

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991576** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(51) Int. Cl. *A61K 38/28* (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.11.19

(54) **ЧАСТИЧНЫЕ АГОНИСТЫ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА**

(31) 62/082,857; 62/242,503

(32) 2014.11.21; 2015.10.16

(33) US

(62) 201791117; 2015.11.19

(71) Заявитель:
МЕРК ШАРП И ДОУМ КОРП. (US)

(72) Изобретатель:
Линь Суннянь, Янь Линь, Хо Пэй,
Писсарниcki Дмитрий, Фэн Даньцин,
Наргунд Рави, Чжу Юйпин, Кекедж
Ахмет, Мадсен-Дугган Кристина
Б., Ши Чжи-Цай, У Чжицай, Му
Инцзюнь (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрыты димеры инсулинов и димеры аналогов инсулина, которые действуют на инсулиновый рецептор как частичные агонисты.

A1

201991576

201991576

A1

ЧАСТИЧНЫЕ АГОНИСТЫ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ
УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

(1) Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к димерам инсулинов и димерам аналогов инсулина, которые действуют на инсулиновый рецептор как частичные агонисты.

(2) Описание предшествующего уровня техники

Инсулин является основной терапией для пациентов с сахарным диабетом типа 1 (T1DM) и многих пациентов с сахарным диабетом типа 2 (T2DM), назначаемой почти одной трети пациентов в США из всех пользователей противодиабетических препаратов за последнее десятилетие. Мировой рынок инсулинов в 2013 году составил 20,4 миллиардов долларов США и растет быстрее, чем все другие противодиабетические средства вместе взятые. Тем не менее, проблемы современных методов лечения инсулином, включая узкий Т1 до гипогликемии и увеличение массы тела, ограничивают их более широкое применение и возможность для пациентов достичь идеального контроля гликемии.

В дополнение к секреции прандиального инсулина в ответ на питание поджелудочная железа высвобождает инсулин с "базальной" скоростью, определяемой в основном уровнями глюкозы в плазме, для поддержания соответствующей регуляции уровня глюкозы натощак. Это достигается главным образом за счет контроля высвобождения глюкозы в печени посредством гепатозащитного действия эндогенного инсулина. Современные аналоги инсулина включают быстродействующие и базальные инсулины, а также их смеси. Быстродействующие аналоги инсулина (RAA) разработаны для контроля гипергликемии после приема пищи, тогда как инсулины с большой продолжительностью действия регулируют базальные уровни глюкозы. Инсулины длительного действия используют все T1DM (в комбинации с прандиальными инъекциями) и большинство пациентов с T2DM начинают терапию инсулином с базального продукта. Потребление базального инсулина быстро растет, так как во всем мире увеличивается популяция больных диабетом (особенно T2DM).

Несмотря на постоянные усилия по разработке в течение последних нескольких десятилетий доступные инсулины длительного действия все еще не оптимизированы по сравнению с физиологическим базальным инсулином. Частично это объясняется тем, что основное внимание уделялось улучшению линейности ФК этих аналогов, но не устранению относительной избыточной инсулинизации периферических тканей, которая вносит вклад в повышение риска гипогликемии. В результате гипогликемия остается основным медицинским риском с огромной нагрузкой на пациентов и вызывает значительную заболеваемость и смертность.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предлагает соединения, содержащие до двух инсулиновых молекул, ковалентно связанных с образованием димера инсулиновых молекул, который может активировать инсулиновый рецептор с регулярной инсулиноподобной активностью, но со сниженной максимальной активностью. Эти соединения являются частичными агонистами инсулинового рецептора (IPRA): они ведут себя как другие аналоги инсулина, эффективно снижая глюкозу, но с более низким риском гипогликемии.

Предлагаются ковалентные инсулиновые димеры-частичные агонисты инсулинового рецептора, составленные в виде новых и способных к превращению базальных инсулинов (введение один раз в день), которые демонстрируют улучшенный терапевтический индекс (TI) по сравнению с базальными инсулинами современного стандарта оказания медицинской помощи (SOC). В одном варианте осуществления IPRA настоящего изобретения могут эффективно снижать уровень глюкозы со сниженным риском гипогликемии у минипига с диабетом и обладают свойствами базального инсулина, который вводят один раз в день (QD). Улучшенный TI может давать специалистам-практикам возможность более агрессивного дозирования IPRA настоящего изобретения для достижения целевых показателей контроля уровня глюкозы натощак. Строгий контроль уровня глюкозы натощак и HbA1c с помощью IPRA может позволить им служить в качестве 1) применяемого отдельно инсулина длительного действия с улучшенным профилем эффективности и безопасности при T2DM и 2) улучшенного основного базального инсулина при T1DM (и

иногда T2DM) для применения с дополнительными дозами прандиальных быстродействующих аналогов инсулина (РАА). Таким образом, настоящее изобретение предлагает следующие варианты осуществления.

Настоящее изобретение предлагает частичный агонист инсулинового рецептора или инсулиновый димер, содержащий первый гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина и второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина, причем каждый гетеродимер включает в себя полипептид А-цепи и полипептид В-цепи, причем полипептид А-цепи и полипептид В-цепи связаны вместе посредством межцепочечных дисульфидных связей; причем первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина ковалентно связаны вместе посредством связывающего фрагмента, соединяющего боковые цепи аминокислот на карбоксильных концах или около карбоксильных концов двух соответствующих полипептидов В-цепи; и причем по меньшей мере один амино-конец полипептидов А-цепи и полипептидов В-цепи ковалентно связан с заместителем, при условии, что связывающий фрагмент не включает в себя дисульфидную связь. В отдельных аспектах по меньшей мере амино-концы полипептида А-цепи и полипептида В-цепи первого инсулина или аналога инсулина ковалентно связаны с заместителем.

В отдельных аспектах частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера амино-конец каждого полипептида А-цепи и каждого полипептида В-цепи ковалентно связан с заместителем. В отдельных аспектах амино-конец полипептида А-цепи и полипептида В-цепи первого инсулина или аналога инсулина и амино-конец полипептида А-цепи и полипептида В-цепи второго инсулина или аналога инсулина ковалентно связаны с заместителем. В вариантах осуществления, в которых амино-концы первого и второго инсулинов или аналогов инсулина ковалентно связаны с заместителем, заместитель на амино-концах полипептидов А-цепи и В-цепи первого инсулина или аналога инсулина может быть таким же, как заместитель на амино-концах полипептидов А-цепи и В-цепи второго инсулина или аналога инсулина. В вариантах осуществления, в которых амино-концы первого и второго инсулинов или аналогов инсулина ковалентно связаны с заместителем,

заместитель на amino-концах полипептидов А-цепи и В-цепи первого инсулина или аналога инсулина может отличаться от заместителя на amino-концах полипептидов А-цепи и В-цепи второго инсулина или аналога инсулина.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина являются одинаковыми, или первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина различаются.

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера связывающий фрагмент ковалентно связывает первый гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина и второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина посредством эпсилон-аминогруппы остатка лизина на карбоксильных концах или около карбоксильных концов их соответствующих полипептидов В-цепи.

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера заместитель имеет общую формулу $RC(O)-$, где R может представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, PEG, сахараиды, то есть в отдельных аспектах $RC(O)-$ может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель выбирают из группы, состоящей из ацетила, фенилацетила, карбамоила, N-алкилкарбамоила, изобутила, метоксиацетила, глицина, аминоэтилглюкозы (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-диметила и алкоксикарбонила.

В отдельных аспектах частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера каждый полипептид А-цепи независимо содержит аминокислотную последовательность $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$ (SEQ ID NO: 3), и каждый полипептид В-цепи независимо содержит аминокислотную последовательность $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}$ (SEQ ID NO: 4) или $X_{22}VNQX_{25}X_{26}CGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ (SEQ ID NO: 5), причем X_2 представляет собой изолейцин или треонин; X_3 представляет собой валин, глицин или лейцин; X_8 представляет

собой треонин или гистидин; X₁₇ представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин; X₁₉ представляет собой тирозин, 4-метоксифенилаланин, аланин или 4-аминофенилаланин; X₂₃ представляет собой аспарагин или глицин; X₂₂ представляет собой фенилаланин или дезаминофенилаланин; X₂₅ представляет собой гистидин или треонин; X₂₆ представляет собой лейцин или глицин; X₂₇ представляет собой фенилаланин или аспарагиновую кислоту; X₂₉ представляет собой аланин, глицин или серин; X₃₀ представляет собой гистидин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоцистеиновую кислоту или цистеиновую кислоту; X₃₁ представляет собой аспарагиновую кислоту, пролин или лизин; X₃₂ представляет собой лизин или пролин; X₃₃ представляет собой треонин, аланин или отсутствует; X₃₄ представляет собой аргинин или отсутствует; и X₃₅ представляет собой аргинин или отсутствует; при условии, что по меньшей мере один из X₃₁ или X₃₂ представляет собой лизин.

В отдельных аспектах частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера первый и второй инсулины или аналоги инсулина независимо представляют собой нативный человеческий инсулин, инсулин лизпро, инсулин аспарт, desB30 инсулин или инсулин гларгин.

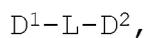
В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора или инсулиновых димеров связывающий фрагмент может представлять собой необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. Связывающий фрагмент может представлять собой двухвалентную, прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную, необязательно замещенную C1-C20 углеводородную цепь, в которой одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или

гетероалифатический фрагмент.

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера связывающий фрагмент представляет собой ацильный фрагмент, $-C(O)RC(O)-$, где R представляет собой алкильную цепь, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь, содержащую амид цепь, содержащую триазол(ы) цепь, циклооктин-содержащий фрагмент, замещенную ацильную цепь или полиэтиленгликолевую (PEG) цепь.

В другом аспекте связывающий фрагмент представляет собой алкилддиоил, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$, где $n=0-45$, включая, но без ограничения, оксалиловый (C2) фрагмент, сукциниловый (C4) фрагмент, адипоиловый (C6) фрагмент, субероиловый (C8) фрагмент, декандиоиловый (C10) фрагмент, додекандиоиловый (C12) фрагмент, тетрадекандиоиловый (C14) фрагмент или гексадекандиоиловый (C16) фрагмент.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает частичный агонист инсулинового рецептора или инсулиновый димер, имеющий формулу



где D^1 и D^2 независимо представляют собой полипептид инсулина или аналога инсулина, причем каждый инсулиновый полипептид представляет собой гетеродимер, содержащий полипептид А-цепи и полипептид В-цепи, связанные вместе посредством межцепочечных дисульфидных связей; L представляет собой связывающий фрагмент, причем один конец линкерного фрагмента прикреплен к аминокислотному остатку на карбоксильной группе или около карбоксильной группы D^1 , а другой конец линкерного фрагмента прикреплен к аминокислотному остатку на карбоксильном конце или около карбоксильного конца D^2 , при условии, что L не включает в себя дисульфидную связь; и причем первый и второй полипептиды инсулина или аналога инсулина включают в себя заместитель, прикрепленный к амино-концу полипептида А-цепи и полипептида В-цепи.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера D^1 и D^2 являются одинаковыми, или D^1 и D^2 различаются.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера связывающий фрагмент ковалентно связывает D¹ и D² посредством эpsilon-аминогруппы остатка лизина на карбоксильных концах или около карбоксильных концов D¹ и D².

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера заместитель имеет общую формулу RC(O)-, где R может представлять собой R'CH₂, R'NH, R'O, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, PEG, сахараиды, то есть в отдельных аспектах RC(O)- может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель выбирают из группы, состоящей из ацетила, фенилацетила, карбамоила, N-алкилкарбамоила, изобутила, метоксиацетила, глицина, аминоэтилглюкозы (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-диметила и алкоксикарбонила.

В отдельных аспектах частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера каждый полипептид А-цепи независимо содержит аминокислотную последовательность GX₂X₃EQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃ (SEQ ID NO: 3), и каждый полипептид В-цепи независимо содержит аминокислотную последовательность X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂ (SEQ ID NO: 4) или X₂₂VNQX₂₅X₂₆CGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅ (SEQ ID NO: 5), причем X₂ представляет собой изолейцин или треонин; X₃ представляет собой валин, глицин или лейцин; X₈ представляет собой треонин или гистидин; X₁₇ представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин; X₁₉ представляет собой тирозин, 4-метоксифенилаланин, аланин или 4-аминофенилаланин; X₂₃ представляет собой аспарагин или глицин; X₂₂ представляет собой фенилаланин или дезаминофенилаланин; X₂₅ представляет собой гистидин или треонин; X₂₆ представляет собой лейцин или глицин; X₂₇ представляет собой фенилаланин или аспарагиновую кислоту; X₂₉ представляет собой аланин, глицин или серин; X₃₀ представляет собой гистидин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоцистеиновую кислоту или цистеиновую кислоту; X₃₁ представляет собой аспарагиновую кислоту, пролин или лизин; X₃₂ представляет

собой лизин или пролин; X_{33} представляет собой треонин, аланин или отсутствует; X_{34} представляет собой аргинин или отсутствует; и X_{35} представляет собой аргинин или отсутствует; при условии, что по меньшей мере один из X_{31} или X_{32} представляет собой лизин.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера D^1 и D^2 независимо представляют собой нативный человеческий инсулин, инсулин лизпро, инсулин аспарт, desB30 инсулин или инсулин гларгин.

В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора или инсулиновых димеров связывающий фрагмент может представлять собой необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. Связывающий фрагмент может представлять собой двухвалентную, прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную, необязательно замещенную C1-C20 углеводородную цепь, в которой одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$, $-C(O)-$, $C(O)O-$, $OC(O)-$, $-N(R)C(O)-$, $-C(O)N(R)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $SO_2N(R)-$, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент.

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера связывающий фрагмент представляет собой ацильный фрагмент, $-C(O)RC(O)-$, где R представляет собой алкильную цепь, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь, содержащую амид цепь, содержащую триазол(ы) цепь, циклооктин-содержащий фрагмент, замещенную ацильную цепь или полиэтиленгликолевую (PEG) цепь.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера связывающий фрагмент представляет собой алкилдиоил, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$, где $n=0-45$, включая, но без ограничения, оксалиловый (C2) фрагмент, сукциниловый (C4)

фрагмент, адипоиловый (C6) фрагмент, субероиловый (C8) фрагмент, декандиоиловый (C10) фрагмент, додекандиоиловый (C12) фрагмент, тетрадекандиоиловый (C14) фрагмент или гексадекандиоиловый (C16) фрагмент.

