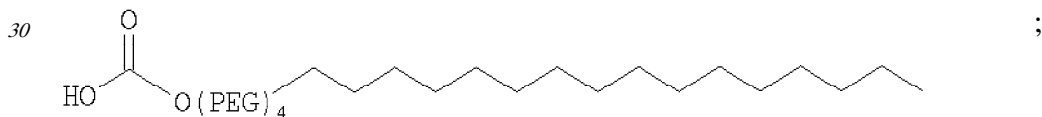
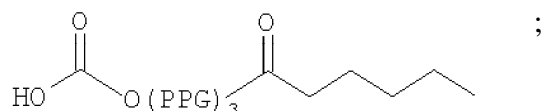
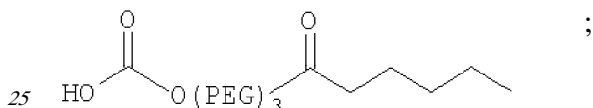
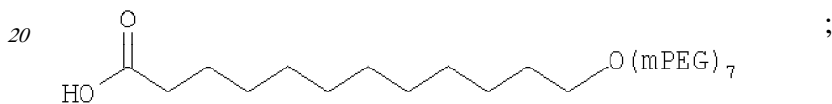
54. Твердая или жидкая фармацевтическая композиция, приготовленная в виде препарата для перорального введения путем проглатывания внутрь, содержащая:

от приблизительно 40 до приблизительно 60% мас./мас. жирно-кислотного компонента, где данный жирно-кислотный компонент содержит насыщенные или ненасыщенные C₄₋₁₂ жирные кислоты и/или соли таких жирных кислот;

терапевтически эффективное количество комплекса инсулина, содержащего нативный инсулин или его полипептидный аналог, конъюгированный с модифицирующей группировкой, выбранной из группы, состоящей из:



где PAG представляет собой PAG-группировку, имеющую m субъединиц, и m равно от 1 до 20, и n равно от 1 до 20;



где модифицирующая группировка связана с инсулином по аминокислотным остаткам A1, B1 и/или B29.

55. Фармацевтическая композиция по п.54, содержащая фармацевтически приемлемый разбавитель, выбранный из группы, состоящей из связующих веществ, разрыхлителей, наполнителей, разбавителей, смазывающих веществ, скользящих веществ, усилителей текучести, вспомогательных веществ для прессования, красителей, подсластителей, консервантов, суспензирующих агентов, диспергирующих агентов, пленкообразующих веществ, покрытий, корригентов, типографских красок, целлюлоз, сахаров, маннитов, лактоз, усилителей растворения и кроскармеллоз.

56. Фармацевтическая композиция по п.55, приготовленная в форме, выбранной из

группы, состоящей из таблеток, мини-таблеток, порошков, твердых желатиновых капсул или мягких желатиновых капсул.

5 57. Фармацевтическая композиция по п.54, где жирно-кислотный компонент представляет собой каприновую кислоту и/или лауриновую кислоту, и/или соли каприновой кислоты и/или лауриновой кислоты.

58. Фармацевтическая композиция по п.54, содержащая буферную соль, выбранную из группы, состоящей из фосфатного буфера, фосфата натрия, трио-буфера, лимонно-кислого буфера и этаноламинового буфера.

10 59. Фармацевтическая композиция по п.58, содержащая буферную соль, выбранную для достижения буферной емкости в месте абсорбции для поддержания локального рН от приблизительно 4,8 до приблизительно 9,5 или от приблизительно 5 до приблизительно 8.

15 60. Фармацевтическая композиция по п.54, дополнительно содержащая цинк, где растворимость в воде конъюгата инсулина уменьшена путем добавления цинка.