Также предлагаются композиции, содержащие любой из вышеупомянутых частичных агонистов инсулинового рецептора или инсулиновый димер и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает частичный агонист инсулинового рецептора или инсулиновый димер, содержащий первый гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина и второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина, причем каждый гетеродимер включает в себя полипептид А-цепи и полипептид В-цепи, причем полипептид А-цепи и полипептид В-цепи связаны вместе посредством межцепочечных дисульфидных связей; причем первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина ковалентно связаны вместе посредством связывающего фрагмента, соединяющего боковые цепи аминокислот на карбоксильных концах или около карбоксильных концов двух соответствующих полипептидов В-цепи; и, необязательно, причем амино-конец по меньшей мере одного из полипептидов А-цепи и полипептидов В-цепи первого инсулинового полипептида или второго инсулинового полипептида ковалентно связан с заместителем, при условии, (1) что связывающий фрагмент не включает в себя дисульфидную связь, и (2) что, когда инсулин или аналог инсулина не представляет собой человеческий инсулин или аналог инсулина, и амино-концы полипептида А-цепи и полипептида В-цепи не включают в себя заместитель, то связывающий фрагмент не представляет собой оксалиловый (C2) фрагмент, субероиловый (C8) фрагмент или додекандиоиловый (C12) фрагмент.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина являются одинаковыми, или первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина различаются.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера связывающий фрагмент ковалентно связывает первый гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина и

второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина посредством эпсилон-аминогруппы остатка лизина на карбоксильных концах или около карбоксильных концов их соответствующих полипептидов В-цепи.

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера заместитель имеет общую формулу $RC(O)-$, где R может представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, PEG, сахараиды, то есть в отдельных аспектах $RC(O)-$ может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель выбирают из группы, состоящей из ацетила, фенилацетила, карбамоила, N-алкилкарбамоила, изобутила, метоксиацетила, глицина, аминоэтилглюкозы (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-диметила и алкоксикарбонила.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера первый и второй инсулины или аналоги инсулина независимо представляют собой нативный человеческий инсулин, инсулин лизпро, инсулин аспарт, desB30 инсулин или инсулин гларгин.

В отдельных аспектах частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера каждый полипептид А-цепи независимо содержит аминокислотную последовательность $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$ (SEQ ID NO: 3), и каждый полипептид В-цепи независимо содержит аминокислотную последовательность $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}$ (SEQ ID NO: 4) или $X_{22}VNQX_{25}X_{26}CGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ (SEQ ID NO: 5), причем X_2 представляет собой изолейцин или треонин; X_3 представляет собой валин, глицин или лейцин; X_8 представляет собой треонин или гистидин; X_{17} представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин; X_{19} представляет собой тирозин, 4-метоксифенилаланин, аланин или 4-аминофенилаланин; X_{23} представляет собой аспарагин или глицин; X_{22} представляет собой фенилаланин или дезаминофенилаланин; X_{25} представляет собой гистидин или треонин; X_{26} представляет собой лейцин или глицин;

X₂₇ представляет собой фенилаланин или аспарагиновую кислоту; X₂₉ представляет собой аланин, глицин или серин; X₃₀ представляет собой гистидин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоцистеиновую кислоту или цистеиновую кислоту; X₃₁ представляет собой аспарагиновую кислоту, пролин или лизин; X₃₂ представляет собой лизин или пролин; X₃₃ представляет собой треонин, аланин или отсутствует; X₃₄ представляет собой аргинин или отсутствует; и X₃₅ представляет собой аргинин или отсутствует; при условии, что по меньшей мере один из X₃₁ или X₃₂ представляет собой лизин.

В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора или инсулиновых димеров связывающий фрагмент может представлять собой необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. Связывающий фрагмент может представлять собой двухвалентную, прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную, необязательно замещенную C1-C20 углеводородную цепь, в которой одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент.

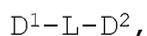
В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера связывающий фрагмент представляет собой ацильный фрагмент, -C(O)RC(O)-, где R представляет собой алкильную цепь, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь, содержащую амид цепь, содержащую триазол(ы) цепь, циклооктин-содержащий фрагмент, замещенную ацильную цепь или полиэтиленгликолевую (PEG) цепь.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера связывающий фрагмент представляет собой C2-C20 ацильный фрагмент.

В отдельных аспектах связывающий фрагмент представляет собой алкилдиоил, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$, где $n=0-45$, включая, но без ограничения, оксалиловый (C2) фрагмент, сукциниловый (C4) фрагмент, адипоиловый (C6) фрагмент, субероиловый (C8) фрагмент, декандиоиловый (C10) фрагмент, додекандиоиловый (C12) фрагмент, тетрадекандиоиловый (C14) фрагмент или гексадекандиоиловый (C16) фрагмент.

Также предлагаются композиции, содержащие любой из вышеупомянутых частичных агонистов инсулинового рецептора или инсулиновых димеров и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает частичный агонист инсулинового рецептора или инсулиновый димер, имеющий формулу



где D^1 и D^2 независимо представляют собой полипептид инсулина или аналога инсулина, причем каждый инсулиновый полипептид представляет собой гетеродимер, содержащий полипептид А-цепи и полипептид В-цепи, связанные вместе посредством межцепочечных дисульфидных связей; L представляет собой связывающий фрагмент, причем один конец линкерного фрагмента прикреплен к аминокислотному остатку на карбоксильной группе или около карбоксильной группы D^1 , а другой конец линкерного фрагмента прикреплен к аминокислотному остатку на карбоксильном конце или около карбоксильного конца D^2 , при условии, что L не включает в себя дисульфидную связь; и, необязательно, причем по меньшей мере один из D^1 или D^2 включает в себя заместитель, прикрепленный к амино-концу полипептида А-цепи или полипептида В-цепи D^1 или D^2 ; при условии, (1) что связывающий фрагмент не включает в себя дисульфидную связь, и (2) что, когда амино-концы полипептида А-цепи и полипептида В-цепи не включают в себя заместитель, то связывающий фрагмент не представляет собой оксалиловый (C2) фрагмент, субероиловый (C8) фрагмент или додекандиоиловый (C12) фрагмент.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера D^1 и D^2 являются одинаковыми, или D^1 и D^2 различаются.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера связывающий фрагмент ковалентно связывает D¹ и D² посредством эpsilon-аминогруппы остатка лизина на карбоксильных концах или около карбоксильных концов D¹ и D².

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера заместитель имеет общую формулу RC(O)-, где R может представлять собой R'CH₂, R'NH, R'O, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, PEG, сахараиды, то есть в отдельных аспектах RC(O)- может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель выбирают из группы, состоящей из ацетила, фенилацетила, карбамоила, N-алкилкарбамоила, изобутила, метоксиацетила, глицина, аминоэтилглюкозы (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-диметила и алкоксикарбонила.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера D¹ и D² независимо представляют собой нативный человеческий инсулин, инсулин лизпро, инсулин аспарт, desB30 инсулин или инсулин гларгин.

В отдельных аспектах частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера каждый полипептид A-цепи независимо содержит аминокислотную последовательность GX₂X₃EQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃ (SEQ ID NO: 3), и каждый полипептид B-цепи независимо содержит аминокислотную последовательность X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂ (SEQ ID NO: 4) или X₂₂VNQX₂₅X₂₆CGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅ (SEQ ID NO: 5), причем X₂ представляет собой изолейцин или треонин; X₃ представляет собой валин, глицин или лейцин; X₈ представляет собой треонин или гистидин; X₁₇ представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин; X₁₉ представляет собой тирозин, 4-метоксифенилаланин, аланин или 4-аминофенилаланин; X₂₃ представляет собой аспарагин или глицин; X₂₂ представляет собой фенилаланин или дезаминофенилаланин; X₂₅ представляет собой гистидин или треонин; X₂₆ представляет собой лейцин или глицин; X₂₇ представляет собой фенилаланин или аспарагиновую кислоту; X₂₉

представляет собой аланин, глицин или серин; X_{30} представляет собой гистидин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоцистеиновую кислоту или цистеиновую кислоту; X_{31} представляет собой аспарагиновую кислоту, пролин или лизин; X_{32} представляет собой лизин или пролин; X_{33} представляет собой треонин, аланин или отсутствует; X_{34} представляет собой аргинин или отсутствует; и X_{35} представляет собой аргинин или отсутствует; при условии, что по меньшей мере один из X_{31} или X_{32} представляет собой лизин.

В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора или инсулиновых димеров связывающий фрагмент может представлять собой необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. Связывающий фрагмент может представлять собой двухвалентную, прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную, необязательно замещенную C1-C20 углеводородную цепь, в которой одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$, $-C(O)-$, $C(O)O-$, $OC(O)-$, $-N(R)C(O)-$, $-C(O)N(R)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $SO_2N(R)-$, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент.

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера связывающий фрагмент представляет собой ацильный фрагмент, $-C(O)RC(O)-$, где R представляет собой алкильную цепь, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь, содержащую амид цепь, содержащую триазол(ы) цепь, циклооктин-содержащий фрагмент, замещенную ацильную цепь или полиэтиленгликолевую (PEG) цепь.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора или инсулинового димера связывающий фрагмент представляет собой C2-C20 ацильный фрагмент.

В отдельных аспектах связывающий фрагмент представляет

собой алкилддиоил, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$, где $n=0-45$, включая, но без ограничения, оксалиловый (C2) фрагмент, сукциниловый (C4) фрагмент, адипоиловый (C6) фрагмент, субероиловый (C8) фрагмент, декандиоиловый (C10) фрагмент, додекандиоиловый (C12) фрагмент, тетрадекандиоиловый (C14) фрагмент или гексадекандиоиловый (C16) фрагмент.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает димер аналогов инсулина, содержащий:

первый гетеродимер аналогов инсулина и второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина, причем каждый гетеродимер включает в себя полипептид А-цепи и полипептид В-цепи, причем полипептид А-цепи и полипептид В-цепи связаны вместе посредством межцепочечных дисульфидных связей; причем первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина ковалентно связаны вместе посредством связывающего фрагмента, соединяющего боковые цепи аминокислот на карбоксильных концах или около карбоксильных концов двух соответствующих полипептидов В-цепи; причем аналог инсулина выбирают из инсулина лизпро, инсулина аспарта и инсулина гларгина; и, необязательно, причем амино-конец по меньшей мере одного из полипептидов А-цепи и полипептидов В-цепи первого инсулинового полипептида или второго инсулинового полипептида ковалентно связан с заместителем, при условии, что связывающий фрагмент не включает в себя дисульфидную связь.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина являются одинаковыми, или первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина различаются.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора связывающий фрагмент ковалентно связывает первый гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина и второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина посредством эpsilon-аминогруппы остатка лизина на карбоксильных концах или около карбоксильных концов их соответствующих полипептидов В-цепи.

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора заместитель имеет общую формулу $RC(O)-$, где R может

представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и R' может представлять собой H , линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, PEG, сахараиды, то есть в отдельных аспектах $RC(O)-$ может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N -алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель выбирают из группы, состоящей из ацетила, фенилацетила, карбамоила, N -алкилкарбамоила, изобутила, метоксиацетила, глицина, аминоэтилглюкозы (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N -диметила и алкоксикарбонила.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора по меньшей мере один из первого и второго инсулина или аналога инсулина дополнительно конъюгирован с полиэтиленгликолем, фрагментом сахара или гетероциклом.

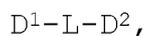
В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора связывающий фрагмент может представлять собой необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. Связывающий фрагмент может представлять собой двухвалентную, прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную, необязательно замещенную $C1-C20$ углеводородную цепь, в которой одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$, $-C(O)-$, $C(O)O-$, $OC(O)-$, $-N(R)C(O)-$, $-C(O)N(R)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $SO_2N(R)-$, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент.

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора связывающий фрагмент представляет собой ацильный фрагмент, $-C(O)RC(O)-$, где R представляет собой алкильную цепь, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь, содержащую амид цепь, содержащую триазол(ы) цепь, циклооктин-содержащий фрагмент, замещенную ацильную цепь или полиэтиленгликолевую (PEG) цепь.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора связывающий фрагмент представляет собой C2-C20 ацильный фрагмент.

В отдельных аспектах связывающий фрагмент представляет собой алкилдиоил, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$, где $n=0-45$, включая, но без ограничения, оксалиловый (C2) фрагмент, сукциниловый (C4) фрагмент, адипоиловый (C6) фрагмент, субероиловый (C8) фрагмент, декандиоиловый (C10) фрагмент, додекандиоиловый (C12) фрагмент, тетрадекандиоиловый (C14) фрагмент или гексадекандиоиловый (C16) фрагмент.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает димер аналогов инсулина, имеющий формулу



где D^1 и D^2 независимо представляют собой полипептид инсулина или аналога инсулина, причем каждый инсулиновый полипептид представляет собой гетеродимер, содержащий полипептид А-цепи и полипептид В-цепи, связанные вместе посредством межцепочечных дисульфидных связей; L представляет собой связывающий фрагмент, причем один конец линкерного фрагмента прикреплен к аминокислотному остатку на карбоксильной группе или около карбоксильной группы D^1 , а другой конец линкерного фрагмента прикреплен к аминокислотному остатку на карбоксильном конце или около карбоксильного конца D^2 , при условии, что L не включает в себя дисульфидную связь; причем аналог инсулина выбирают из инсулина лизпро, инсулина аспарта и инсулина гларгина; и, необязательно, причем по меньшей мере один из D^1 или D^2 включает в себя заместитель, прикрепленный к амино-концу полипептида А-цепи или полипептида В-цепи D^1 или D^2 ; при условии, что связывающий фрагмент не включает в себя дисульфидную связь.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора D^1 и D^2 являются одинаковыми, или D^1 и D^2 различаются.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора связывающий фрагмент ковалентно связывает D^1 и D^2 посредством эпсилон-аминогруппы остатка лизина на карбоксильных концах или около карбоксильных концов D^1 и D^2 .

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового

рецептора заместитель имеет общую формулу $RC(O)-$, где R может представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, PEG, сахараиды, то есть в отдельных аспектах $RC(O)-$ может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель выбирают из группы, состоящей из ацетила, фенилацетила, карбамоила, N-алкилкарбамоила, изобутила, метоксиацетила, глицина, аминоэтилглюкозы (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-диметила и алкоксикарбонила.

В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора связывающий фрагмент может представлять собой необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. Связывающий фрагмент может представлять собой двухвалентную, прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную, необязательно замещенную C1-C20 углеводородную цепь, в которой одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$, $-C(O)-$, $C(O)O-$, $OC(O)-$, $-N(R)C(O)-$, $-C(O)N(R)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $SO_2N(R)-$, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент.