20

25

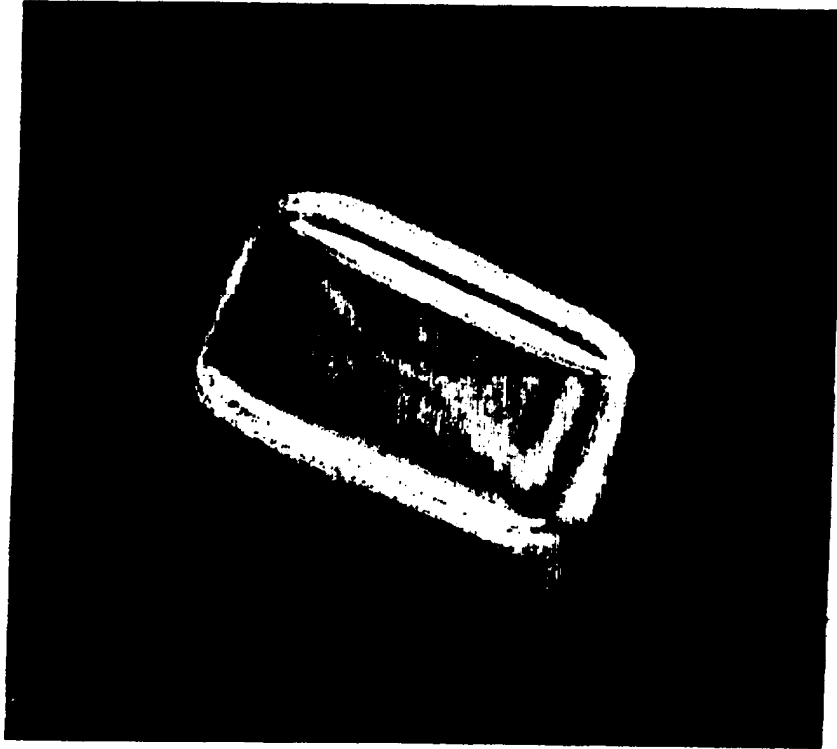
30

35

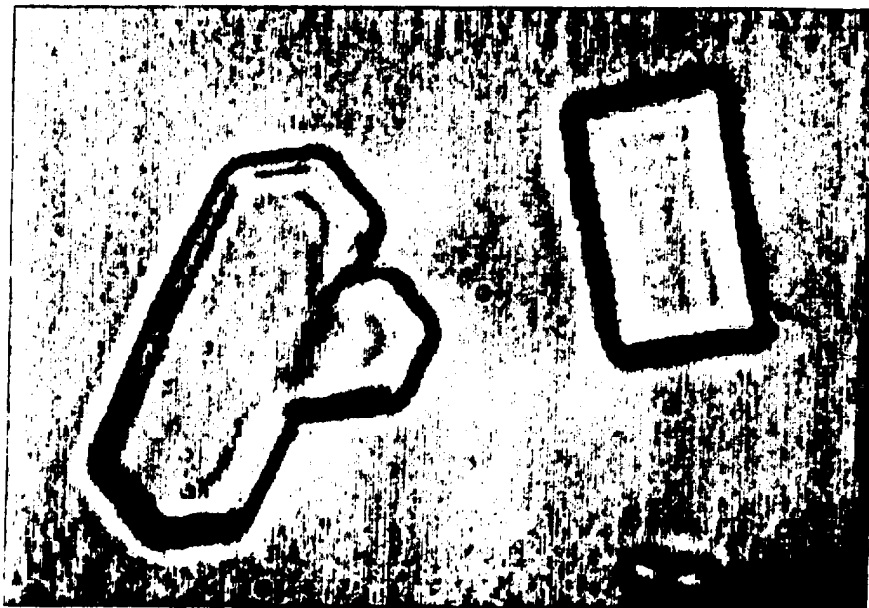
40

45

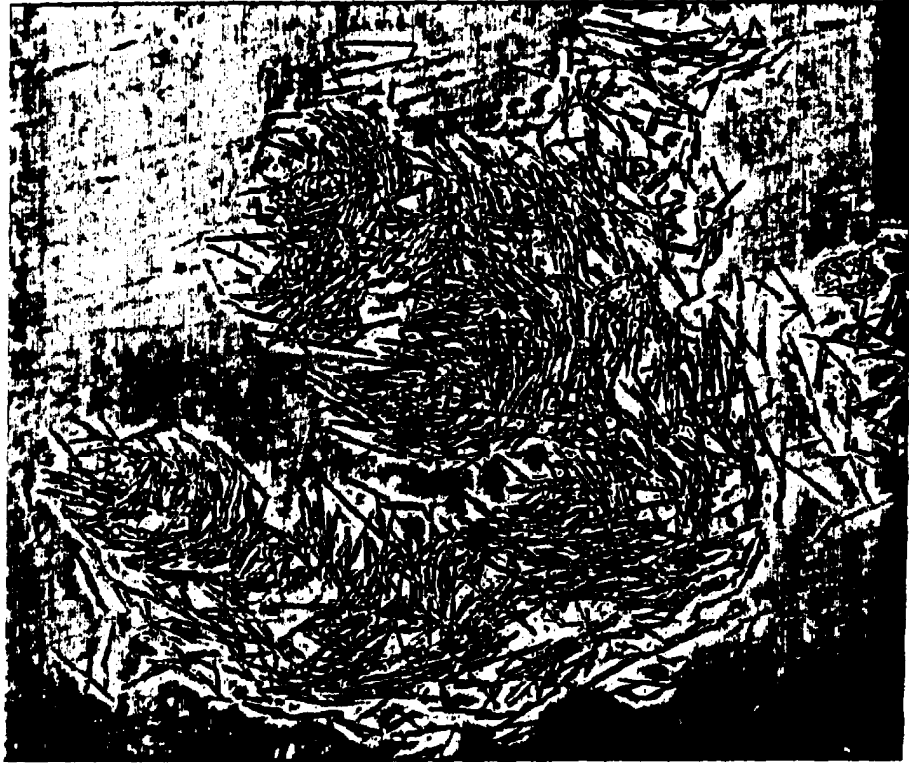
50



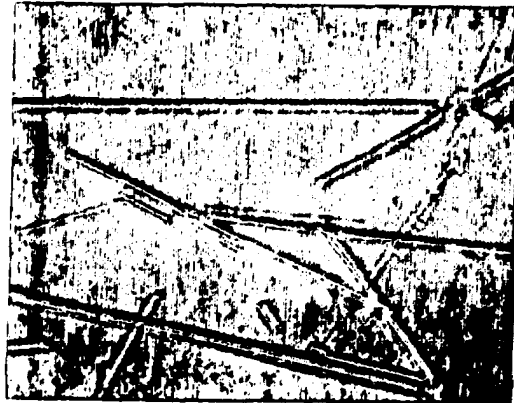
Фиг. 1



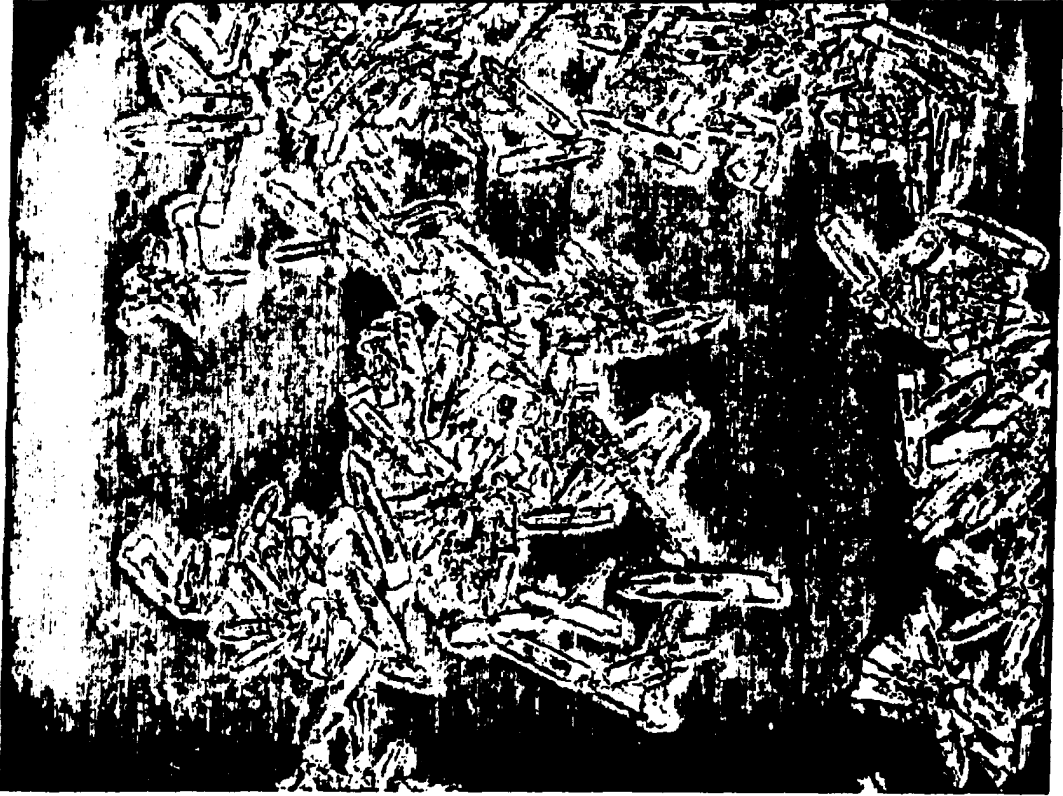
Фиг. 2



ФИГ. 3



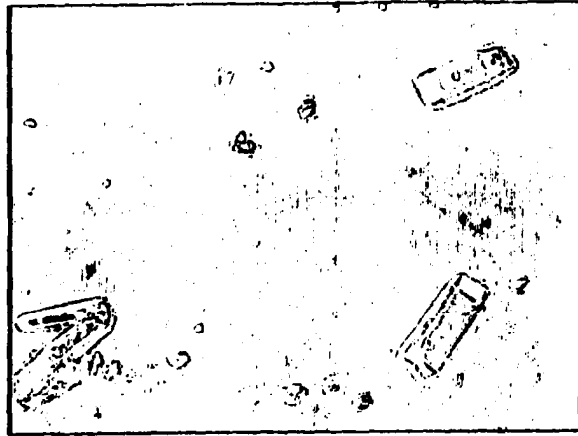
ФИГ. 4



Фиг. 5

Реакция 1, pH 4,4

А



Реакция 1, pH 5,4

Б



Фиг. 6

Реакция 2, рН 5,2

А



Реакция 3, рН 5,0

Б



Фиг. 7

Реакция 4, pH 5,4

А



Реакция 5, pH 5,0

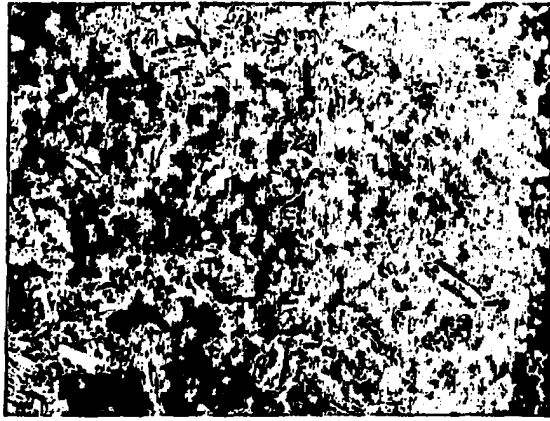
Б



Фиг. 8

Реакция 6, рН 4,8

А



Реакция 8, рН 5,4

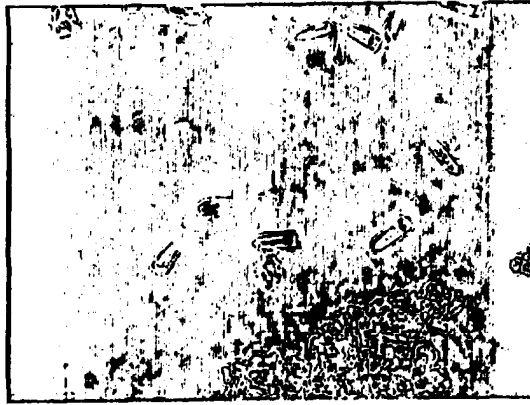
Б



Фиг. 9

Реакция 10, рН 5,0

А



Реакция 10, рН 5,4

Б



Фиг. 10

Реакция сс1В, рН=5,0

А



Реакция сс1В, рН=5,2

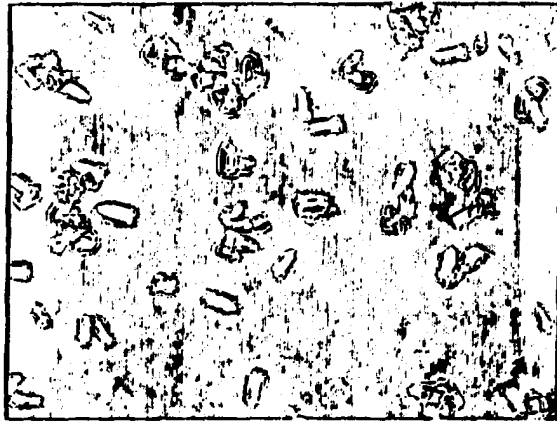
Б



Фиг. 11

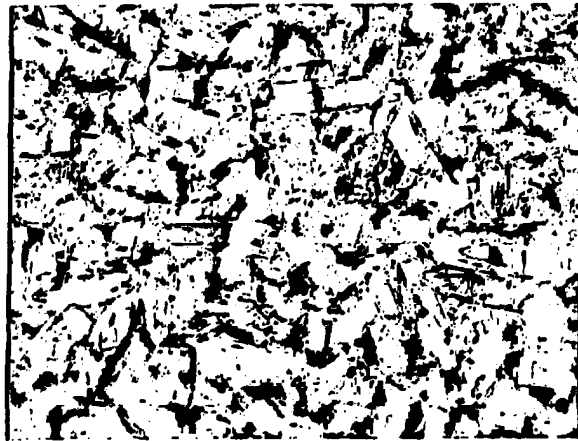
Реакция сс1В, рН=5,6

А