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора связывающий фрагмент представляет собой ацильный фрагмент, $-C(O)RC(O)-$, где R представляет собой алкильную цепь, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь, содержащую амид цепь, содержащую триазол(ы) цепь, циклооктин-содержащий фрагмент, замещенную ацильную цепь или полиэтиленгликолевую (PEG) цепь.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора связывающий фрагмент представляет собой C2-C20 ацильный фрагмент.

В отдельных аспектах связывающий фрагмент представляет собой алкилдиоил, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$, где $n=0-45$, включая, но без ограничения, оксалиловый (C2) фрагмент, сукциниловый (C4) фрагмент, адипоиловый (C6) фрагмент, субероиловый (C8) фрагмент, декандиоиловый (C10) фрагмент, додекандиоиловый (C12) фрагмент, тетрадекандиоиловый (C14) фрагмент или гексадекандиоиловый (C16) фрагмент.

Настоящее изобретение предлагает частичный агонист инсулинового рецептора, содержащий

первый гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина и второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина, причем каждый гетеродимер включает в себя полипептид А-цепи и полипептид В-цепи, причем полипептид А-цепи и полипептид В-цепи связаны вместе посредством межцепочечных дисульфидных связей; причем первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина ковалентно связаны вместе посредством связывающего фрагмента, соединяющего боковые цепи аминокислот на карбоксильных концах или около карбоксильных концов двух соответствующих полипептидов В-цепи; необязательно, причем амино-конец по меньшей мере одного из полипептидов А-цепи и полипептидов В-цепи первого инсулинового полипептида или второго инсулинового полипептида ковалентно связан с заместителем; и причем частичный агонист инсулинового рецептора имеет максимальный отклик по отношению к человеческому инсулиновому рецептору (IR), который составляет приблизительно 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% или 70% от максимального отклика нативного человеческого инсулина по отношению к IR, определенного с помощью функционального анализа фосфорилирования; или

первый гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина и второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина, причем каждый гетеродимер включает в себя полипептид А-цепи и полипептид В-цепи, причем полипептид А-цепи и полипептид В-цепи связаны вместе посредством межцепочечных дисульфидных связей; причем первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина ковалентно связаны вместе посредством связывающего фрагмента, соединяющего боковые цепи аминокислот на карбоксильных концах

или около карбоксильных концов двух соответствующих полипептидов В-цепи; необязательно, причем амино-конец по меньшей мере одного из полипептидов А-цепи и полипептидов В-цепи первого инсулинового полипептида или второго инсулинового полипептида ковалентно связан с заместителем; и причем частичный агонист инсулинового рецептора имеет максимальный отклик по отношению к человеческому инсулиновому рецептору (IR), который находится в диапазоне между 20% и 70%, 40% и 70%, 50% и 70%, 40% и 60% или 20% и 40% от максимального отклика нативного человеческого инсулина по отношению к IR, определенного с помощью функционального анализа фосфорилирования; или

первый гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина и второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина, причем каждый гетеродимер включает в себя полипептид А-цепи и полипептид В-цепи, причем полипептид А-цепи и полипептид В-цепи связаны вместе посредством межцепочечных дисульфидных связей; причем первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина ковалентно связаны вместе посредством связывающего фрагмента, соединяющего боковые цепи аминокислот на карбоксильных концах или около карбоксильных концов двух соответствующих полипептидов В-цепи; необязательно, причем амино-конец по меньшей мере одного из полипептидов А-цепи и полипептидов В-цепи первого инсулинового полипептида или второго инсулинового полипептида ковалентно связан с заместителем; и причем частичный агонист инсулинового рецептора имеет максимальный отклик по отношению к человеческому инсулиновому рецептору (IR), который составляет по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% или 70% от максимального отклика нативного человеческого инсулина по отношению к IR, определенного с помощью функционального анализа фосфорилирования; или

первый гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина и второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина, причем каждый гетеродимер включает в себя полипептид А-цепи и полипептид В-цепи, причем полипептид А-цепи и полипептид В-цепи связаны вместе посредством межцепочечных дисульфидных связей; причем первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина

ковалентно связаны вместе посредством связывающего фрагмента, соединяющего боковые цепи аминокислот на карбоксильных концах или около карбоксильных концов двух соответствующих полипептидов В-цепи; необязательно, причем амино-конец по меньшей мере одного из полипептидов А-цепи и полипептидов В-цепи первого инсулинового полипептида или второго инсулинового полипептида ковалентно связан с заместителем; и причем частичный агонист инсулинового рецептора имеет максимальный отклик по отношению к человеческому инсулиновому рецептору (IR), который составляет менее чем 70% от максимального отклика нативного человеческого инсулина по отношению к IR, определенного с помощью функционального анализа фосфорилирования; или

первый гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина и второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина, причем каждый гетеродимер включает в себя полипептид А-цепи и полипептид В-цепи, причем полипептид А-цепи и полипептид В-цепи связаны вместе посредством межцепочечных дисульфидных связей; причем первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина ковалентно связаны вместе посредством связывающего фрагмента, соединяющего боковые цепи аминокислот на карбоксильных концах или около карбоксильных концов двух соответствующих полипептидов В-цепи; необязательно, причем амино-конец по меньшей мере одного из полипептидов А-цепи и полипептидов В-цепи первого инсулинового полипептида или второго инсулинового полипептида ковалентно связан с заместителем; и причем частичный агонист инсулинового рецептора имеет максимальный отклик по отношению к человеческому инсулиновому рецептору (IR), который составляет приблизительно 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% или 70% от максимального отклика нативного человеческого инсулина по отношению к IR, определенного с помощью функционального анализа фосфорилирования.

В приведенных выше вариантах осуществления функциональный анализ фосфорилирования может представлять собой анализ фосфорилирования АКТ инсулинового рецептора (IR).

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора связывающий фрагмент не включает в себя дисульфидную связь, и,

когда амино-концы полипептида А-цепи и полипептида В-цепи не включают в себя заместитель, связывающий фрагмент не представляет собой оксалиловый (C2) фрагмент, субериловый (C8) фрагмент или додекандиоиловый (C12) фрагмент.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина являются одинаковыми, или первый и второй гетеродимеры инсулинов или аналогов инсулина различаются.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора связывающий фрагмент ковалентно связывает первый гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина и второй гетеродимер инсулинов или аналогов инсулина посредством эpsilon-аминогруппы остатка лизина на карбоксильных концах или около карбоксильных концов их соответствующих полипептидов В-цепи.

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора заместитель имеет общую формулу $RC(O)-$, где R может представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, PEG, сахараиды, то есть в отдельных аспектах $RC(O)-$ может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель выбирают из группы, состоящей из ацетила, фенилацетила, карбамоила, N-алкилкарбамоила, изобутила, метоксиацетила, глицина, аминоэтилглюкозы (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, N-диметила и алкоксикарбонила.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора первый и второй инсулины или аналоги инсулина независимо представляют собой нативный человеческий инсулин, инсулин лизпро, инсулин аспарт, desB30 инсулин или инсулин гларгин.

В отдельных аспектах частичного агониста инсулинового рецептора каждый полипептид А-цепи независимо содержит аминокислотную последовательность $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$ (SEQ ID NO: 3), и каждый полипептид В-цепи независимо содержит аминокислотную последовательность $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}$ (SEQ ID NO: 4) или

X₂₂VNQX₂₅X₂₆CGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅ (SEQ ID NO: 5), причем X₂ представляет собой изолейцин или треонин; X₃ представляет собой валин, глицин или лейцин; X₈ представляет собой треонин или гистидин; X₁₇ представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин; X₁₉ представляет собой тирозин, 4-метоксифенилаланин, аланин или 4-аминофенилаланин; X₂₃ представляет собой аспарагин или глицин; X₂₂ представляет собой фенилаланин или дезаминофенилаланин; X₂₅ представляет собой гистидин или треонин; X₂₆ представляет собой лейцин или глицин; X₂₇ представляет собой фенилаланин или аспарагиновую кислоту; X₂₉ представляет собой аланин, глицин или серин; X₃₀ представляет собой гистидин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоцистеиновую кислоту или цистеиновую кислоту; X₃₁ представляет собой аспарагиновую кислоту, пролин или лизин; X₃₂ представляет собой лизин или пролин; X₃₃ представляет собой треонин, аланин или отсутствует; X₃₄ представляет собой аргинин или отсутствует; и X₃₅ представляет собой аргинин или отсутствует; при условии, что по меньшей мере один из X₃₁ или X₃₂ представляет собой лизин.

В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора связывающий фрагмент может представлять собой необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. Связывающий фрагмент may be двухвалентный, прямой или разветвленный, насыщенный или ненасыщенный, необязательно замещенный C1-20 углеводородная цепь причем одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент.

В еще одном аспекте частичного агониста инсулинового рецептора связывающий фрагмент представляет собой ацильный

фрагмент, $-C(O)RC(O)-$, где R представляет собой алкильную цепь, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь, содержащую амид цепь, содержащую триазол(ы) цепь, циклооктин-содержащий фрагмент, замещенную ацильную цепь или полиэтиленгликолевую (PEG) цепь.

В другом аспекте частичного агониста инсулинового рецептора связывающий фрагмент представляет собой C2-C20 ацильный фрагмент.

В отдельных аспектах связывающий фрагмент представляет собой алкилдиоил, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$, где $n=0-45$, включая, но без ограничения, оксалиловый (C2) фрагмент, сукциниловый (C4) фрагмент, адипоиловый (C6) фрагмент, субероиловый (C8) фрагмент, декандиоиловый (C10) фрагмент, додекандиоиловый (C12) фрагмент, тетрадекандиоиловый (C14) фрагмент или гексадекандиоиловый (C16) фрагмент.

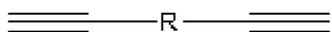
Настоящее изобретение дополнительно предлагает инсулиновый димер, содержащий первый B29 или B28 Lys молекулы первого инсулинового гетеродимера, содержащего первый полипептид А-цепи и первый полипептид В-цепи, и второй B29 или B28 Lys второго инсулинового гетеродимера, содержащего второй полипептид А-цепи и второй полипептид В-цепи, конъюгированные вместе посредством бифункционального линкера, выбранного из группы, состоящей из линкера 1, линкера 2, линкера 3, линкера 10, линкера 11, линкера 12, линкера 13, линкера 14, линкера 15, линкера 16, линкера 17, линкера 18, линкера 19, линкера 20, линкера 21, линкера 22, линкера 23, линкера 24, линкера 25, линкера 26, линкера 27, линкера 28, линкера 29, линкера 30, линкера 31, линкера 32, линкера 33, линкера 34, линкера 35, линкера 36, линкера 37, линкера 38, линкера 39, линкера 40, линкера 41, линкера 42, линкера 43, линкера 44, линкера 45, линкера 46, линкера 47, линкера 48, линкера 49 и линкера 50, при условии, что когда бифункциональный линкер представляет собой линкер 10, линкер 11, линкер 12, линкер 13 или линкер 14, по меньшей мере один из первого или второго полипептидов А-цепи или В-цепи конъюгирован своей N-концевой аминокислотой с заместителем, или по меньшей мере N-концевые аминокислоты молекулы первого инсулинового гетеродимера конъюгированы с заместителем, или N-концевые

аминокислоты как первого инсулинового гетеродимера, так и второго инсулинового гетеродимера конъюгированы с заместителем.

В отдельных вариантах осуществления заместитель содержит *N*-гидроксисукцинимидный сложный эфир, связанный с группой, имеющей общую формулу $RC(O)-$, где *R* может представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и *R'* может представлять собой *H*, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, полиэтиленгликоль (PEG), сахараиды. В отдельных вариантах осуществления заместитель представляет собой карбамоильную группу, ацетильную группу, глицин, метильную группу, метоксигруппу, диметильную группу, изобутильную группу, PEG1-группу, AEG-группу, AEG-C6 алкильную группу или PEG2-группу.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает инсулиновый димер, содержащий первый B29 или B28 Lys молекулы первого инсулинового гетеродимера, содержащего первый полипептид А-цепи и первый полипептид В-цепи, конъюгированный с первым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 5 и линкера 7, и второй B29 или B28 Lys второго инсулинового гетеродимера, содержащего второй полипептид А-цепи и второй полипептид В-цепи, конъюгированный со вторым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 4, линкера 6, линкера 8 и линкера 9, конъюгированные вместе посредством первого линкера и второго линкера.

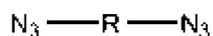
В другом варианте осуществления настоящее изобретение предлагает димер аналогов инсулина, содержащий первый B29 или B28 Lys молекулы первого инсулинового гетеродимера, содержащего первый полипептид А-цепи и первый полипептид В-цепи, конъюгированный с первым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 5 и линкера 7, и второй B29 или B28 Lys второго инсулинового гетеродимера, содержащего второй полипептид А-цепи и второй полипептид В-цепи, конъюгированный со вторым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 5 и линкера 7, причем первый и второй линкеры конъюгированы вместе посредством мостикового линкера, имеющего структуру



где R представляет собой ковалентную связь, атом углерода, фенил, гетероатом или необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. В отдельных аспектах R представляет собой C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 или C10 ацильную группу или PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13 или PEG25.

В отдельных вариантах осуществления заместитель содержит N-гидроксисукцинимидный сложный эфир, связанный с группой, имеющей общую формулу RC(O)-, где R может представлять собой R'CH₂, R'NH, R'O, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, полиэтиленгликоль (PEG), сахараиды. В отдельных вариантах осуществления заместитель представляет собой карбамоильную группу, ацетильную группу, глицин, метильную группу, метоксигруппу, диметильную группу, изобутильную группу, PEG1-группу, AEG-группу, AEG-C6 алкильную группу или PEG2-группу.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предлагает димер аналогов инсулина, содержащий первый B29 или B28 Lys молекулы первого инсулинового гетеродимера, содержащего первый полипептид А-цепи и первый полипептид В-цепи, конъюгированный с первым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 4, линкера 6, линкера 8 и линкера 9, и второй B29 или B28 Lys второго инсулинового гетеродимера, содержащего второй полипептид А-цепи и второй полипептид В-цепи, конъюгированный со вторым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 4, линкера 6, линкера 8 и линкера 9, причем первый и второй линкеры конъюгированы вместе посредством мостикового линкера, имеющего структуру



где R представляет собой ковалентную связь, атом углерода, фенил, гетероатом или необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и

гетероциклической. В отдельных аспектах R представляет собой C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 или C10 ацильную группу или PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13 или PEG25.

В отдельных вариантах осуществления заместитель содержит N-гидроксисукцинимидный сложный эфир, связанный с группой, имеющей общую формулу $RC(O)-$, где R может представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, полиэтиленгликоль (PEG), сахараиды. В отдельных вариантах осуществления заместитель представляет собой карбамоильную группу, ацетильную группу, глицин, метильную группу, метоксигруппу, диметильную группу, изобутильную группу, PEG1-группу, AEG-группу, AEG-C6 алкильную группу или PEG2-группу.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает композиции, содержащие любой из частичных агонистов инсулинового рецептора, раскрытых в настоящем документе, и фармацевтически приемлемую соль.

Настоящее изобретение предлагает способ лечения диабета, содержащий введение индивидууму с диабетом терапевтически эффективного количества композиции, содержащей любой из вышеупомянутых частичных агонистов инсулинового рецептора. В отдельных аспектах диабет представляет собой диабет типа 1, диабет типа 2 или гестационный диабет.

Настоящее изобретение предлагает применение композиции для лечения диабета, содержащей любой из вышеупомянутых частичных агонистов инсулинового рецептора. В отдельных аспектах диабет представляет собой диабет типа 1, диабет типа 2 или гестационный диабет.

Настоящее изобретение предлагает применение любого из частичных агонистов инсулинового рецептора, раскрытых в настоящем документе, для производства лекарственного средства для лечения диабета. В отдельных аспектах диабет представляет собой диабет типа 1, диабет типа 2 или гестационный диабет.

Определения

Инсулин – как используется в настоящем документе, данный термин обозначает активное начало поджелудочной железы, которое влияет на метаболизм углеводов в организме животного, и которое значимо при лечении сахарного диабета. Данный термин включает в себя синтетические и полученные биотехнологическим путем продукты, которые являются одинаковыми или схожими с природными инсулинами по структуре, применению и предполагаемому эффекту и значимы при лечении сахарного диабета. Данный термин представляет собой общий термин, который обозначает гетеродимер размером 51 аминокислоту, содержащий пептид А-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1, и пептид В-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, причем остатки цистеина в положениях 6 и 11 А-цепи связаны дисульфидной связью, остатки цистеина в положении 7 А-цепи и положении 7 В-цепи связаны дисульфидной связью, и остатки цистеина в положении 20 А-цепи и 19 В-цепи связаны дисульфидной связью.

Аналог инсулина – данный термин, как используется в настоящем документе, включает в себя любой гетеродимерный аналог или одноцепочечный аналог, который содержит одну или несколько модификаций нативного пептида А-цепи и/или пептида В-цепи. Модификации включают в себя, но без ограничения, замену какой-либо аминокислотой нативной аминокислоты в положении, выбранном из А4, А5, А8, А9, А10, А12, А13, А14, А15, А16, А17, А18, А19, А21, В1, В2, В3, В4, В5, В9, В10, В13, В14, В15, В16, В17, В18, В20, В21, В22, В23, В26, В27, В28, В29 и В30; удаление любого или всех из положений В1-4 и В26-30; или конъюгацию, непосредственно или посредством полимерного или неполимерного линкера, одного или нескольких ацильных, полиэтилглициновых (PEG) или сахаридных фрагментов; или любую их комбинацию. Как проиллюстрировано N-связанными гликозилированными аналогами инсулина, раскрытыми в настоящем документе, данный термин также включает в себя любой инсулиновый гетеродимер и одноцепочечный аналог, который был модифицирован таким образом, что он имеет по меньшей мере один N-связанный сайт гликозилирования и, в частности, варианты осуществления, в которых N-связанный сайт

гликозилирования связан с N-гликаном или занят им. Примеры аналогов инсулина включают, но без ограничения, гетеродимерные и одноцепочечные аналоги, раскрытые в опубликованных международных заявках WO20100080606, WO2009/099763 и WO2010080609, раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Примеры одноцепочечных аналогов инсулина также включают, но без ограничения, раскрытые в опубликованных международных заявках WO9634882, WO95516708, WO2005054291, WO2006097521, WO2007104734, WO2007104736, WO2007104737, WO2007104738, WO2007096332, WO2009132129; патентах США №№ 5304473 и 6630348; и документе Kristensen et al., Biochem. J. 305: 981-986 (1995), раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Данный термин также включает в себя одноцепочечные и гетеродимерные полипептидные молекулы, которые имеют слабую или не имеют детектируемую активность в отношении инсулинового рецептора, но которые были модифицированы таким образом, что они включают в себя одну или несколько аминокислотных модификаций или замен для того, чтобы они имели активность в отношении инсулинового рецептора, которые имеют активностью по меньшей мере 1%, 10%, 50%, 75% или 90% в отношении инсулинового рецептора по сравнению с нативным инсулином, и которые также включают в себя по меньшей мере один N-связанный сайт гликозилирования. В отдельных аспектах аналог инсулина является частичным агонистом, который имеет активность в отношении инсулинового рецептора менее чем 80% (или 70%) от нативного инсулина. Эти аналоги инсулина, которые обладают пониженной активностью в отношении инсулинового рецептора гормона роста и повышенную активность в отношении инсулинового рецептора, включают в себя как гетеродимеры, так и одноцепочечные аналоги.

Одноцепочечный инсулин или одноцепочечный аналог инсулина – как используется в настоящем документе, данный термин охватывает группу структурно-родственных белков, в которых пептид А-цепи или функциональный аналог и пептид В-цепи или функциональный аналог ковалентно связаны посредством пептида или полипептида размером 2-35 аминокислот или непептидного полимерного или неполимерного линкера, и которые имеют по меньшей мере 1%, 10%,

50%, 75% или 90% от активности инсулина в отношении инсулинового рецептора по сравнению с нативным инсулином. Одноцепочечный инсулин или аналог инсулина также включает в себя три дисульфидные связи: первая дисульфидная связь расположена между остатками цистеина в положениях 6 и 11 А-цепи или ее функционального аналога, вторая дисульфидная связь расположена между остатками цистеина в положении 7 А-цепи или ее функционального аналога и в положение 7 В-цепи или ее функционального аналога, и третья дисульфидная связь расположена между остатками цистеина в положении 20 А-цепи или ее функционального аналога и в положении 19 В-цепи или ее функционального аналога.

Соединяющий пептид или С-пептид - как используется в настоящем документе, данный термин относится к соединительному фрагменту "С" полипептидной последовательности В-С-А одноцепочечной препроинсулиноподобной молекулы. В частности, в природной цепи инсулина С-пептид соединяет аминокислоту в положении 30 В-цепи и аминокислоту в положении 1 А-цепи. Данный термин может относиться к нативному инсулиновому С-пептиду, С-пептиду обезьяны и любому другому пептиду от 3 до 35 аминокислот, который соединяет В-цепь с А-цепью, и, таким образом, подразумевается, что он охватывает любой пептид, связывающий пептид В-цепи с пептидом А-цепи в одноцепочечном аналоге инсулина (смотри, например, опубликованные заявки США №№ 20090170750 и 20080057004 и WO9634882) и в молекулах-предшественниках инсулина, таких как раскрытые в WO9516708 и патенте США № 7105314.

Аминокислотная модификация - как используется в настоящем документе, данный термин относится к замене аминокислоты или дериватизации аминокислоты посредством присоединения к аминокислоте и/или удаления из аминокислоты химических групп, и включает в себя замену на любую из 20 аминокислот, обычно встречающихся в человеческих белках, а также атипичных или неприродных аминокислот. Коммерческие источники атипичных аминокислот включают Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI), ChemPep Inc. (Miami, FL) и Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA). Атипичные

аминокислоты могут быть приобретены у коммерческих поставщиков, синтезированы *de novo* или химически модифицированы или дериватизированы из природных аминокислот.

Аминокислотная замена – как используется в настоящем документе, относится к замещению одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком.

Консервативная аминокислотная замена – как используется в настоящем документе, данный термин определен в настоящем документе как обмен в пределах одной из следующих пяти групп:

I. Малые алифатические неполярные или слабо полярные остатки:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Полярные отрицательно заряженные остатки и их амиды:

Asp, Asn, Glu, Gln, цистеиновая кислота и гомоцистеиновая кислота;

III. Полярные положительно заряженные остатки:

His, Arg, Lys; орнитин (Orn)

IV. Большие алифатические неполярные остатки:

Met, Leu, Ile, Val, Cys, норлейцин (Nle), гомоцистеин

V. Большие ароматические остатки:

Phe, Tyr, Trp, ацетилфенилаланин

Лечение – как используется в настоящем документе, термин "лечить" (или "подвергать лечению", "подвергаемый лечению", "лечение" и так далее) относится к введению IRPA настоящего раскрытия субъекту, нуждающемуся в этом, с целью облегчения, ослабления, изменения, улучшения, изменения к лучшему или воздействия на состояние (например, диабет), симптом или симптомы состояния (например, гипергликемию) или предрасположенность к состоянию. Например, как используется в настоящем документе, термин "лечение диабета" будет в общем относиться к поддержанию уровней глюкозы в крови вблизи нормальных уровней и может включать в себя повышение или понижение уровней глюкозы в крови в зависимости от конкретной ситуации.

Фармацевтически приемлемый носитель – как используется в настоящем документе, данный термин включает в себя любой из

стандартных фармацевтических носителей, таких как фосфатный буферный солевой раствор, вода, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло, и различные типы смачивающих средств, подходящих для введения нуждающемуся индивидууму или нуждающимся индивидуумом. Данный термин также охватывает любое из средств, одобренных регулирующим органом Федерального правительства США или перечисленных в Фармакопее США для использования на животных, включая людей.

Фармацевтически приемлемая соль - как используется в настоящем документе, данный термин относится к солям соединений, которые сохраняют биологическую активность родительского соединения, и которые не являются биологически или иным образом нежелательными. Многие из соединений, раскрытых в настоящем документе, способны к образованию кислых и/или основных солей благодаря наличию аминогрупп и/или карбоксильных групп или аналогичных им групп.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания могут быть получены из неорганических и органических оснований. Соли, полученные из неорганических оснований, включают, только в качестве примера, соли натрия, калия, лития, аммония, кальция, цинка и магния. Соли, полученные из органических оснований, включают, но без ограничения, соли первичных, вторичных и третичных аминов.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты могут быть получены из неорганических и органических кислот. Соли, полученные из неорганических кислот, включают соли соляной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, азотной кислоты, фосфорной кислоты и тому подобные. Соли, полученные из органических кислот, включают соли уксусной кислоты, пропионовой кислоты, гликолевой кислоты, пировиноградной кислоты, щавелевой кислоты, яблочной кислоты, малоновой кислоты, янтарной кислоты, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, лимонной кислоты, бензойной кислоты, коричной кислоты, миндальной кислоты, метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, п-толуолсульфоновой кислоты, салициловой кислоты и тому подобные.

Эффективное или терапевтически эффективное количество - как

используется в настоящем документе, относится к нетоксичному, но достаточному количеству аналога инсулина для обеспечения желаемого эффекта. Например, одним из желаемых эффектов будет предупреждение или лечение гипергликемии. Количество, которое является "эффективным", будет изменяться от субъекта к субъекту в зависимости от возраста и общего состояния индивидуума, способа введения и тому подобного. Таким образом, не всегда можно указать точное "эффективное количество". Не всегда можно определить оптимальное эффективное количество перед введением индивидууму или индивидуумом, нуждающимся в этом. Однако подходящее "эффективное" количество в любом отдельном случае может быть определено средним специалистом в данной области техники с помощью обычных экспериментов.

Парентеральный - как используется в настоящем документе, данный термин означает не через пищеварительный канал, а каким-то другим путем, таким как интраназальный, ингаляционный, подкожный, внутримышечный, внутриспинальный или внутривенный.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 показывает эффект снижения уровня глюкозы димеров 24, 18, и 40 по сравнению с RNI при введении минипигам с диабетом при 0,69 нмоль/кг.

Фигура 2А показывает результаты теста на переносимость инсулина (ITT) у мышей при сравнении соединения А с RNI (хумулин). Соединение А вводили в дозе, составляющей 72 ед/кг, и в дозе, составляющей 300 ед/кг, а хумулин вводили в дозе, составляющей 18 ед/кг, и в дозе, составляющей 72 ед/кг.

Фигура 2В показывает результаты теста на переносимость инсулина (ITT) у мышей при сравнении соединения В с RNI (хумулин). Соединение В вводили в дозе, составляющей 72 ед/кг, и в дозе, составляющей 300 ед/кг, а хумулин вводили в дозе, составляющей 18 ед/кг, и в дозе, составляющей 72 ед/кг.

Фигура 2С показывает результаты теста на переносимость инсулина (ITT) у мышей при сравнении димера 24 с RNI (хумулин). Димер 24 вводили в дозе, составляющей 72 ед/кг, и в дозе, составляющей 300 ед/кг, а хумулин вводили в дозе, составляющей 18 ед/кг, и в дозе, составляющей 72 ед/кг.

Фигура 2D показывает результаты димера 55 в тесте на переносимость инсулина (ИТТ) у мышей. Димер 55 вводили в дозе, составляющей 120 нмоль/кг и в дозе, составляющей 300 нмоль/кг.

Фигура 2E показывает результаты димера 58 в тесте на переносимость инсулина (ИТТ) у мышей. Димер 58 вводили в дозе, составляющей 60 нмоль/кг и в дозе, составляющей 300 нмоль/кг.

Фигура 2F показывает результаты димера 60 в тесте на переносимость инсулина (ИТТ) у мышей. Димер 60 вводили в дозе, составляющей 72 нмоль/кг, и в дозе, составляющей 300 нмоль/кг.

Фигура 2G показывает результаты димера 67 в тесте на переносимость инсулина (ИТТ) у мышей. Димер 67 вводили в дозе, составляющей 120 нмоль/кг, и в дозе, составляющей 300 нмоль/кг.

Фигура 3 показывает, что инсулиновый димер соединение А деградировал до мономеров инсулина при 2-часовой инкубации с мембранами клеток почек крысы (RKCM) без глутатиона (GSH). % от значений родительского соединения являются только полуколичественными из-за потенциальных различий в эффективности ионизации.

Фигура 4 показывает, что инсулиновый димер соединение А деградировал до мономеров инсулина при 2-часовой инкубации с мембранами клеток почек крысы (RKCM) с глутатионом (GSH). % от значений родительского соединения являются только полуколичественными из-за потенциальных различий в эффективности ионизации.

Фигура 5 показывает, что димер 24 утратил некоторое количество полипептида А-цепи, но не деградировал до мономеров при 2-часовой инкубации с мембранами клеток почек крысы (RKCM) без глутатиона (GSH). % от значений родительского соединения являются только полуколичественными из-за потенциальных различий в эффективности ионизации.

Фигура 6 показывает, что димер 24 утратил некоторое количество полипептида А-цепи, но не деградировал до мономеров при 2-часовой инкубации с мембранами клеток почек крысы (RKCM) с глутатионом (GSH). % от значений родительского соединения являются только полуколичественными из-за потенциальных различий в эффективности ионизации.