Реакция сс2В, рН=5,2

Б



Фиг. 12

Реакция сс2В, рН=5,2

А



Реакция сс3В, рН=5,6

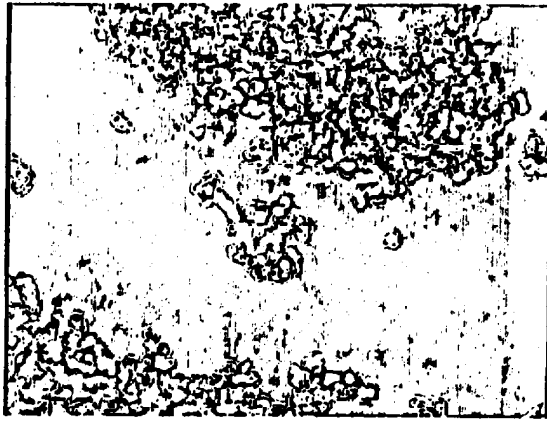
Б



Фиг. 13

сс5а, рН=4,6

А



сс6а, рН=5,0

Б



Фиг. 14

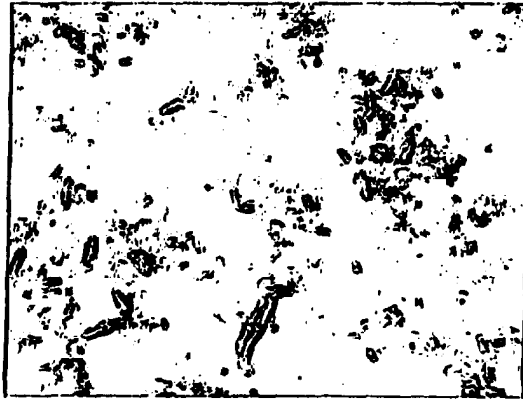
cc7, pH=5,2

A

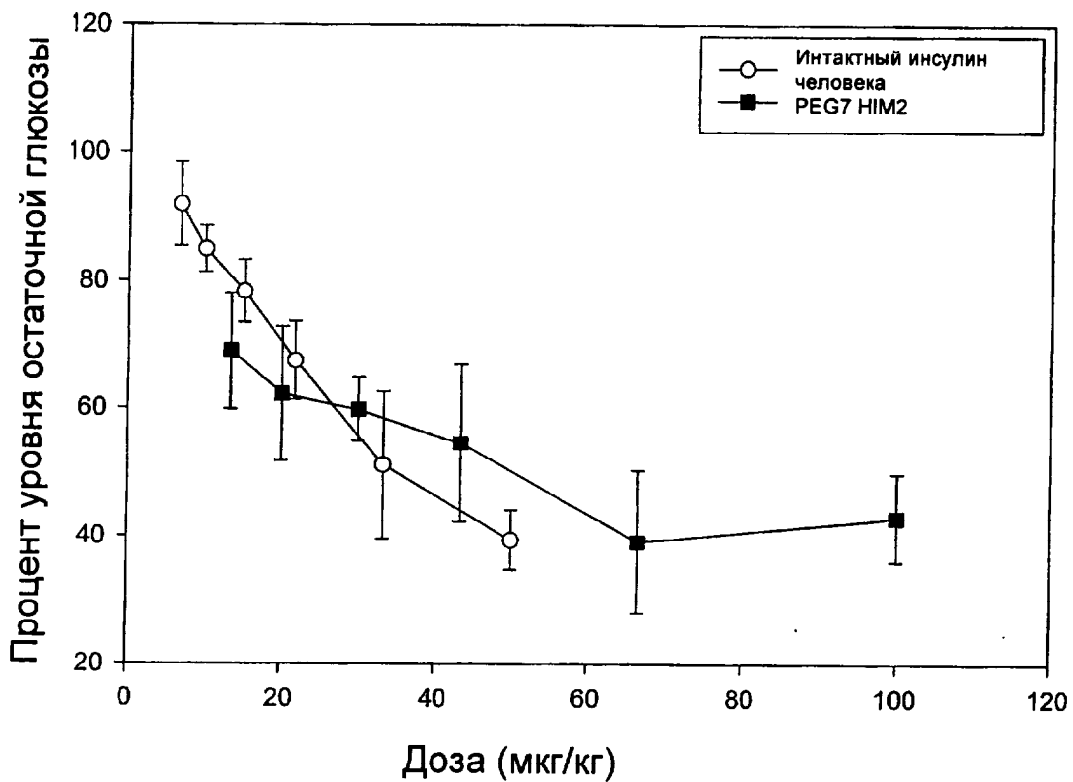


cc9, pH=5,4

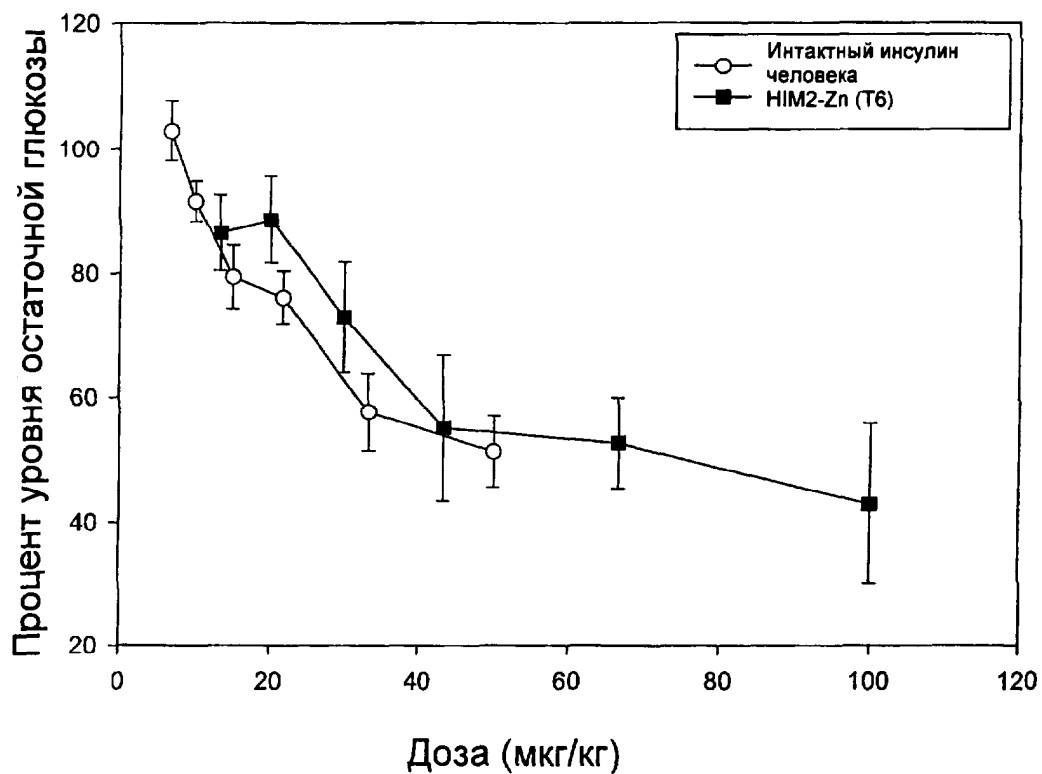
Б



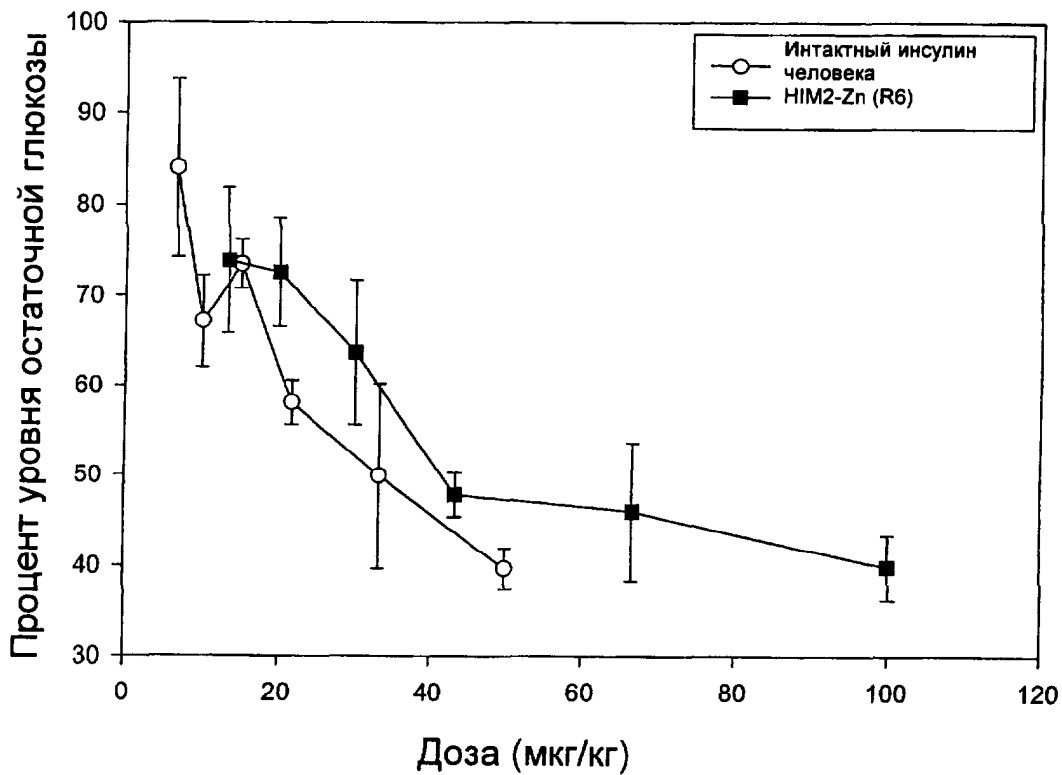
Фиг. 15



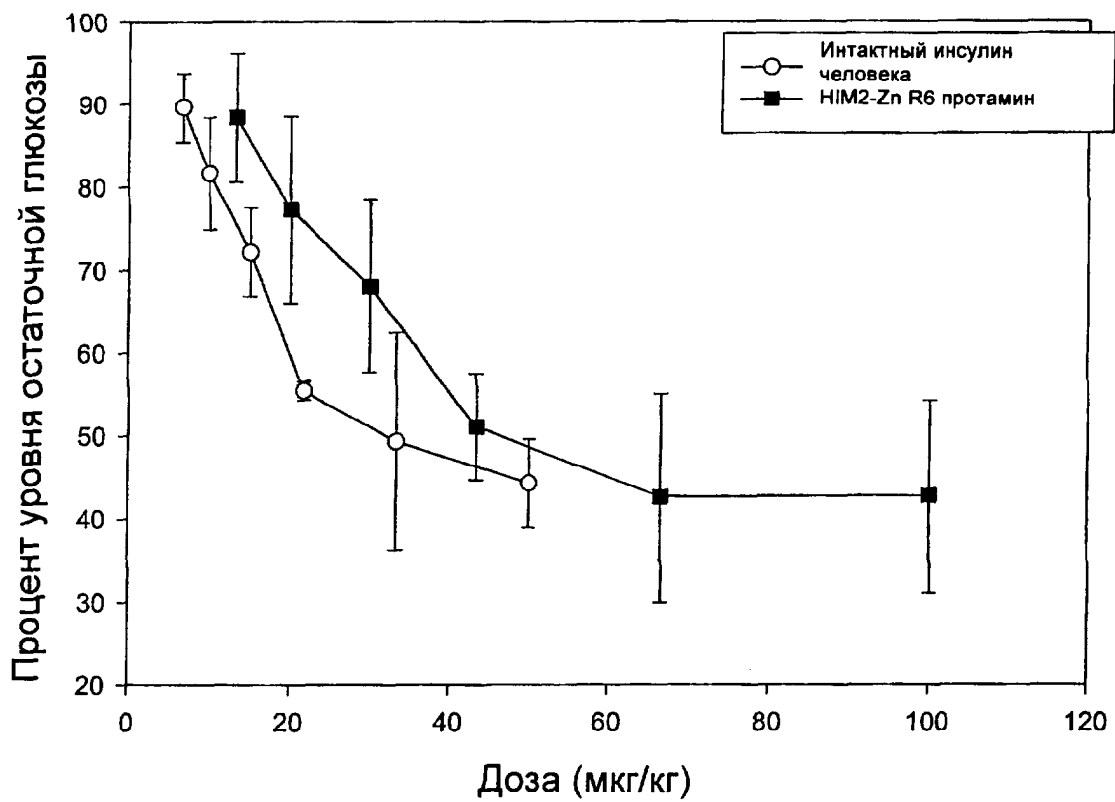