Фигура 7А показывает эффект снижения уровня глюкозы димеров 4, 5, 7, 8 и 9 по сравнению с RNI при введении минипигам с диабетом при 0,69 нмоль/кг.

Фигура 7В показывает эффект снижения уровня глюкозы димеров 18, 19, 20, 21 и 22 по сравнению с RNI при введении минипигам с диабетом при 0,69 нмоль/кг.

Фигура 7С показывает эффект снижения уровня глюкозы димеров 23, 24, 26, 27 и 28 по сравнению с RNI при введении минипигам с диабетом при 0,69 нмоль/кг.

Фигура 7D показывает эффект снижения уровня глюкозы димеров 29, 32, 37, 38 и 39 по сравнению с RNI при введении минипигам с диабетом при 0,69 нмоль/кг.

Фигура 7Е показывает эффект снижения уровня глюкозы димеров 40, 41, 43, 44 и 48 по сравнению с RNI при введении минипигам с диабетом при 0,69 нмоль/кг.

Фигура 7F показывает эффект снижения уровня глюкозы димеров 55, 57, 58, 60 и 61 по сравнению с RNI при введении минипигам с диабетом при 0,69 нмоль/кг.

Фигура 7G показывает эффект снижения уровня глюкозы димеров 62, 64, 67, 69 и 71 по сравнению с RNI при введении минипигам с диабетом при 0,69 нмоль/кг.

Фигура 7H показывает эффект снижения уровня глюкозы димеров 72, 77 и 78 по сравнению с RNI при введении минипигам с диабетом при 0,69 нмоль/кг.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предлагает соединения, содержащие две инсулиновые молекулы, ковалентно связанные с образованием ковалентно-связанного инсулинового димера, который может активировать инсулиновый рецептор с регулярной инсулиноподобной активностью и сниженной максимальной активностью. Эти соединения являются частичными агонистами инсулинового рецептора (IRPA): они ведут себя как другие аналоги инсулина, эффективно снижая глюкозу, но с более низким риском гипогликемии.

Инсулиновые димеры были раскрыты в документах Brandenburg et al. в патенте США № 3907763 (1973); Tatnell et al., Biochem

J. 216: 687-694 (1983); Shüttler and Brandenburg, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem, 363, 317-330, 1982; Weiland et al., Proc Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 1154-1158 (1990); Deppe et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (1994) 350: 213-217; Brandenburg and Havenith в патенте США № 6908897(B2) (2005); Knudsen et al., PLOS ONE 7: e51972 (2012); DiMarchi et al в WO2011/159895; DiMarchi et al. в WO 2014/052451; и Herrera et al., WO2014141165. Совсем недавно инсулиновые димеры были описаны в документах Brant, *Synthesis and Characterization of Insulin Receptor Partial Agonists as a Route to Improved Diabetes Therapy*, Ph.D. Dissertation, Indiana University (апрель 2015 года) и Zaykov and DiMarchi, Poster P212, *Exploration of the structural and mechanistic basis for partial agonism of insulin dimers*, American Peptide Symposium, Orlando FL (20-25 июня (2015)). Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что уровень инсулиновой активности и частичной агонистической активности димеров является функцией димерной структуры, последовательности аналога инсулина, длины димеризующего линкера и участка димеризации, который соединяет два инсулиновых полипептида. Авторы обнаружили, что инсулиновые димеры настоящего изобретения имеют пониженный риск развития гипогликемии при введении в высоких дозах, чем нативный инсулин или другие аналоги инсулина при введении в высоких дозах.

Настоящее изобретение предлагает ковалентно-связанные инсулиновые димеры-частичные агонисты, составленные в виде новых и способных к превращению базальных инсулинов (введение один раз в день), которые демонстрируют улучшенный терапевтический индекс (TI) по сравнению с базальными инсулинами современного стандарта оказания медицинской помощи (SOC). Эти молекулы могут эффективно снижать уровень глюкозы со сниженным риском гипогликемии у минипига с диабетом и обладают свойствами базального инсулина, который вводят один раз в день (QD). Улучшенный TI может давать специалистам-практикам возможность более агрессивного дозирования димера IRPA для достижения целевых показателей контроля уровня глюкозы натощак. Строгий контроль уровня глюкозы

натощак и HbA1c может позволять этим молекулам служить в качестве 1) применяемого отдельно инсулина длительного действия с улучшенным профилем эффективности и безопасности при сахарном диабете типа 2 (T2DM) и 2) улучшенного основного базального инсулина при сахарном диабете типа 1 (T1DM) (и иногда T2DM) для применения с дополнительными дозами прандиальных быстродействующих аналогов инсулина (RAA).

Идеальный инсулин длительного действия обеспечивает непрерывный контроль уровня глюкозы натощак у больных диабетом с высокой стабильностью и воспроизводимостью ФК/ФД. Однако доступные в настоящее время базальные инсулины, даже с улучшенной стабильностью и воспроизводимостью ФК/ФД, по-прежнему имеют узкий терапевтический индекс, и случаи гипогликемии увеличиваются по мере приближения уровней глюкозы к целевой эугликемии. Это часто может приводить к недостаточной дозировке для предотвращения гипогликемии. Ожидается, что лечение с помощью IRPA настоящего изобретения изменит эту зависимость: гипогликемия посредством уменьшения скорости изменения снижения уровня глюкозы при повышении дозировки.

А и В-цепи инсулина

В настоящем документе раскрыты димеры инсулинов или аналогов инсулина, которые обладают активностью агонистов инсулинового рецептора. Уровень инсулиновой активности димеров является функцией димерной структуры, последовательности аналога инсулина, длины димеризующего линкера и участка димеризации, который соединяет два инсулиновых полипептида. Инсулиновые полипептиды настоящего изобретения могут содержать последовательности нативных В и А-цепей человеческого инсулина (SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно) или любых из их известных аналогов или производных, которые проявляют инсулиновую агонистическую активность при связывании друг с другом в гетеродуплекс. Такие аналоги включают, например, белки, которые имеют А-цепь и В-цепь, которые отличаются от А-цепи и В-цепи человеческого инсулина тем, что имеют одну или несколько аминокислотных делеций, одну или несколько аминокислотных замен и/или одну или несколько аминокислотных вставок, которые не

уничтожают инсулиновую активность аналога инсулина.

Один тип аналога инсулина, "мономерный аналог инсулина", хорошо известен в данной области техники. Это быстродействующие аналоги человеческого инсулина, включая, например, аналоги инсулина, в которых:

(a) аминокислотный остаток в положении В28 замещен на Asp, Lys, Leu, Val или Ala, и аминокислотный остаток в положении В29 представляет собой Lys или Pro;

(b) аминокислотные остатки в любом из положений В27 и В30 удалены или замещены на ненативную аминокислоту.

В одном варианте осуществления предлагается аналог инсулина, содержащий Asp, замещенный в положении В28 (например, инсулин аспарт (NOVOLOG); смотри SEQ ID NO: 9) или Lys, замещенный в положении В28, и пролин, замещенный в положении В29, (например, инсулин лизпро (HUMALOG); смотри SEQ ID NO: 6). Дополнительные мономерные аналоги инсулина раскрыты в документах Chance, et al., патент США № 5514646; Chance, et al., патентная заявка США серийный № 08/255297; Brems, et al., Protein Engineering, 5: 527-533 (1992); Brange, et al., публикация ЕРО № 214826 (опубликована 18 марта 1987 года); и Brange, et al., Current Opinion in Structural Biology, 1: 934-940 (1991). Эти раскрытия явным образом включены в настоящий документ посредством ссылки для описания мономерных аналогов инсулина.

Аналоги инсулина могут также содержать замены амидированных аминокислот на кислотные формы. Например, Asn может быть заменен на Asp или Glu. Аналогично, Gln может быть заменен на Asp или Glu. В частности, Asn(A18), Asn(A21) или Asp(B3) или любая комбинация этих остатков могут быть заменены на Asp или Glu. Кроме того, Gln(A15), или Gln(B4), или они оба, могут быть заменены или на Asp, или на Glu.

Как раскрыто в настоящем документе, предлагаются одноцепочечные аналоги инсулина, содержащие В-цепь и А-цепь человеческого инсулина, или их аналоги или производное, причем карбоксильный конец В-цепи связан с амино-концом А-цепи посредством связывающего фрагмента. В одном варианте осуществления А-цепь представляет собой аминокислотную

последовательность GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO: 1), а В-цепь содержит аминокислотную последовательность FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2) или ее укороченную с карбоксильного конца последовательность, в которой удален В30, и аналоги этих последовательностей, причем каждая последовательность модифицирована таким образом, что она содержит от одной до пяти аминокислотных замен в положениях, соответствующих положениям нативного инсулина, выбранным из А5, А8, А9, А10, А14, А15, А17, А18, А21, В1, В2, В3, В4, В5, В9, В10, В13, В14, В20, В22, В23, В26, В27, В28, В29 и В30, при условии, что по меньшей мере один из В28 или В29 представляет собой лизин. В одном варианте осуществления аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. Подходящие аминокислотные замены в этих положениях, которые не оказывают неблагоприятного воздействия на желаемую активность инсулина, известны специалистам в данной области техники, как продемонстрировано, например, в документе Mayer, et al., *Insulin Structure and Function, Biopolymers*. 2007; 88(5): 687-713, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В соответствии с одним вариантом осуществления пептиды аналога инсулина могут содержать А-цепь инсулина и В-цепь инсулина или их аналоги, причем А-цепь содержит аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 70% (например, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%) по длине нативного пептида с GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO: 1), а В-цепь содержит аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 60% (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%) по длине нативного пептида с FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2) или ее укороченной с карбоксильного конца последовательностью, в которой удален В30.

К амино-концу В-цепи или к карбоксильному концу А-цепи инсулиновых полипептидов настоящего изобретения могут быть добавлены дополнительные аминокислотные последовательности.

Например, ряд отрицательно заряженных аминокислот могут быть добавлены к амино-концу В-цепи, включая, например, пептид длиной от 1 до 12, от 1 до 10, от 1 до 8 или от 1 до 6 аминокислот, содержащий одну или несколько отрицательно заряженных аминокислот, включая, например, глутаминовую кислоту и аспарагиновую кислоту. В одном варианте осуществления аминоконцевое удлинение В-цепи содержит от 1 до 6 заряженных аминокислот. В соответствии с одним вариантом осуществления раскрытые инсулиновые полипептиды содержат на А-цепи С-концевой амид или сложный эфир вместо С-концевого карбоксилата.

В различных вариантах осуществления аналог инсулина имеет изоэлектрическую точку, которая смещена относительно человеческого инсулина. В некоторых вариантах осуществления смещение изоэлектрической точки достигается посредством присоединения одного или нескольких остатков аргинина, лизина или гистидина к N-концу пептида инсулиновой А-цепи и/или С-концу пептида инсулиновой В-цепи. Примеры таких инсулиновых полипептидов включают Arg^{A0}-человеческий инсулин, Arg^{B31}Arg^{B32}-человеческий инсулин, Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-человеческий инсулин, Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}-человеческий инсулин и Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-человеческий инсулин. В качестве дополнительного примера, инсулин гларгин (LANTUS; смотри SEQ ID NO: 7 и 8) представляет собой типичный аналог инсулина длительного действия, в котором Asn^{A21} был замещен на глицин, а два остатка аргинина были ковалентно связаны с С-концом В-пептида. Эффект этих аминокислотных изменений заключается в смещении изоэлектрической точки молекулы, благодаря чему получают молекулу, которая растворима при кислых рН (например, рН 4-6,5), но нерастворима при физиологических рН. Когда раствор инсулина гларгина инъектируют в мышцу, рН раствора нейтрализуется, и инсулин гларгин образует микропреципитаты, которые медленно высвобождают инсулин гларгин в течение 24-часового периода после инъекции без выраженного инсулинового пика и, следовательно, с пониженным риском индуцирования гипогликемии. Этот профиль делает возможным обеспечения пациента базальным инсулином с помощью дозирования один раз в день. Таким образом, в некоторых вариантах

осуществления аналог инсулина содержит пептид А-цепи, в котором аминокислота в положении A21 представляет собой глицин, и пептид В-цепи, в котором аминокислоты в положении В31 и В32 представляют собой аргинин. Настоящее раскрытие охватывает все одиночные и множественные комбинации этих мутаций и любых других мутаций, которые описаны в настоящем документе (например, Gly^{A21}-человеческий инсулин, Gly^{A21}Arg^{B31}-человеческий инсулин, Arg^{B31}Arg^{B32}-человеческий инсулин, Arg^{B31}-человеческий инсулин).

В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора одна или несколько амидированных аминокислот аналога инсулина заменена на кислую аминокислоту или другую аминокислоту. Например, аспарагин может быть заменен на аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или другой остаток. Аналогично, глутамин может быть заменен на аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или другой остаток. В частности, Asn^{A18}, Asn^{A21} или Asn^{B3} или любая комбинация этих остатков могут быть заменены на аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или другой остаток. Gln^{A15}, или Gln^{B4}, или они оба, могут быть заменены на аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или другой остаток. В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора аналоги инсулина содержат аспарагиновую кислоту или другой остаток в положении A21, или аспарагиновую кислоту или другой остаток в положении В3, или и то, и другое.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что можно заменить и другие аминокислоты в аналоге инсулина на другие аминокислоты при сохранении биологической активности молекулы. Например, без ограничения, следующие модификации также широко приняты в данной области техники: замена остатка гистидина в положении В10 на аспарагиновую кислоту (His^{B10} на Asp^{B10}); замена остатка фенилаланина в положении В1 на аспарагиновую кислоту (Phe^{B1} на Asp^{B1}); замена остатка треонина в положении В30 на аланин (Thr^{B30} на Ala^{B30}); замена остатка тирозина в положении В26 на аланин (Tyr^{B26} на Ala^{B26}); и замена остатка серина в положении В9 на аспарагиновую кислоту (Ser^{B9} на Asp^{B9}).

В различных вариантах осуществления аналог инсулина имеет

длительный профиль действия. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления аналог инсулина может быть ацилирован жирной кислотой. То есть образуется амидная связь между аминогруппой на аналоге инсулина и группой карбоновой кислоты жирной кислоты. Аминогруппа может представлять собой альфа-аминогруппу N-концевой аминокислоты аналога инсулина, или может представлять собой эпсилон-аминогруппу остатка лизина аналога инсулина. Аналог инсулина может быть ацилирован в одной или нескольких из трех аминогрупп, которые есть в человеческий инсулине дикого типа, может быть ацилирован по остатку лизина, который был введен в последовательность человеческого инсулина дикого типа. В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора аналог инсулина может быть ацилирован в положении A1, B1, или как в A1, так и в B1. В некоторых вариантах осуществления жирную кислоту выбирают из миристиновой кислоты (C₁₄), пентадециловой кислоты (C₁₅), пальмитиновой кислоты (C₁₆), гептадециловой кислоты (C₁₇) и стеариновой кислоты (C₁₈).

Примеры аналогов инсулина можно найти, например, в опубликованных международных заявках WO9634882, WO95516708; WO20100080606, WO2009/099763 и WO2010080609, патенте США № 6630348 и документе Kristensen *et al.*, *Biochem. J.* 305: 981-986 (1995), раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки. В других вариантах осуществления гликозилированные *in vitro* или N-гликозилированные *in vivo* аналоги инсулина могут быть ацилированы и/или пегилированы.

В соответствии с одним вариантом осуществления предлагается аналог инсулина, в котором A-цепь инсулинового пептида содержит последовательность GIVEQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃ (SEQ ID NO: 3), а B-цепь содержит последовательность X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFFYTX₃₁X₃₂ (SEQ ID NO: 4), причем

X₈ представляет собой треонин или гистидин;

X₁₇ представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин;

X₁₉ представляет собой тирозин, 4-метоксифенилаланин или 4-аминофенилаланин;

X₂₃ представляет собой аспарагин или глицин;

X₂₅ представляет собой гистидин или треонин;

X₂₉ представляет собой аланин, глицин или серин;

X₃₀ представляет собой гистидин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоцистеиновую кислоту или цистеиновую кислоту;

X₃₁ представляет собой пролин или лизин; и

X₃₂ представляет собой пролин или лизин, при условии, что по меньшей мере один из X₃₁ или X₃₂ представляет собой лизин.

В другом варианте осуществления В-цепь содержит последовательность X₂₂VNQX₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFFYT-X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅ (SEQ ID NO: 5), причем

X₂₂ представляет собой фенилаланин или дезаминофенилаланин;

X₂₅ представляет собой гистидин или треонин;

X₂₉ представляет собой аланин, глицин или серин;

X₃₀ представляет собой гистидин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоцистеиновую кислоту или цистеиновую кислоту;

X₃₁ представляет собой аспарагиновую кислоту, пролин или лизин;

X₃₂ представляет собой лизин или пролин;

X₃₃ представляет собой треонин, аланин или отсутствует;

X₃₄ представляет собой аргинин или отсутствует; и

X₃₅ представляет собой аргинин или отсутствует;

при условии, что по меньшей мере один из X₃₁ или X₃₂ представляет собой лизин.

Связывающий фрагмент

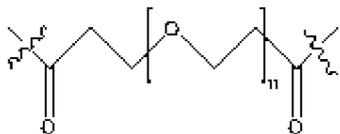
Инсулиновые димеры, раскрытые в настоящем документе, образуются между первым и вторым инсулиновыми полипептидами, причем каждый инсулиновый полипептид содержит А-цепь и В-цепь. Первый и второй инсулиновые полипептиды могут представлять собой двухцепочечные аналоги инсулина (то есть такие, в которых А и В-цепи связаны только посредством межцепевых дисульфидных связей между внутренними остатками цистеина), причем первый и второй инсулиновые полипептиды связаны друг с другом с образованием димера посредством ковалентной связи, бифункционального линкера или с помощью клик-химии катализируемого медью (I) азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC) или клик-химии без меди

для связывания связывающих фрагментов на соответствующих В-цепях. В соответствии с одним вариантом осуществления первый и второй инсулиновые полипептиды связаны друг с другом посредством бифункционального линкера, соединяющего боковую цепь лизина В28 или В29 В-цепи первого инсулинового полипептида с боковой цепью аминокислоты В28 или В29 В-цепи второго инсулинового полипептида.

В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора связывающий фрагмент может представлять собой необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. Связывающий фрагмент может представлять собой двухвалентную, прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную, необязательно замещенную C1-C20 углеводородную цепь, в которой одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент.

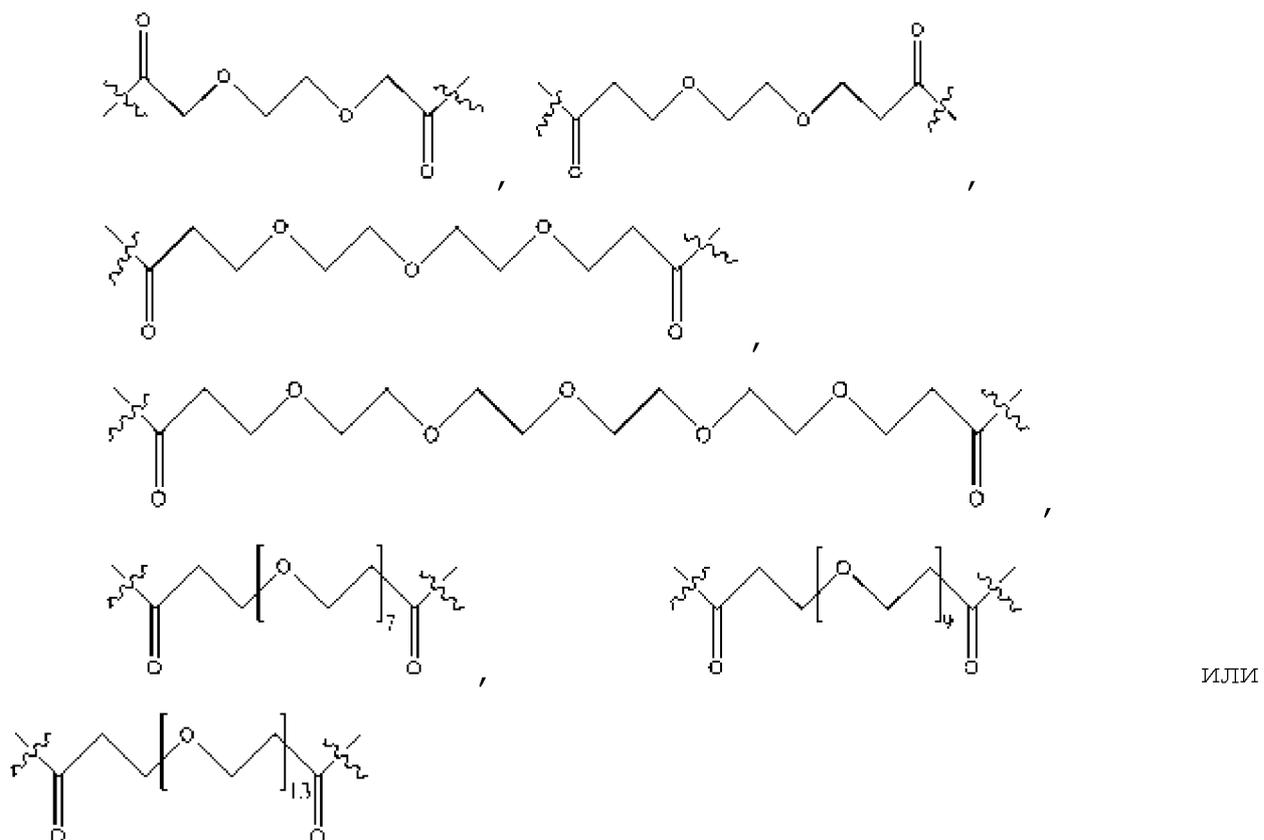
В одном варианте осуществления связывающий фрагмент содержит PEG-линкер, короткий линейный полимер из приблизительно 2-25 этиленгликолевых звеньев или из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 25 этиленгликолевых звеньев и, необязательно, одну или несколько аминокислот. В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора PEG-линкер содержит структуру (PEG)₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁, (PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆ или (PEG)₂₅. PEG-линкер может представлять собой бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эpsilon-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов. Структура бифункционального PEG-линкера,

конъюгированного с эпсилон-аминогруппой групп лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, может быть представлена следующей общей формулой



причем $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16$ или 25 , и волнистая линия обозначает связь между линкером и эпсилон-аминогруппой. Способы конъюгирования PEG с эпсилон-аминогруппой лизина хорошо известны в данной области техники, смотри, например, Veronese, *Biomaterials* 22: 405-417 (2001).

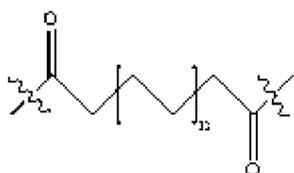
В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора связывающий фрагмент PEG, конъюгирующий эпсилон-аминогруппу лизина в положении В29 или В28 первого инсулинового полипептида с эпсилон-аминокислотой лизина в положении В29 или В28 второго инсулинового полипептида, представляет собой



причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

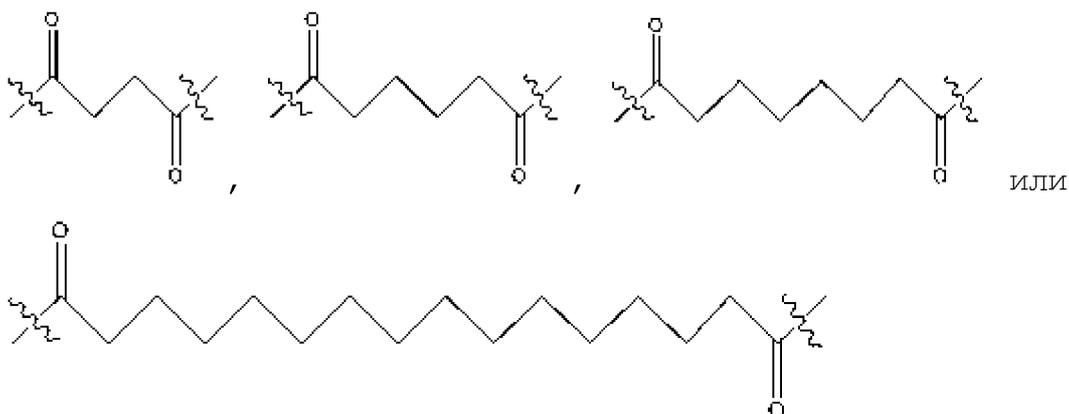
В другом варианте осуществления связывающий фрагмент

содержит ацильный фрагмент, содержащий 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 15 или 16 атомов углерода. В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора ацильный фрагмент представляет собой сукциниловый (4), адипоилловый (С6), субероилловый (С8) или гексадекандиоилловый (С16) фрагмент. Ацильный фрагмент может содержать бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов. Структура бифункционального ацильного линкера, конъюгированного с эпсилон-аминогруппой группы лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, может быть представлена следующей общей формулой



причем $n=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11$ или 12 , и волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

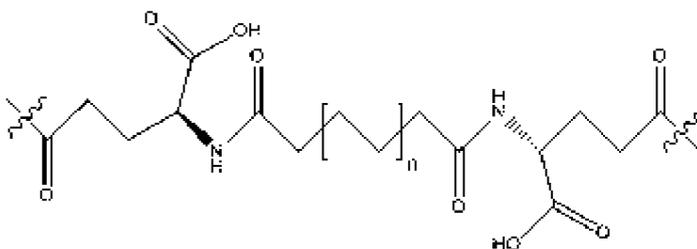
В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора ацильный связывающий фрагмент, конъюгирующий эпсилон-аминогруппу лизина в положении В29 или В28 первого инсулинового полипептида с эпсилон-аминокислотой лизина в положении В29 или В28 второго инсулинового полипептида, представляет собой



причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых

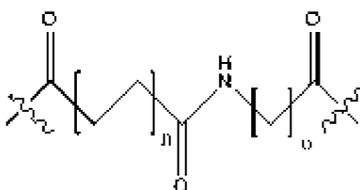
полипептидов.

В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора бифункциональный ацильный линкер может дополнительно включать в себя одну или две аминокислоты на одном или обоих концах ацильного линкера. Например, в отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора аминокислота на одном или обоих концах линкера представляет собой гамма-глутаминовую кислоту (γE), что может быть представлено следующей общей формулой

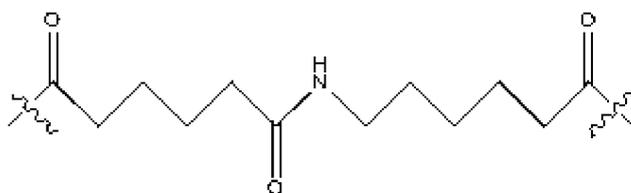


причем $n=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11$ или 12 , и волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении B29 или B28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер с амид-содержащей алкильной цепью, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении B29 или B28 первого и второго инсулиновых полипептидов, что может быть представлено следующей общей формулой

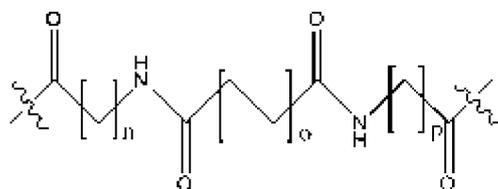


причем $n=1$ или 2 , $o=1, 2, 3, 4$ или 5 , и волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении B29 или B28 инсулиновых полипептидов. В одном конкретном варианте осуществления связывающий фрагмент может иметь структуру

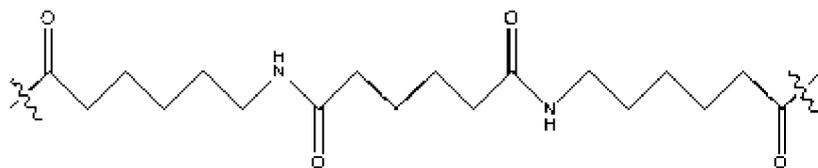


причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эpsilon-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер с амид-содержащей алкильной цепью, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эpsilon-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, что может быть представлено следующей общей формулой

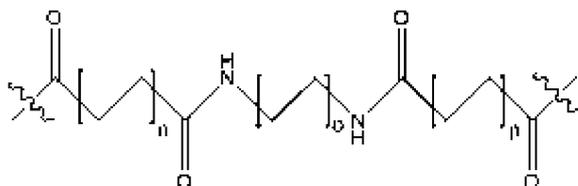


причем $n=1, 2, 3, 4$ или 5 , $o=1$ или 2 , $p=1, 2, 3, 4$ или 5 , и волнистые линии обозначают связь между линкером и эpsilon-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов. В одном конкретном варианте осуществления связывающий фрагмент может иметь структуру

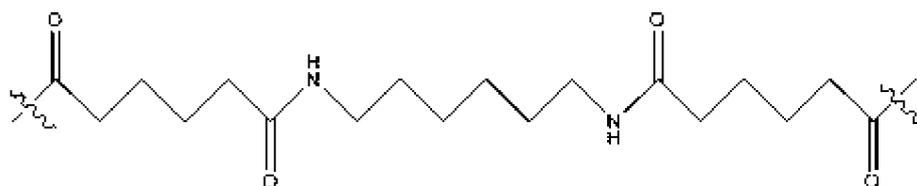


причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эpsilon-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер с амид-содержащей алкильной цепью, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эpsilon-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, и который может быть представлен следующей общей формулой



причем $n=1$ или 2 , $o=1, 2$ или 3 , $p=1$ или 2 , и волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов. В одном конкретном варианте осуществления связывающий фрагмент может иметь структуру



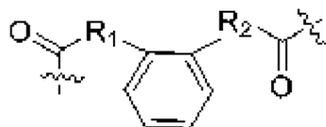
причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

В отдельных вариантах осуществления связывающий фрагмент содержит кольцевую структуру, которая обеспечивает жесткость связывающего фрагмента. В отдельных вариантах осуществления кольцевая структура содержит бензильную группу или насыщенную или ненасыщенную алициклическую группу, содержащую 3, 4, 5, 6, 7 или 8 атомов углерода. В отдельных вариантах осуществления алициклическая группа содержит циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклопентил или циклооктил. В отдельных вариантах осуществления ненасыщенная алициклическая группа (циклоалкан) содержит циклопропенильную, циклобутенильную, циклопентенильную, циклогексенильную, циклогептенильную или циклооктенильную группу. В отдельных вариантах осуществления кольцевая структура может дополнительно содержать одну или несколько насыщенных или ненасыщенных алифатических боковых цепей. В отдельных вариантах осуществления кольцевая структура может дополнительно содержать одну или несколько алифатических боковых цепей, содержащих один или несколько гетероатомов. В отдельных вариантах осуществления гетероатом представляет собой O, S или N.