Фиг. 16



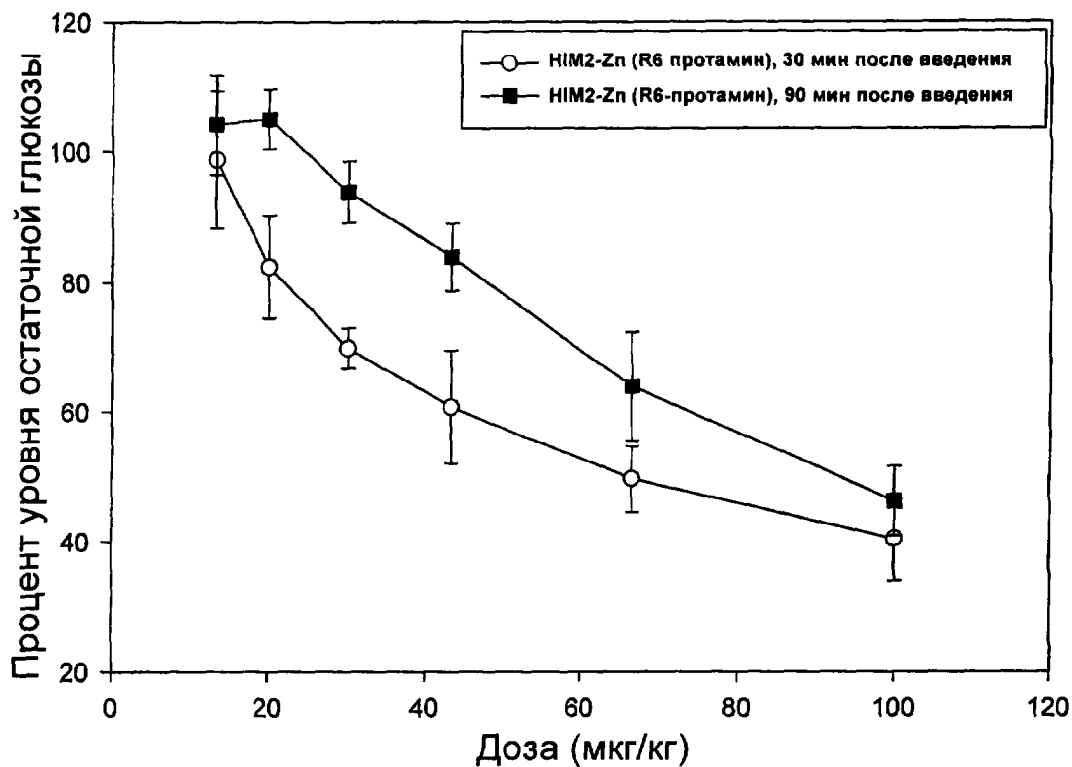
Фиг. 17



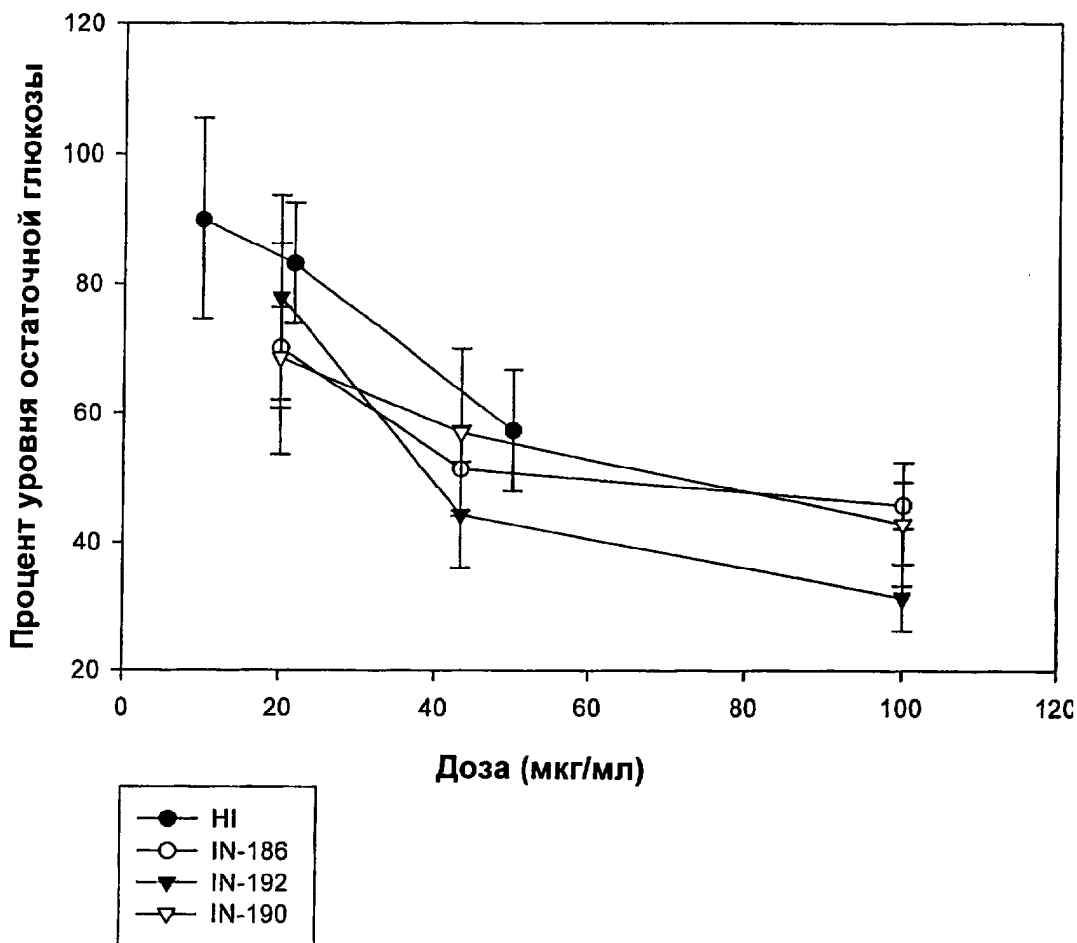
Фиг. 18



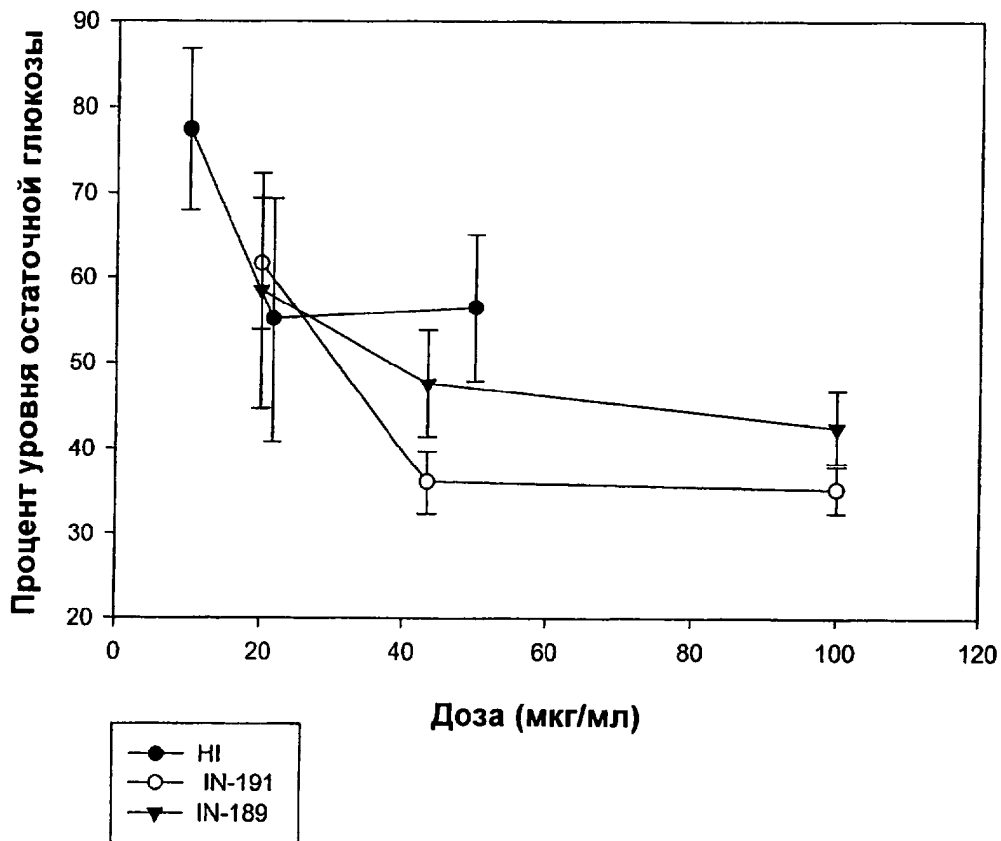
Фиг. 19



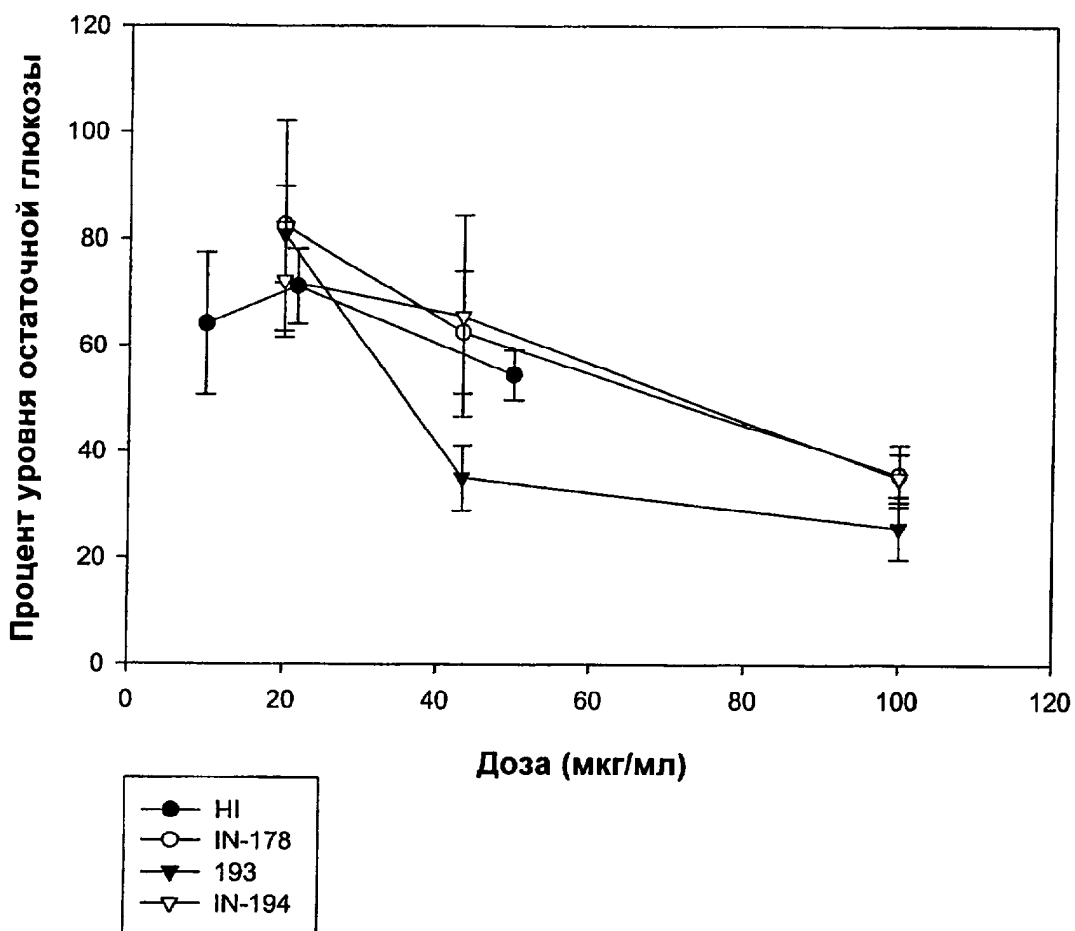
Фиг. 20



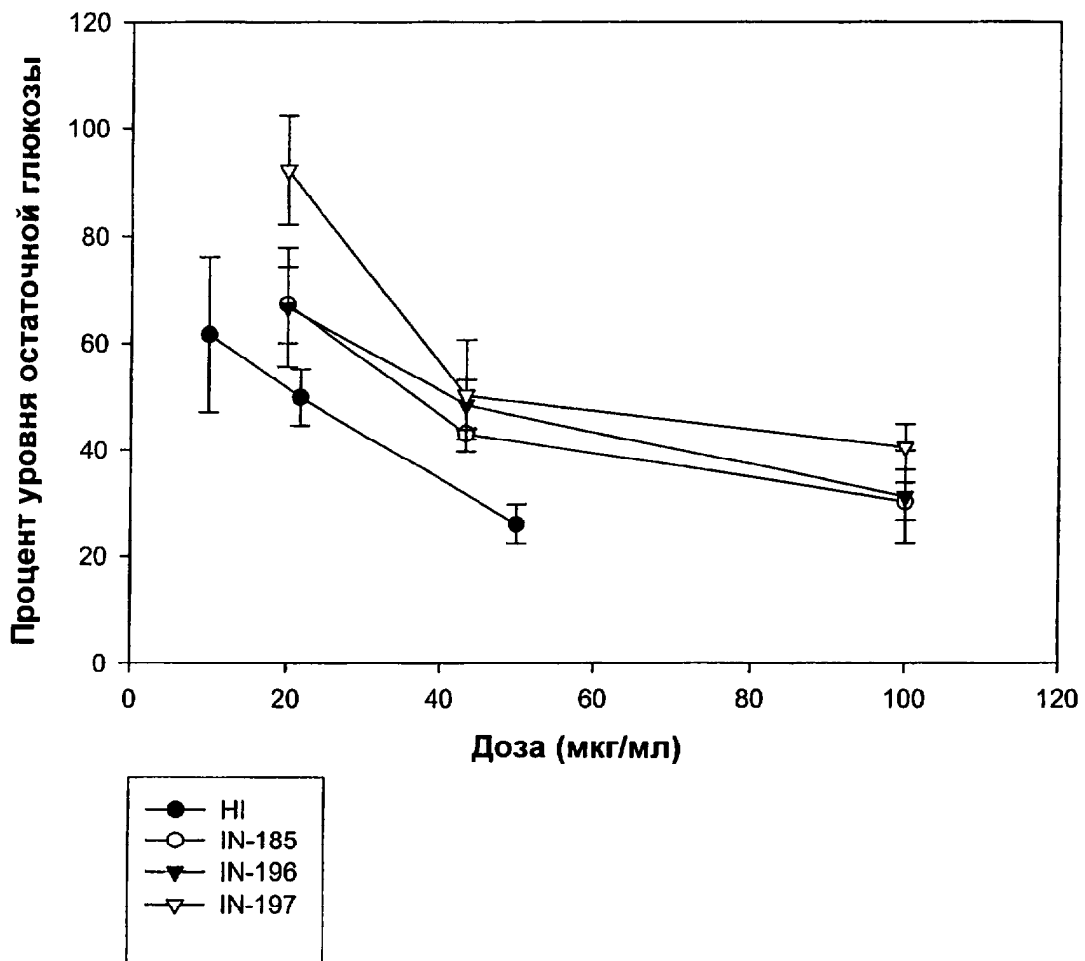
Фиг. 21



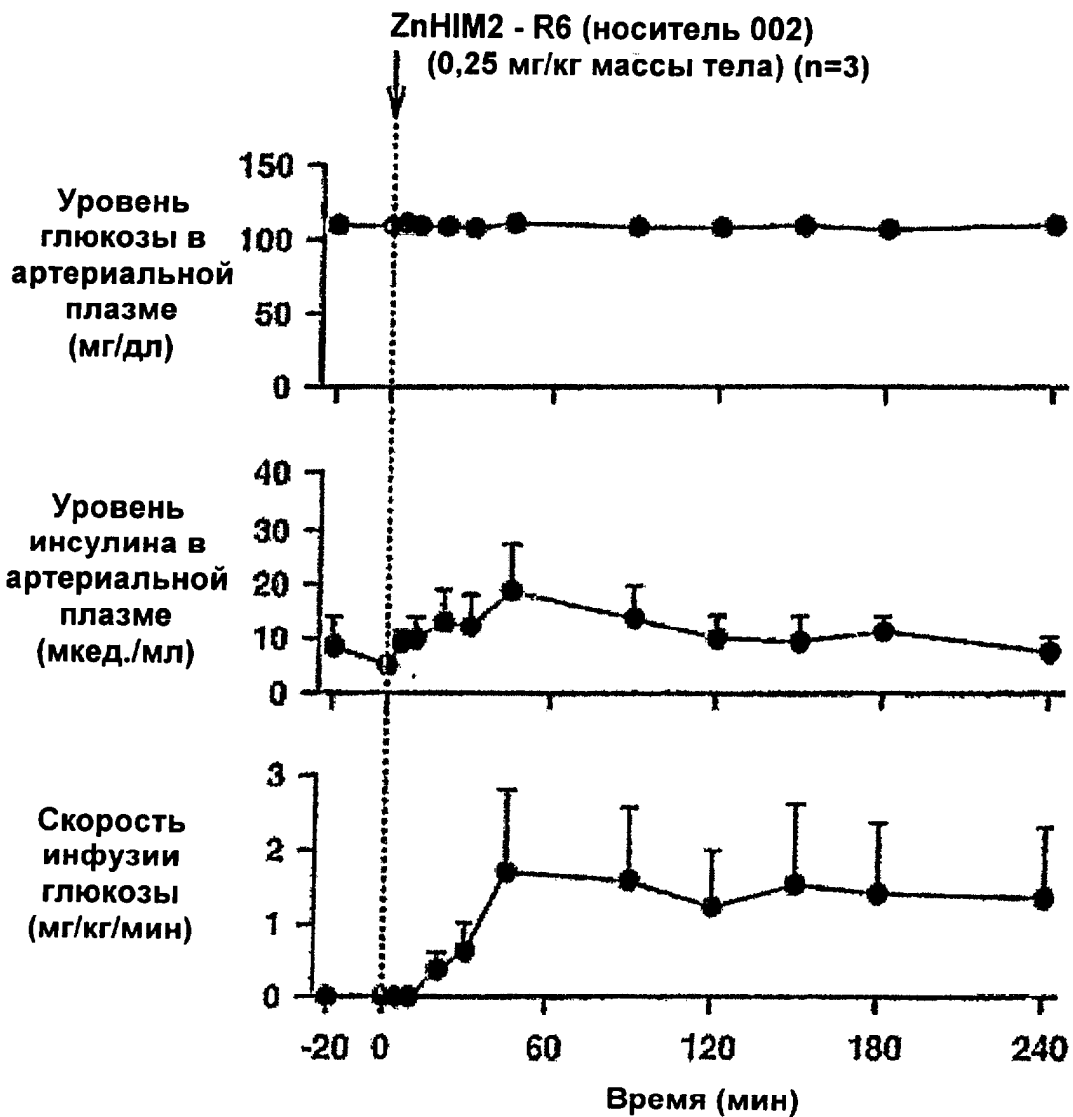
Фиг. 22



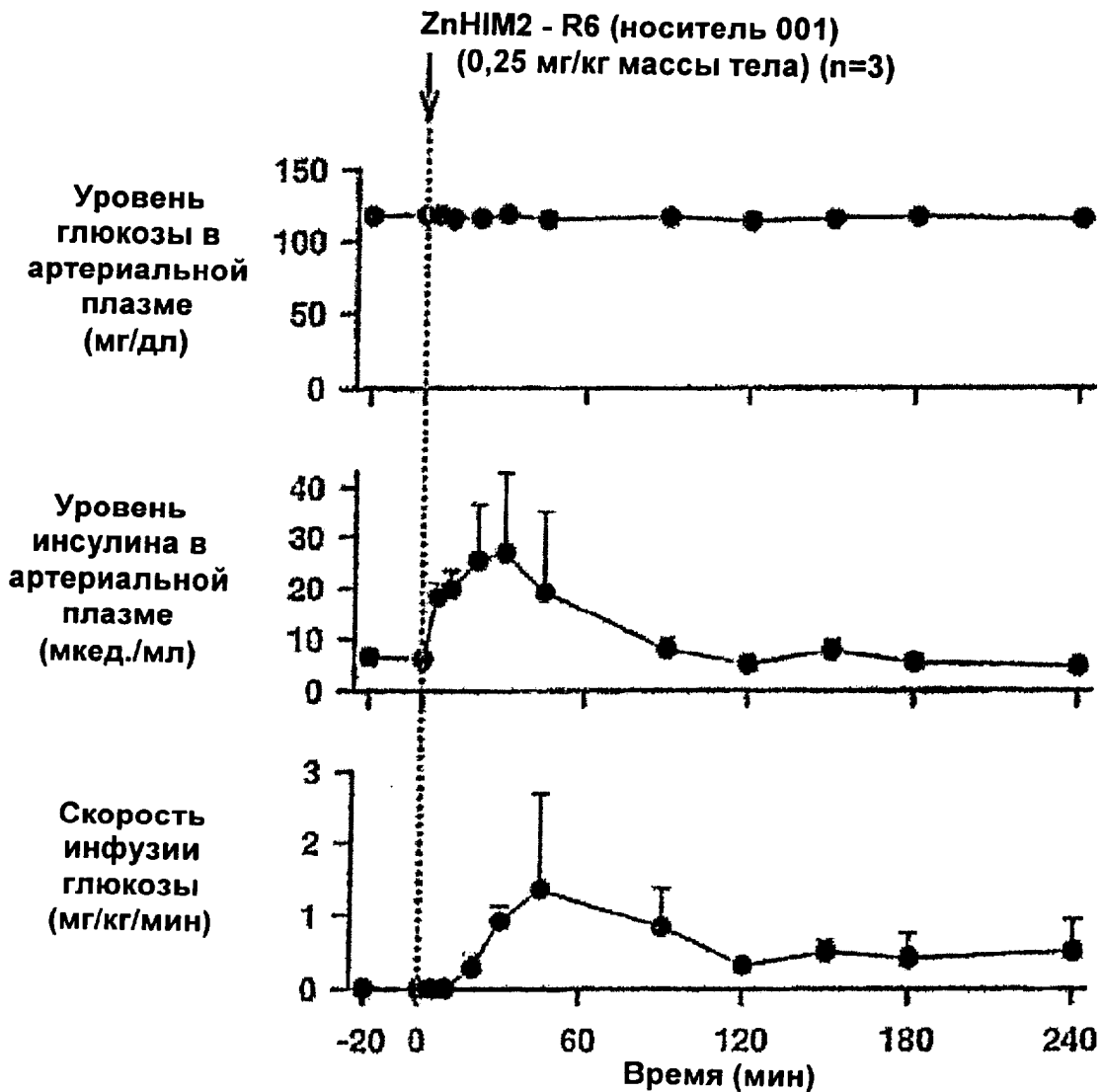
Фиг. 23



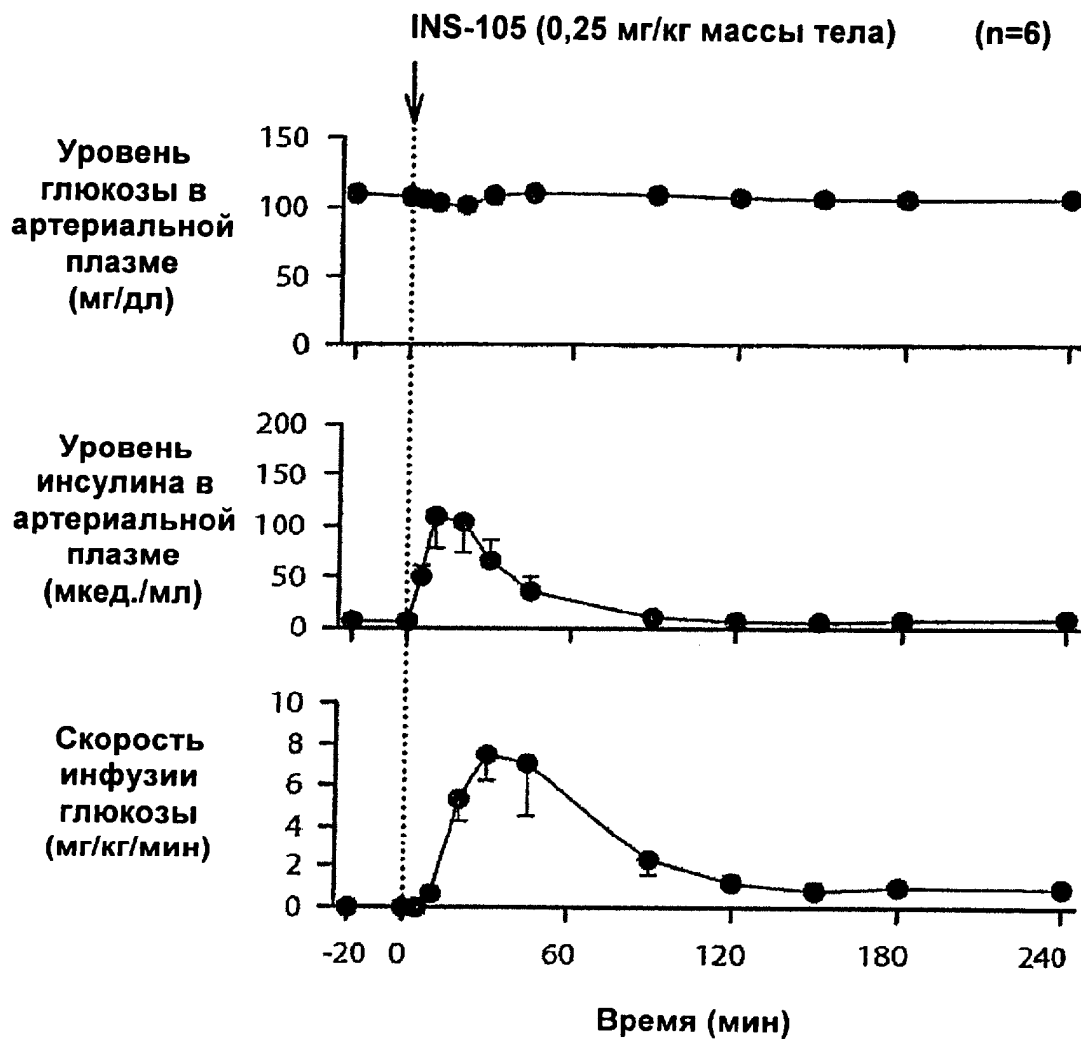
Фиг. 24



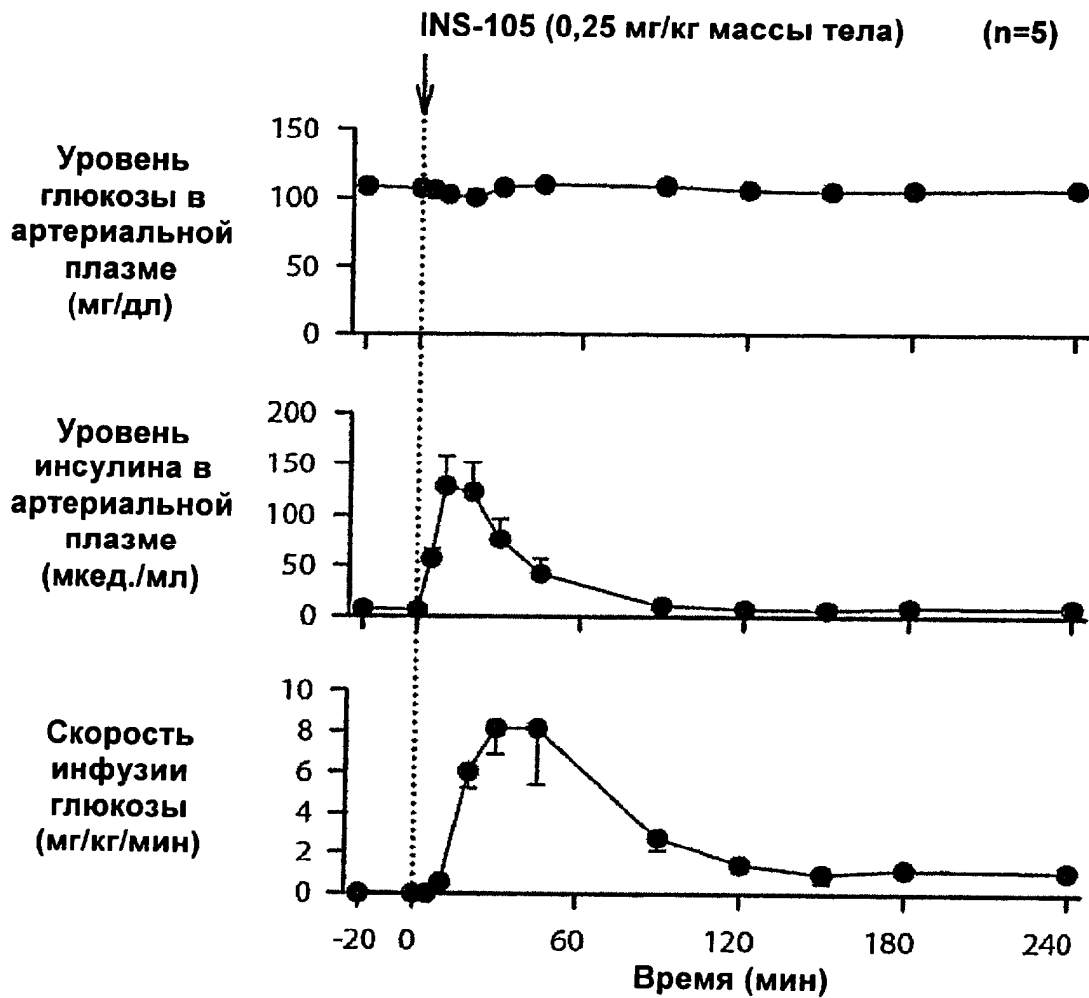
Фиг. 25



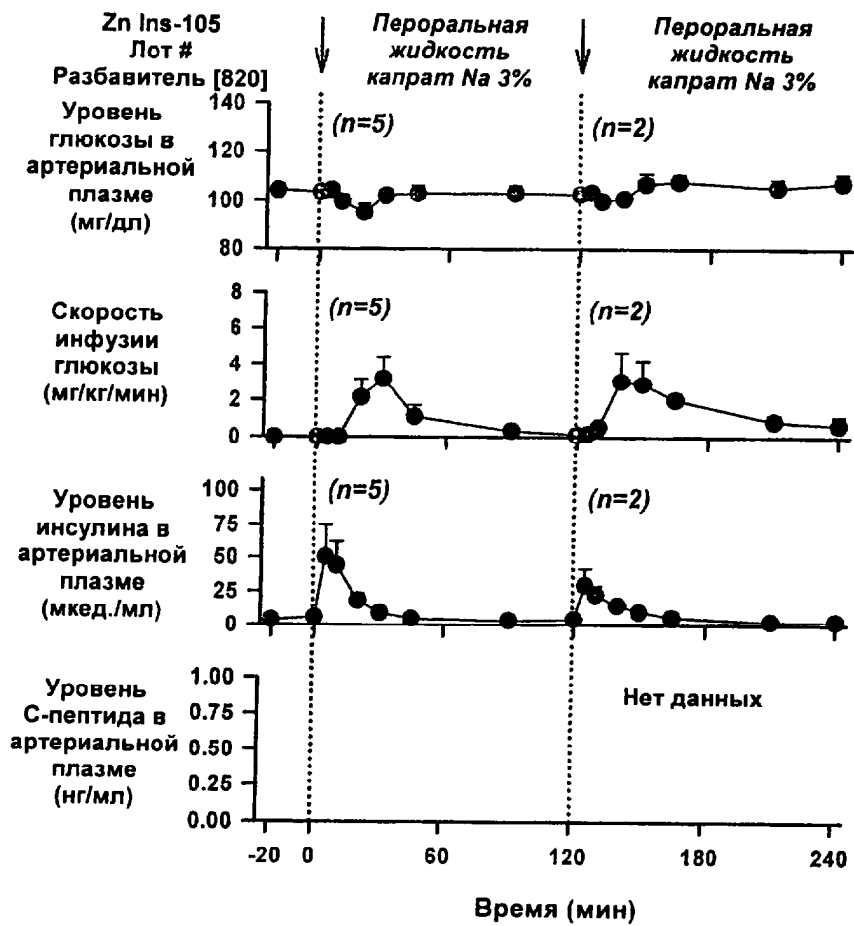
Фиг. 26



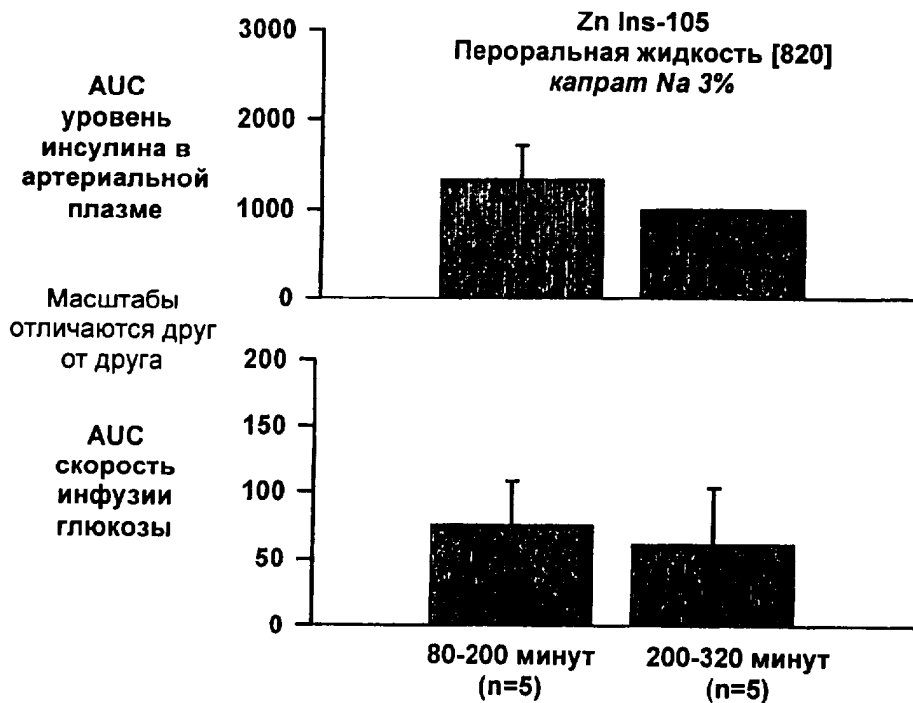
Фиг. 27



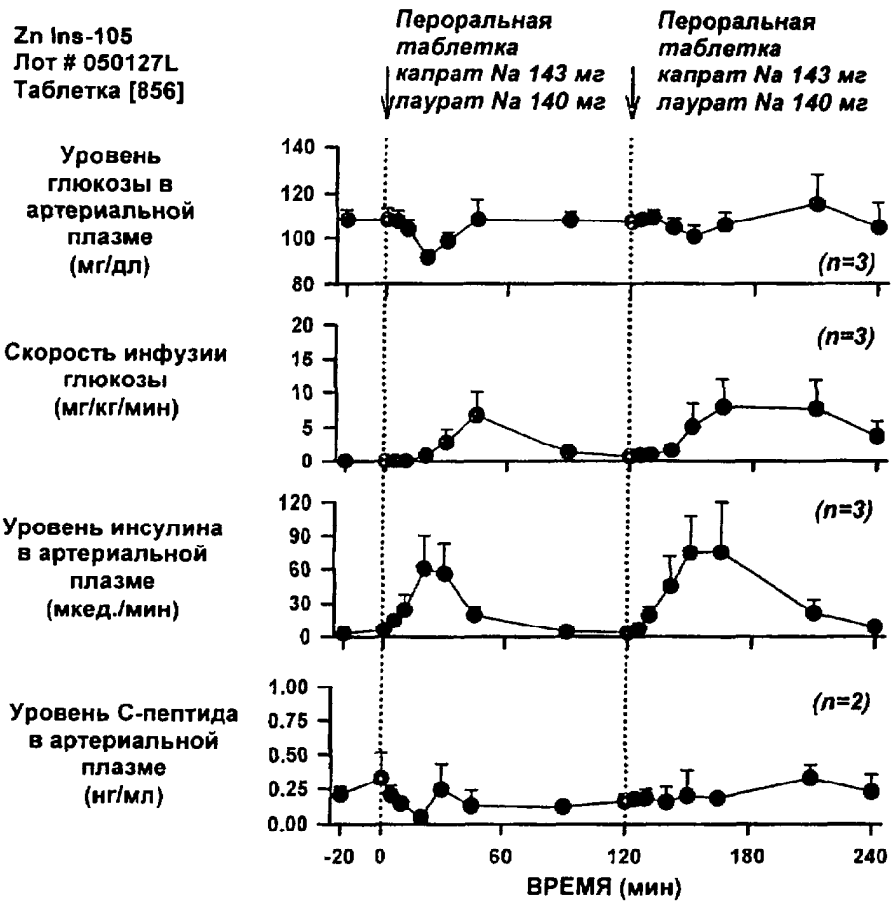
Фиг. 28



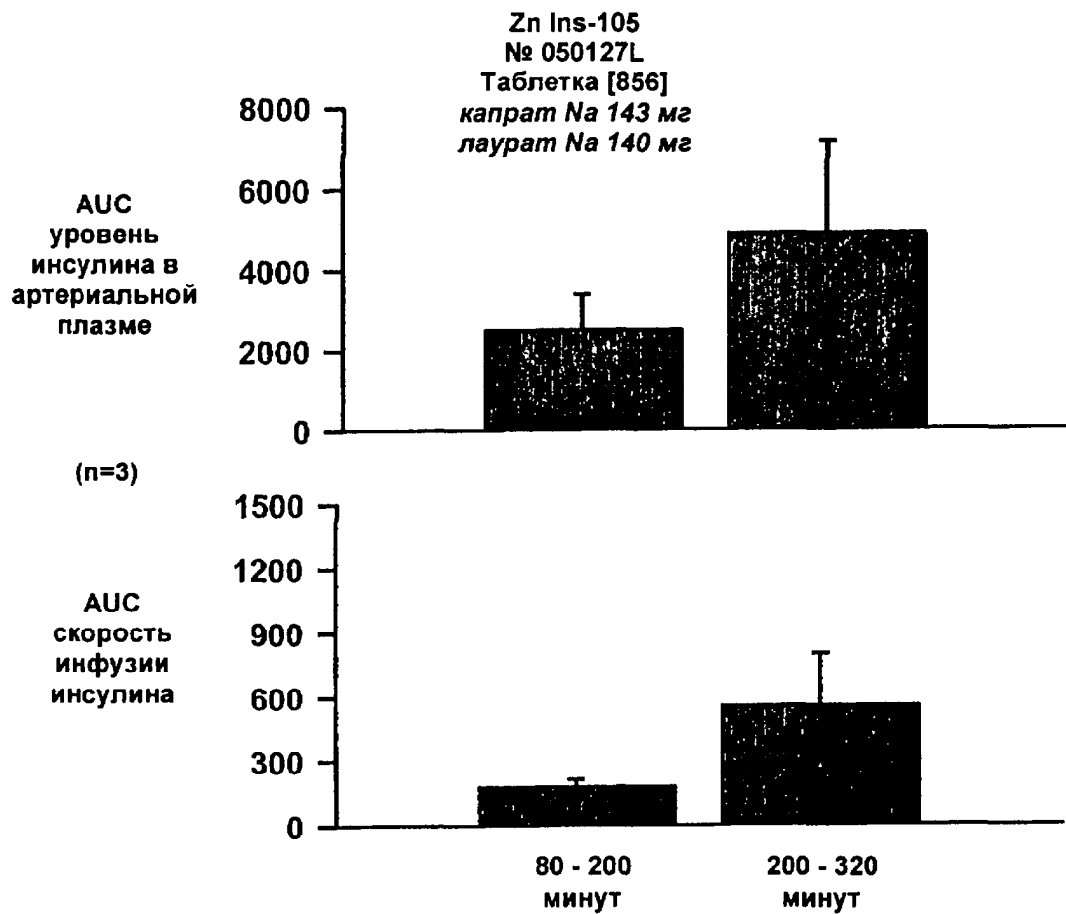
Фиг. 29



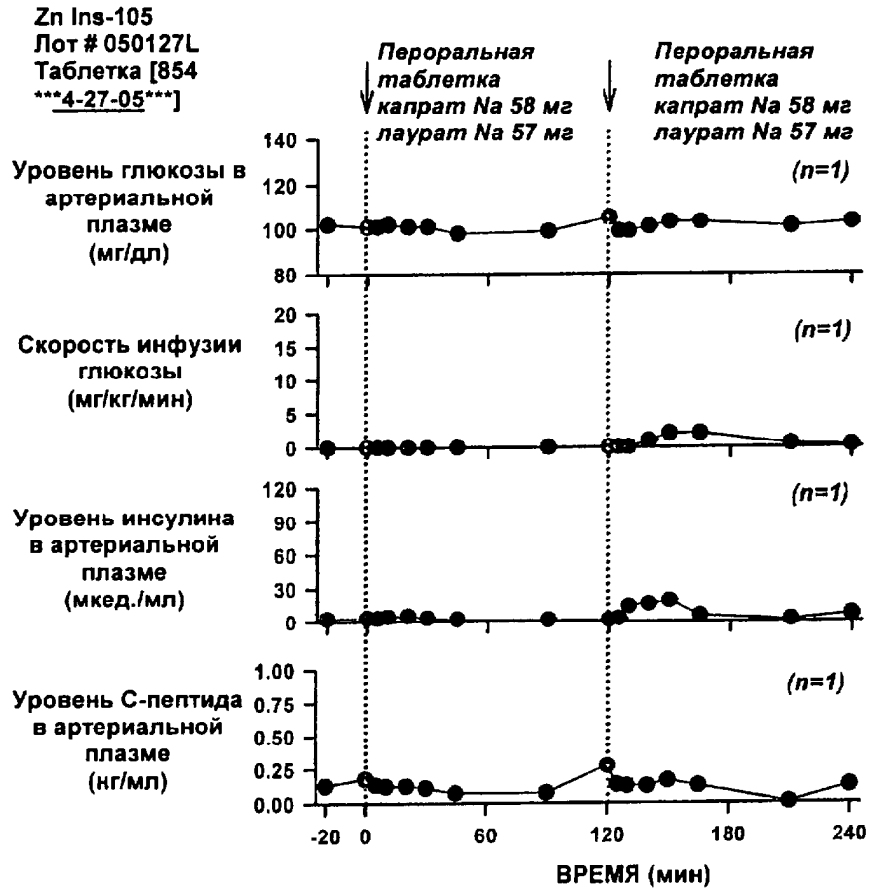
Фиг. 30



Фиг. 31

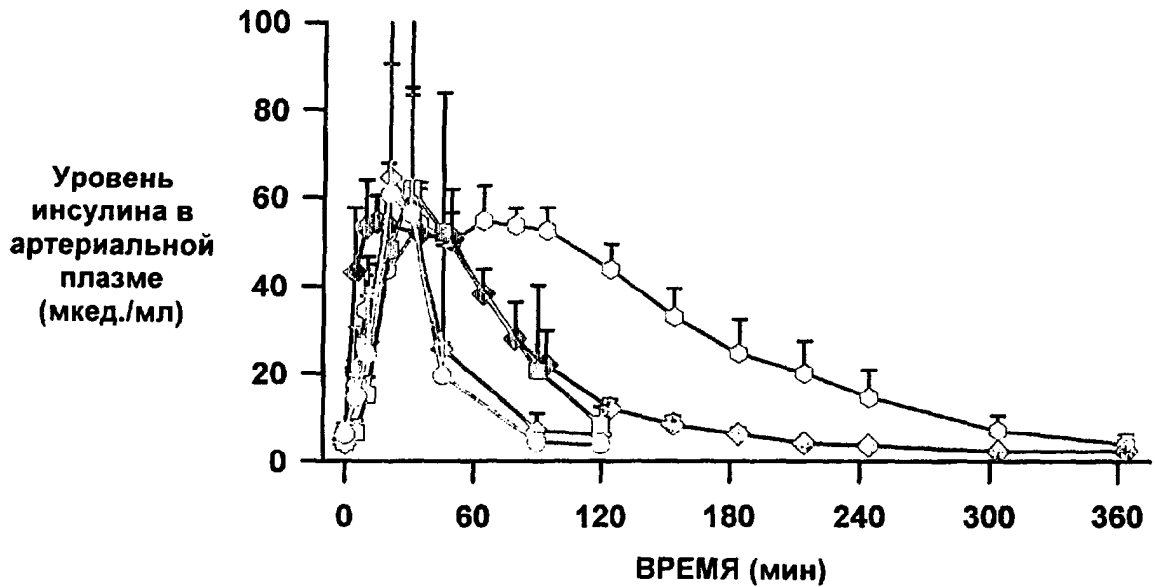


Фиг. 32



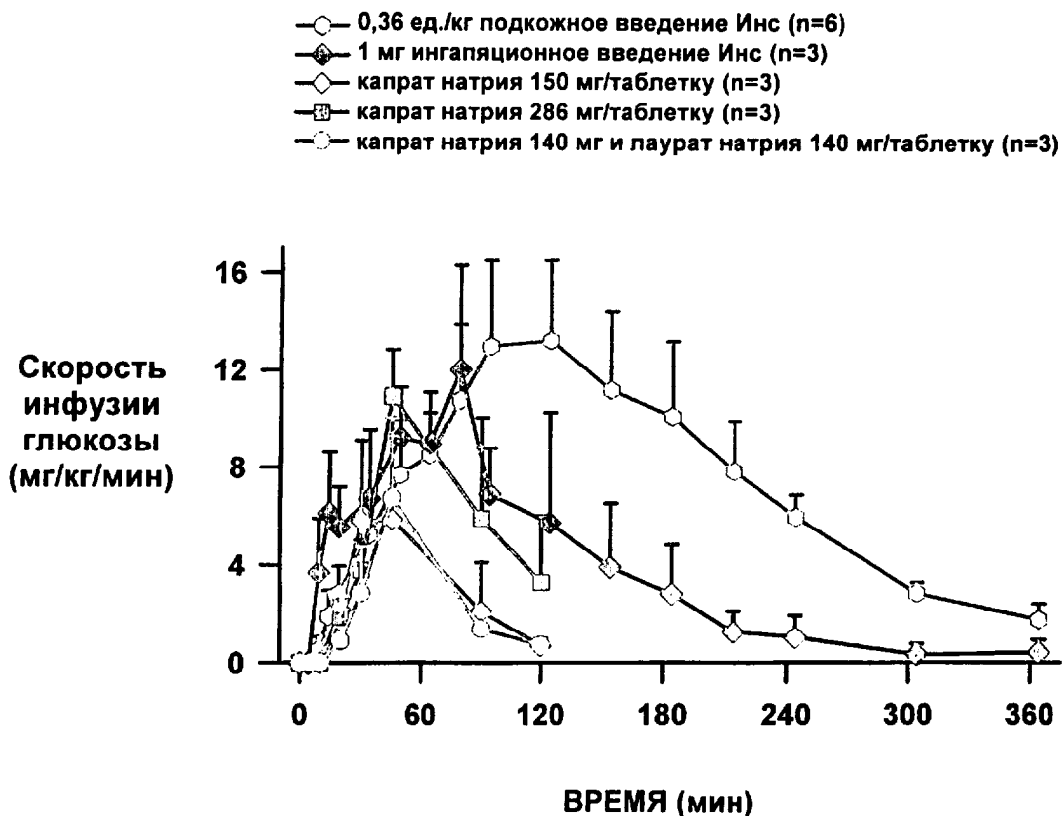
Фиг. 33