В отдельных вариантах осуществления кольцевая структура

содержит гетероатом. В отдельных вариантах осуществления гетероатом может представлять собой O, S или N. В отдельных вариантах осуществления кольцевая структура содержит бензильную группу или насыщенную или ненасыщенную алициклическую группу, содержащую 3, 4, 5, 6, 7 или 8 атомов углерода, в которой один или несколько атомов углерода замещены гетероатомом, выбранным из N, O и S. Примеры кольцевых структур, которые включают в себя гетероатом, включают, но без ограничения, этиленоксид, этиленимин, триметилксид, фуран, тетрагидрофуран, тиофен, пирролидин, пиран, пиперидин, имидазол, триазол, диоксан, морфолин, пиримидин, триазол, тиетан, 1,3-дiazетин, 2,3-дигидроазет, 1,2-оксатиолан, изоксазол, оксазол, силол, оксепан, тиепин, 3,4,5,6-тетрагидро-2Н-азепин, 1,4-тиазепин, азокан и тиокан.

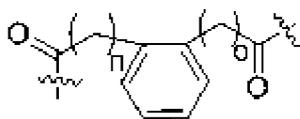
В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,1-диацилбензол, имеющий следующую общую формулу



причем R_1 и R_2 могут быть одинаковыми или различными, причем R_1 и R_2 независимо представляют собой связь, насыщенную или ненасыщенную C1-C20 или C1-C6 алкильную цепь, причем одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь (PEG)₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁,

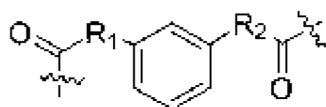
(PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆ или (PEG)₂, и причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,1-диацилбензол, имеющий следующую общую формулу



причем n и o независимо представляют собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5, причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

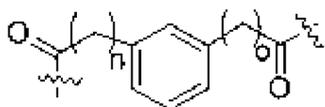
В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,3-диацилбензол, имеющий следующую общую формулу



причем R₁ и R₂ могут быть одинаковыми или различными, причем R₁ и R₂ независимо представляют собой связь, насыщенную или ненасыщенную C1-C20 или C1-C6 алкильную цепь, причем одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный

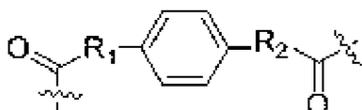
фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь (PEG)₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁, (PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆ или (PEG)₂, и причем волнистые линии обозначают связь между линкером и ε-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с ε-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,3-диацилбензол, имеющий следующую общую формулу



причем n и o независимо представляют собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5, причем волнистые линии обозначают связь между линкером и ε-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

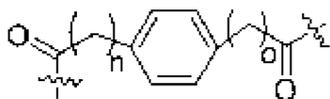
В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с ε-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,4-диацилбензол, имеющий следующую общую формулу



причем R_1 и R_2 могут быть одинаковыми или различными, причем R_1 и R_2 независимо представляют собой связь, насыщенную или ненасыщенную C1-C20 или C1-C6 алкильную цепь, причем одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой

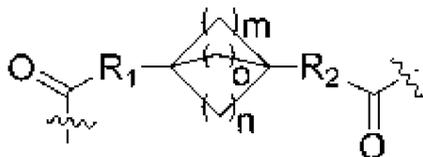
водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь (PEG)₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁, (PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆ или (PEG)₂, и причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,4-диацилбензол, имеющий следующую общую формулу



причем n и o независимо представляют собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5, причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

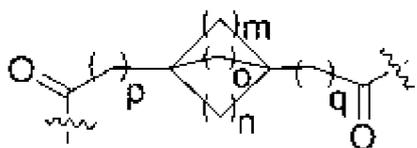
В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,3-диацилбензол, имеющий следующую общую формулу



причем m , n , и o независимо представляют собой 1 или 2; R_1 и R_2 могут быть одинаковыми или различными, причем R_1 и R_2 независимо представляют собой связь, насыщенную или ненасыщенную C1-C20 или C1-C6 алкильную цепь, причем одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на -O-,

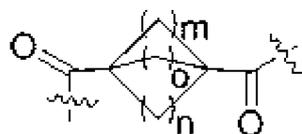
-S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь (PEG)₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁, (PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆ или (PEG)₂, и причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении B29 или B28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении B29 или B28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,3-диацилбензол, имеющий следующую общую формулу



причем m, n, и o независимо представляют собой 1 или 2; причем p и q независимо представляют собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5, причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении B29 или B28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении B29 или B28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,3-диацилбензол, имеющий следующую общую формулу



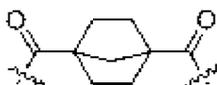
причем m , n , и o независимо представляют собой 1 или 2; причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эpsilon-аминогруппой лизина в положении B29 или B28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эpsilon-аминогруппой остатков лизина в положении B29 или B28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,4-диацилциклогексан, имеющий следующую общую формулу



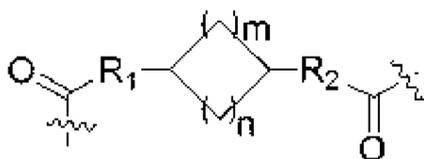
и причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эpsilon-аминогруппой лизина в положении B29 или B28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эpsilon-аминогруппой остатков лизина в положении B29 или B28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,4-диацилциклогексан, имеющий следующую общую формулу



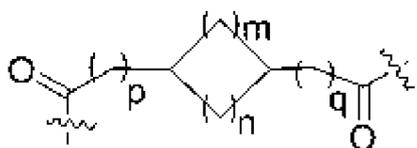
и причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эpsilon-аминогруппой лизина в положении B29 или B28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эpsilon-аминогруппой остатков лизина в положении B29 или B28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,3-диацилбензол, имеющий следующую общую формулу



причем m и n независимо представляют собой 0, 1 или 2 при условии, что оба m и n не представляют собой 0; R_1 и R_2 могут быть одинаковыми или различными, причем R_1 и R_2 независимо представляют собой связь, насыщенную или ненасыщенную C1-C20 или C1-C6 алкильную цепь, причем одно или несколько метиленовых звеньев необязательно и независимо замещены на -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, гетероциклическую группу, арильную группу или гетероарильную группу, причем каждое вхождение R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу, ацильный фрагмент, арилалкильный фрагмент, алифатический фрагмент, арильный фрагмент, гетероарильный фрагмент или гетероалифатический фрагмент, поли(этиленгликолевую) (PEG) цепь (PEG)₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁, (PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆ или (PEG)₂, и причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эpsilon-аминогруппой лизина в положении B29 или B28 инсулиновых полипептидов.

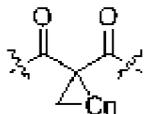
В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эpsilon-аминогруппой остатков лизина в положении B29 или B28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,3-диацилбензол, имеющий следующую общую формулу



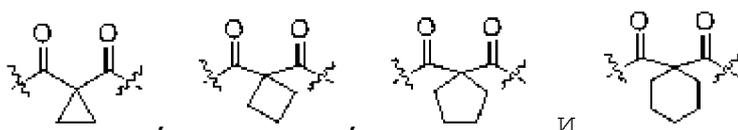
причем m и n независимо представляют собой 1 или 2; причем p и q независимо представляют собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5, причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эpsilon-аминогруппой лизина в положении B29 или B28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эpsilon-аминогруппой остатков лизина в

положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,1-диацил, имеющий следующую общую формулу

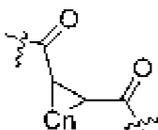


причем n представляет собой 1, 2, 3 или 4, причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов. В конкретных вариантах осуществления 1,1-диацил может иметь структуру, выбранную из

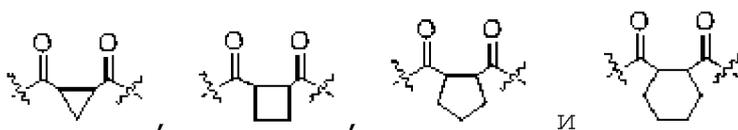


(1,1-диацил-С3; 1,2-диацил-С4; 1,1-диацил-С5; и 1,1-диацил-С6, соответственно), причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,2-диацил, имеющий следующую общую формулу



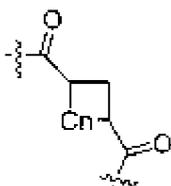
причем n представляет собой 1, 2, 3 или 4, причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов. В конкретных вариантах осуществления 1,2-диацил может иметь структуру, выбранную из



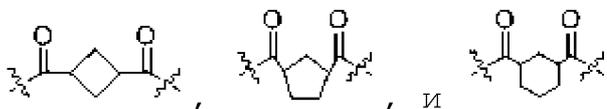
(1,2-диацил-С3; 1,2-диацил-С4; 1,2-диацил-С5; и 1,2-диацил-С6, соответственно),

причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,3-диацил, имеющий следующую общую формулу

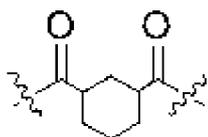


причем n представляет собой 1, 2 или 3, причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов. В конкретных вариантах осуществления 1,3-диацил может иметь структуру, выбранную из



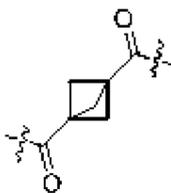
(1,3-диацил-С4; 1,3-диацил-С5; и 1,3-диацил-С6, соответственно), причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,4-диацил, имеющий следующую общую формулу



(1,4-диацил-С6), причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

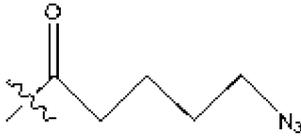
В другом варианте осуществления связывающий фрагмент содержит бифункциональный линкер, который может быть ковалентно конъюгирован или связан с эпсилон-аминогруппой остатков лизина в положении В29 или В28 первого и второго инсулиновых полипептидов, который может быть представлен как 1,3-диацилциклобутил, имеющий следующую общую формулу



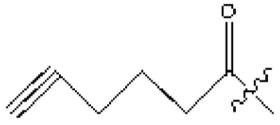
и причем волнистые линии обозначают связь между линкером и эпсилон-аминогруппой лизина в положении В29 или В28 инсулиновых полипептидов.

В другом аспекте настоящего изобретения первый и второй инсулиновые полипептиды могут быть конъюгированы вместе с помощью катализируемого медью азид-алкинового циклоприсоединения Хьюстена (CuAAC), в частности клик-химии CuAAC. В данном аспекте эпсилон-аминогруппа лизина В28 или В29 первого инсулинового полипептида конъюгирована с линкерным фрагментом, имеющим проксимальный конец и дистальный конец, причем проксимальный конец линкерного фрагмента конъюгирован с эпсилон-аминогруппой, а дистальный содержит азидную группу. В данном аспекте эпсилон-аминогруппа лизина В28 или В29 второго инсулинового полипептида конъюгирована с линкерным фрагментом, имеющим проксимальный конец и дистальный конец, причем проксимальный конец линкерного фрагмента конъюгирован с эпсилон-аминогруппой, а дистальный содержит алкиновую группу. В присутствии Cu^{2+} и восстанавливающего средства азидная и алкиновая группы будут образовывать непрерывный связывающий фрагмент, содержащий триазольный фрагмент. Для описания клик-химии CuAAC смотри патент США № 8129542, который включен в настоящий документ во всей полноте.

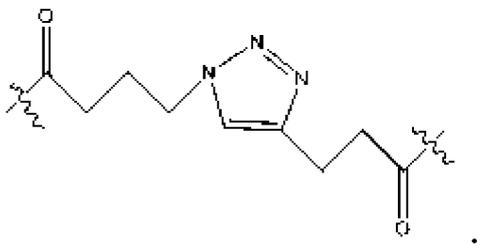
В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора первый инсулиновый полипептид может иметь конъюгированный с эпсилон-аминогруппой лизина В28 или В29 линкер, имеющий формулу



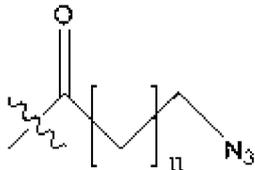
а второй инсулиновый полипептид может иметь конъюгированный с эпсилон-аминогруппой лизина В28 или В29 линкер, имеющий формулу



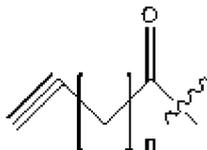
. В присутствии Cu^{2+} и восстанавливающего средства линкеры объединяются с образованием связывающего фрагмента, имеющего структуру



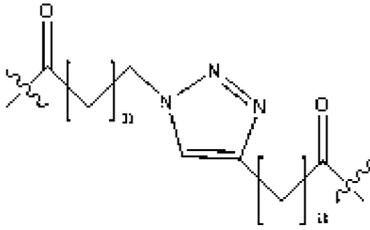
В отдельных аспектах частичных агонистов инсулинового рецептора первый инсулиновый полипептид может иметь конъюгированный с эпсилон-аминогруппой лизина В28 или В29 линкер, имеющий формулу



причем $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ или 10 , а второй инсулиновый полипептид может иметь конъюгированный с эпсилон-аминогруппой лизина В28 или В29 линкер, имеющий формулу

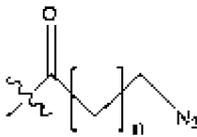


причем $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ или 10 . В присутствии Cu^{2+} и восстанавливающего средства линкеры объединяются с образованием связывающего фрагмента, имеющего структуру



причем каждый n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В другом аспекте как первый инсулиновый полипептид, так и второй инсулиновый полипептид могут иметь конъюгированный с их соответствующей эpsilon-аминогруппой лизина В28 или В29 линкер, имеющий формулу

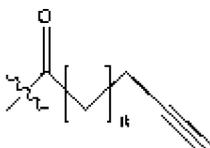


причем каждый n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Конъюгация линкеров с образованием связывающего фрагмента может быть достигнута посредством предоставления молекулы (промежуточного или мостикового линкера), имеющей структуру



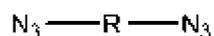
причем R представляет собой ковалентную связь, атом углерода, фенил, гетероатом или необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. В отдельных аспектах R представляет собой C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 или C10 ацильную группу или PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13 или PEG25.