- 0,36 ед./кг подкожное введение Инс (n=6)
- ◇ 1 мг ингаляционное введение Инс (n=3)
- ◇ капрат натрия 150 мг/таблетку (n=3)
- капрат натрия 286 мг/таблетку (n=3)
- капрат натрия 140 мг и лаурат натрия 140 мг/таблетку (n=3)



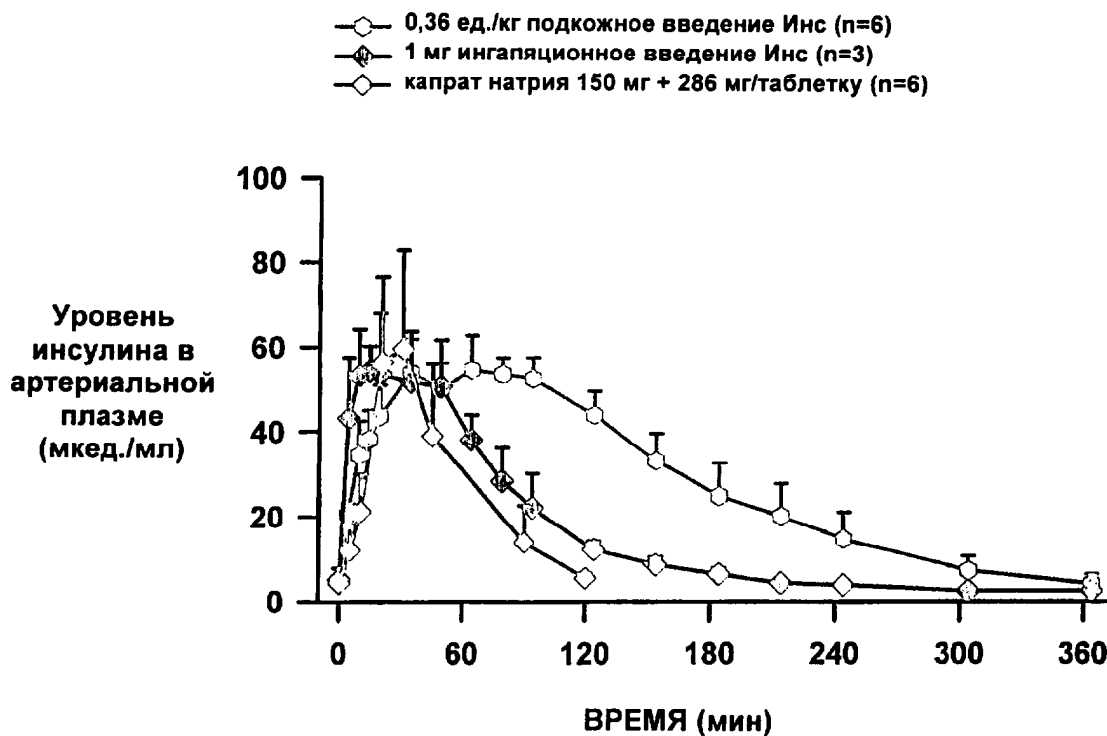
*Исторические данные, взятые из такой же модели на собаках

Фиг. 34



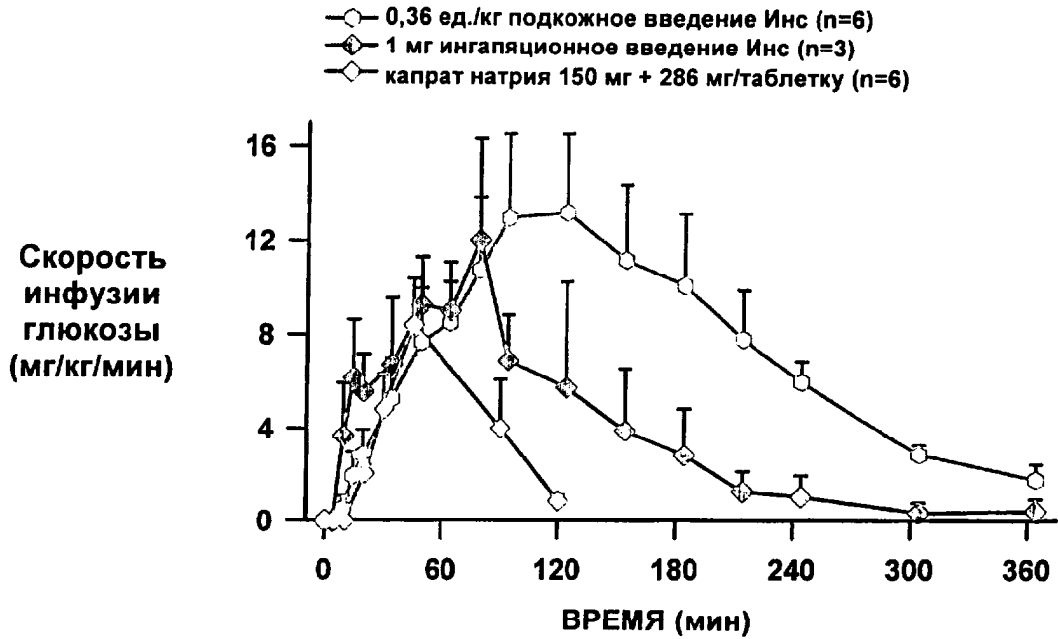
*Исторические данные, взятые из такой же модели на собаках

Фиг. 35



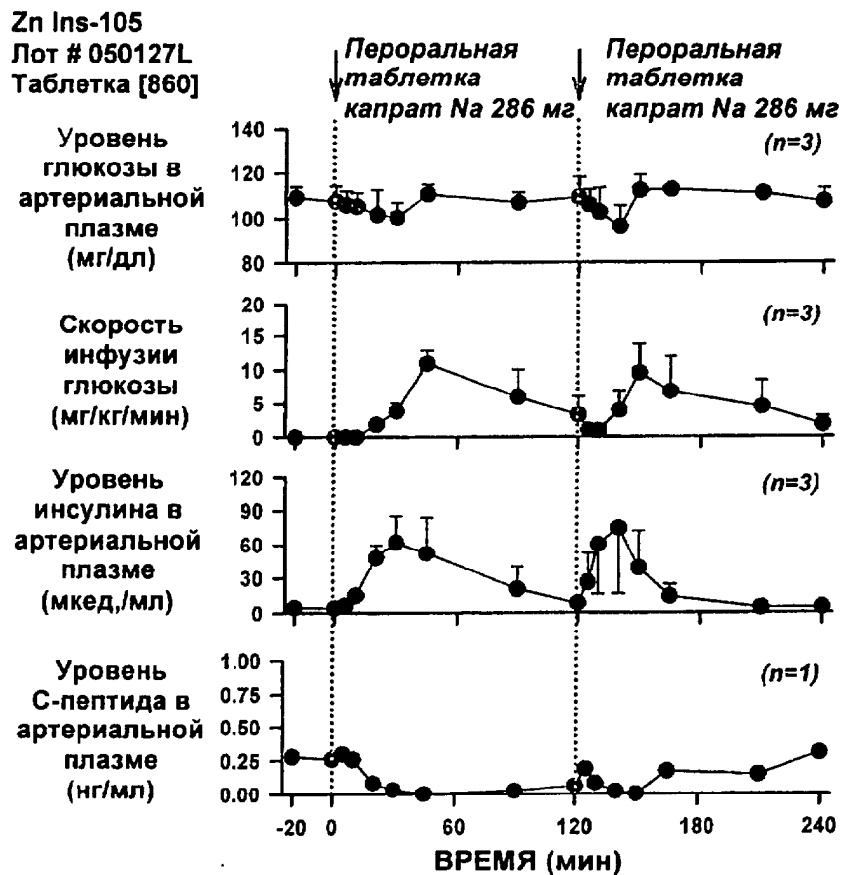
*Исторические данные, взятые из такой же модели на собаках

Фиг. 36

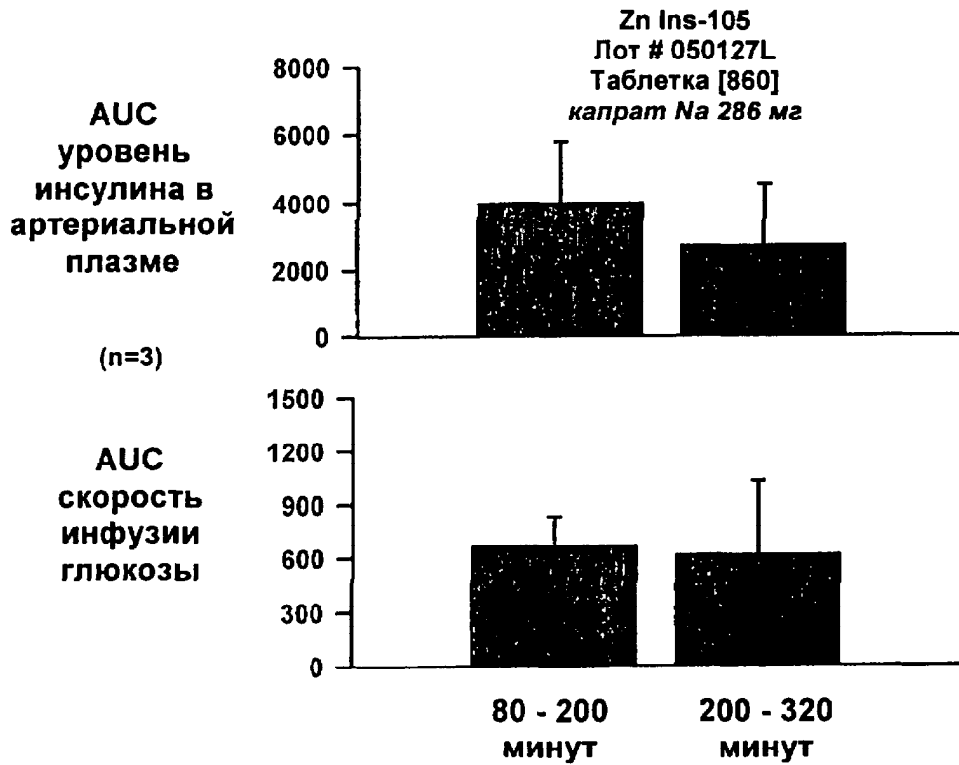


*Исторические данные, взятые из такой же модели на собаках

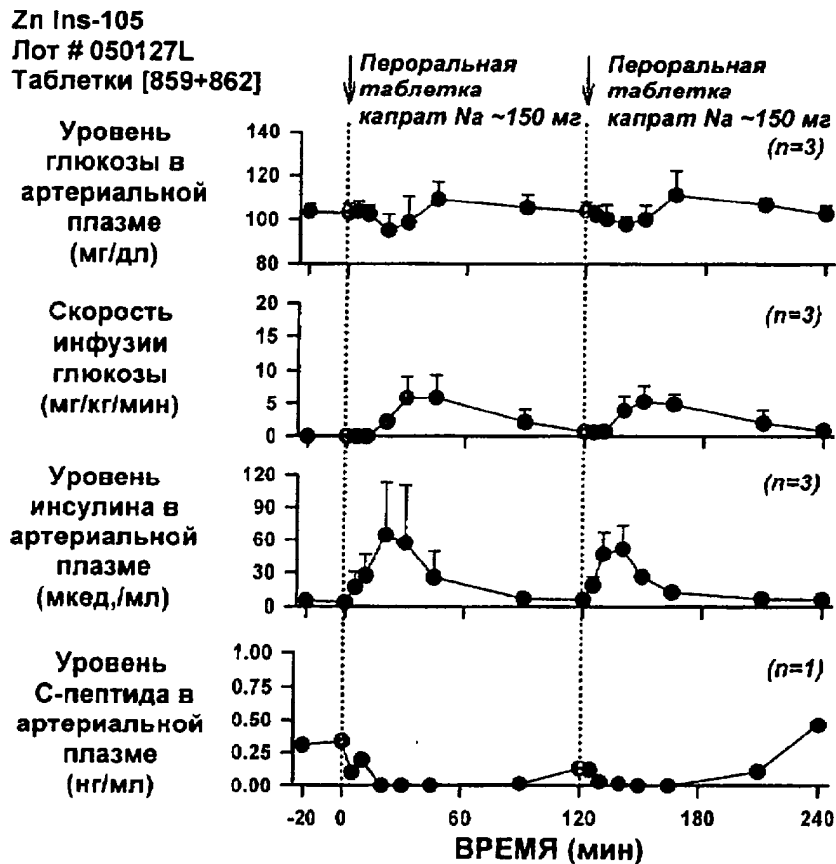
Фиг. 37



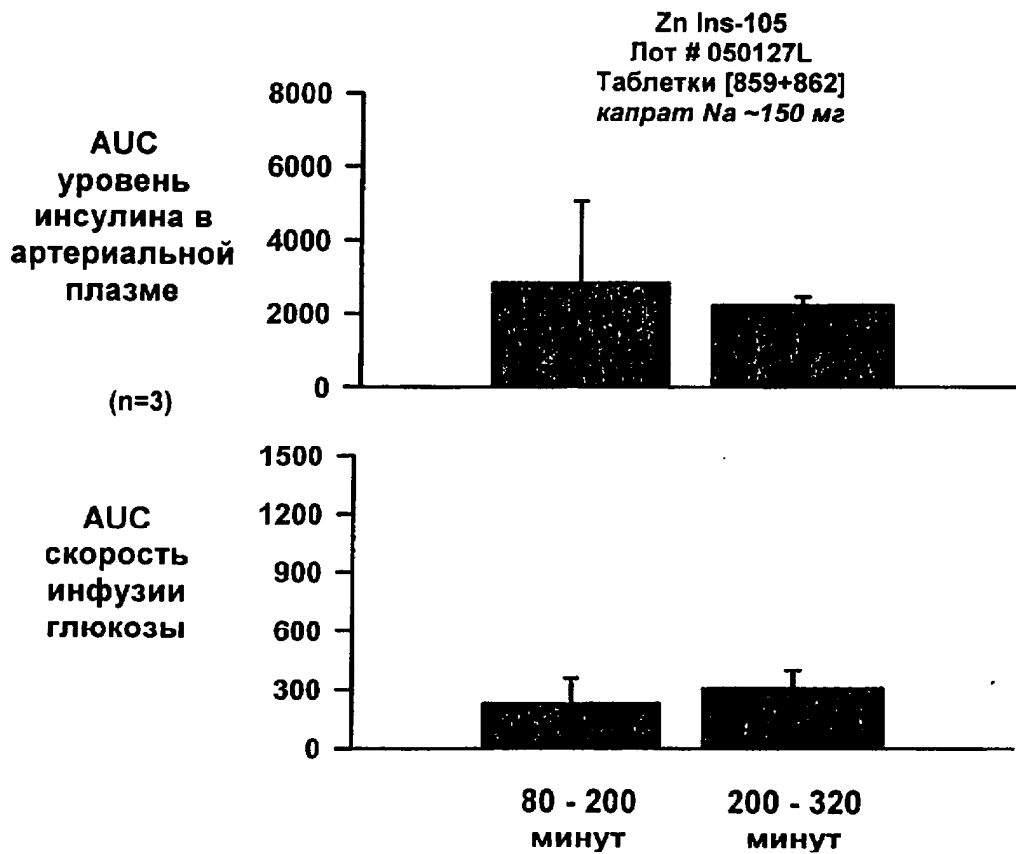
Фиг. 38



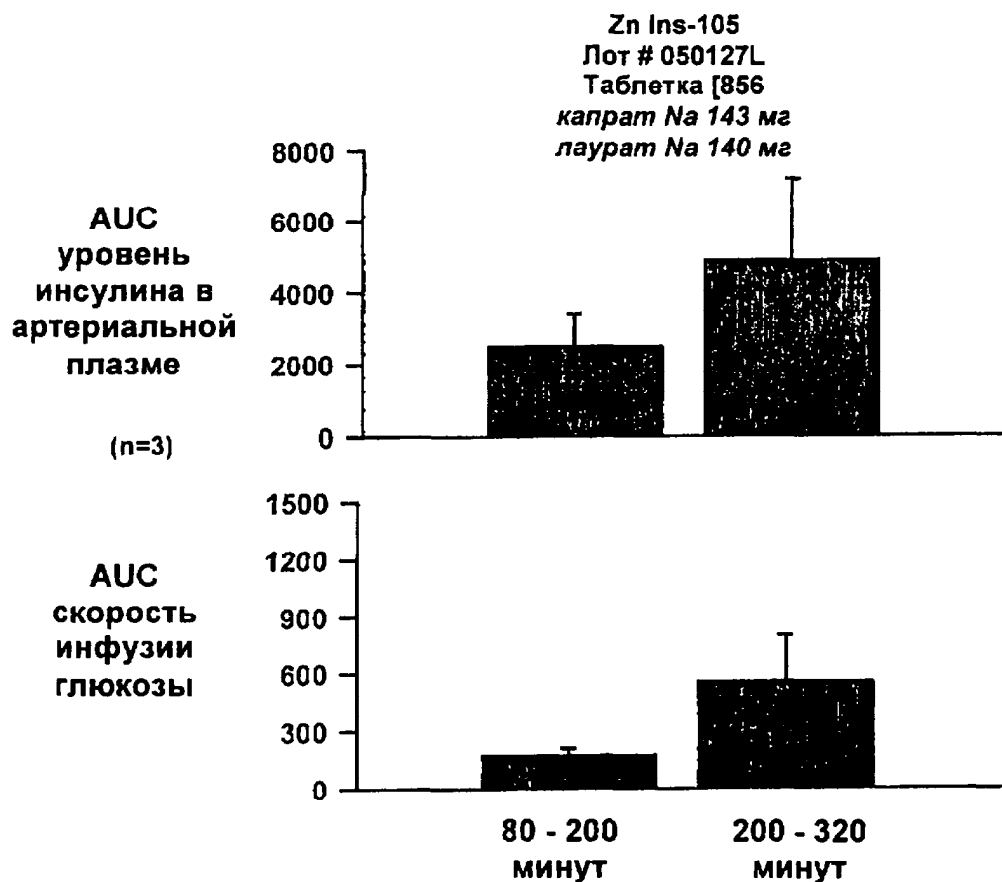
Фиг. 39



Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42