В другом аспекте как первый инсулиновый полипептид, так и второй инсулиновый полипептид могут иметь конъюгированный с их соответствующей эpsilon-аминогруппой лизина В28 или В29 линкер, имеющий формулу



причем каждый n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4,

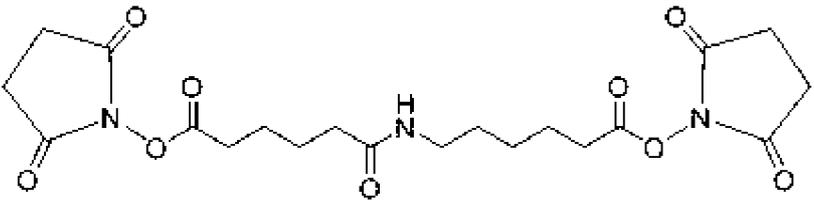
5, 6, 7, 8, 9 или 10. Конъюгация линкеров с образованием связывающего фрагмента может быть достигнута посредством предоставления молекулы (промежуточного или мостикового линкера), имеющей структуру

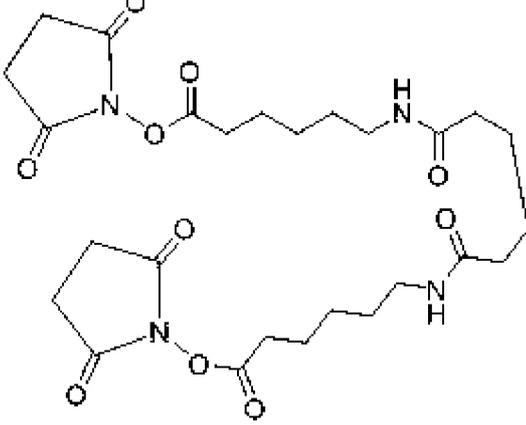
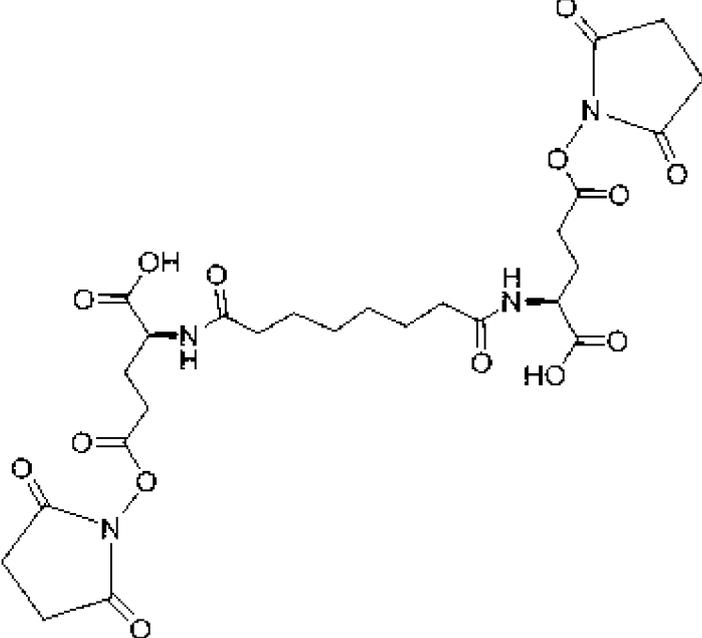
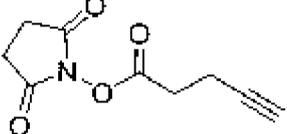
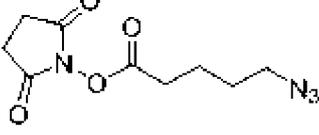
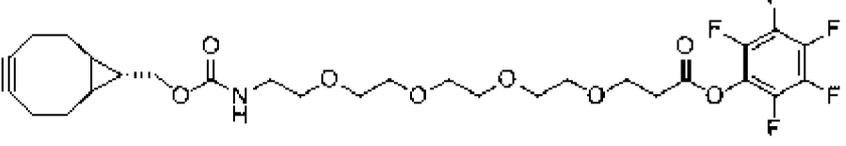
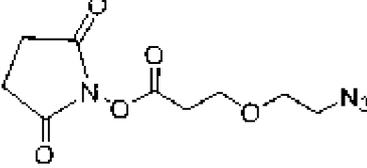


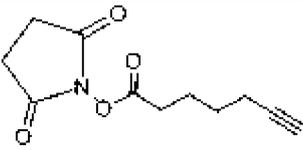
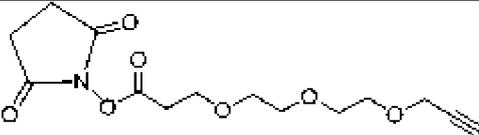
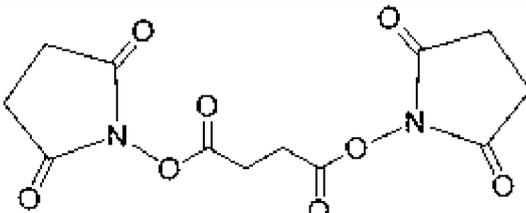
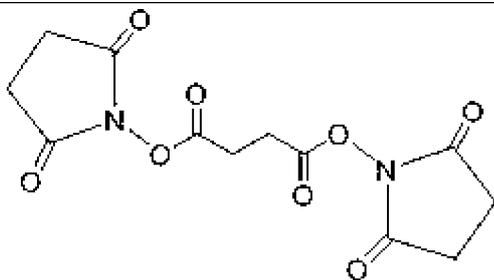
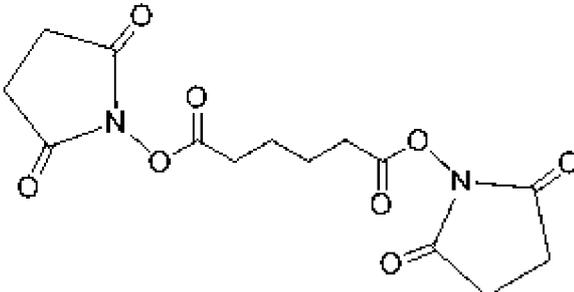
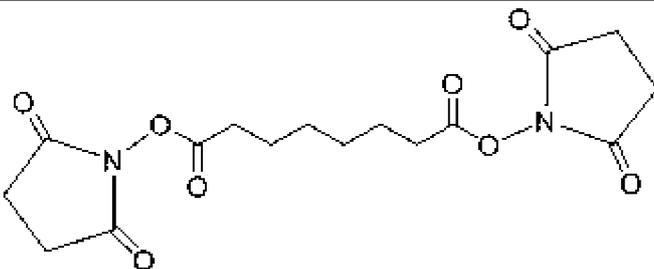
причем R представляет собой ковалентную связь, атом углерода, фенил, гетероатом или необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. В отдельных аспектах R представляет собой C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 или C10 ацильную группу или PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13 или PEG25.

В отдельных аспектах первый инсулиновый полимер конъюгирован по эpsilon-аминогруппе лизина B28 или B29 с заканчивающимся азидом линкером, как указано выше, а второй инсулиновый полипептид конъюгирован по эpsilon-аминогруппе лизина B28 или B29 с линкером, заканчивающимся циклооктиновым фрагментом, и линкеры конъюгируют с образованием линкерного фрагмента с помощью клик-химии циклоприсоединения без меди. Смотри, например, патент США № 7807619, который включен в настоящий документ во всей полноте.

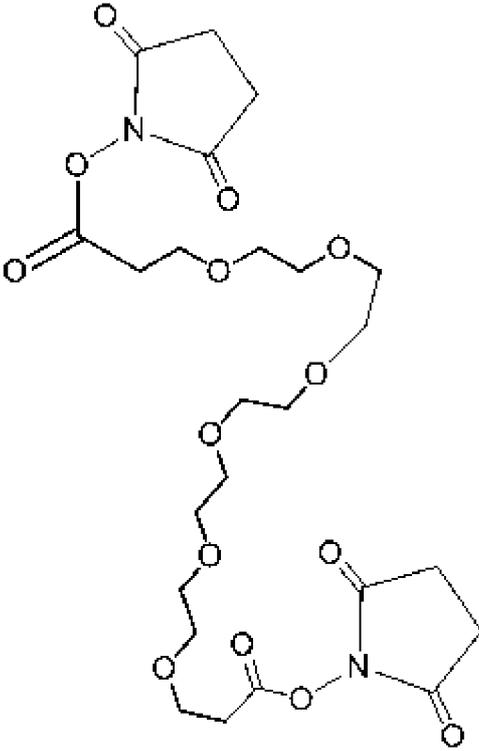
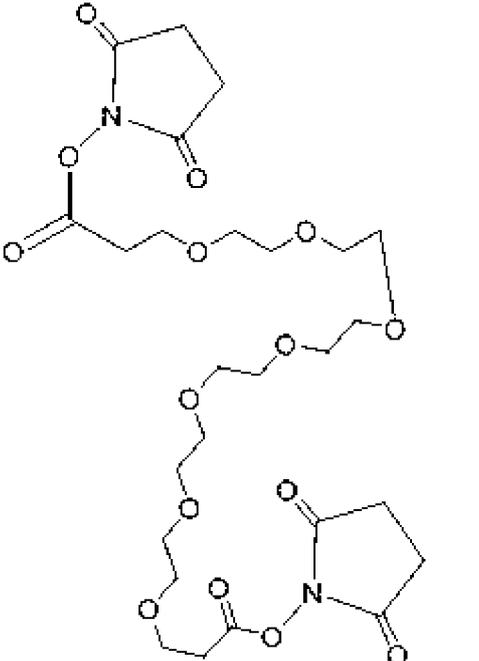
Следующая таблица показывает примеры линкеров, которые могут быть использованы для конструирования димеров настоящего изобретения. Показанные димеры содержат 2,5-диоксопирролидин-1-ильные группы для конъюгирования с эpsilon-аминогруппой лизина B29 или B29.

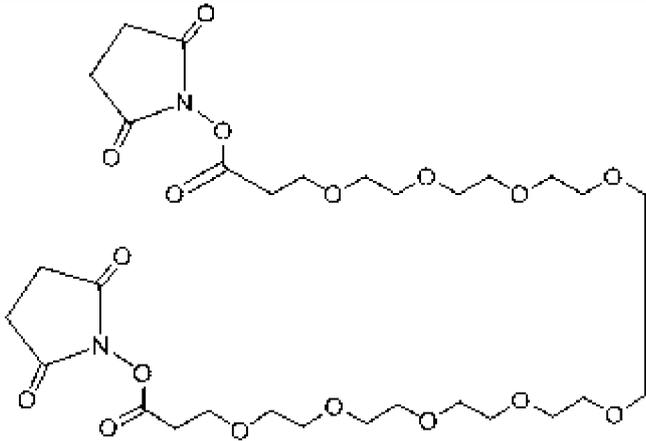
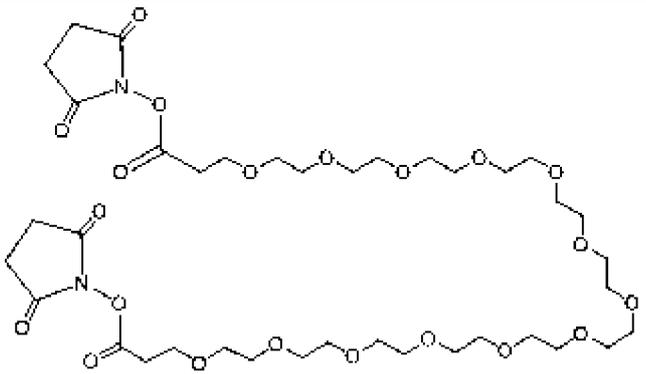
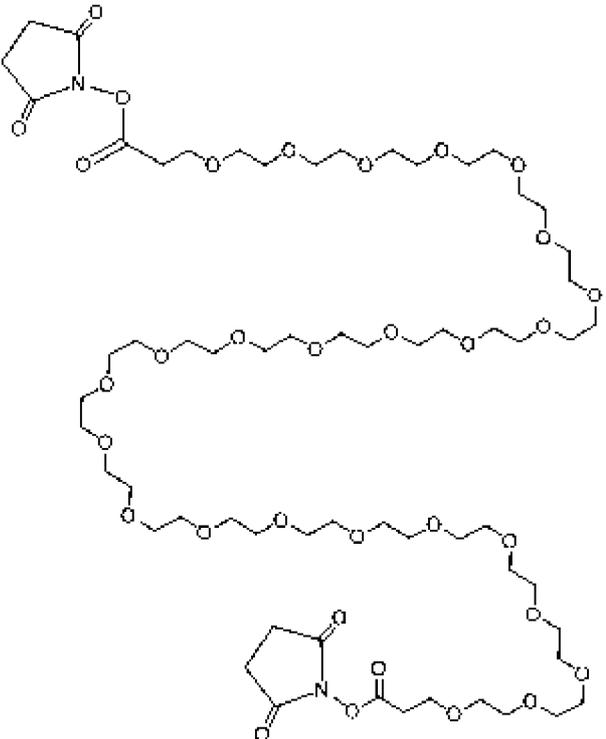
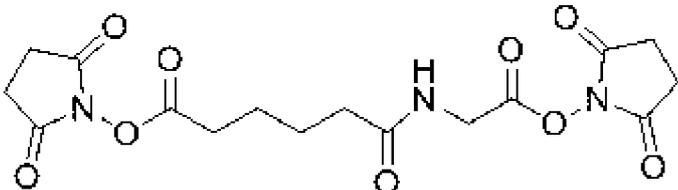
Таблица линкеров		
	Линкер	Название
1		C6+Nc6

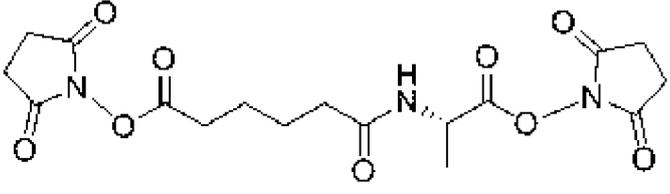
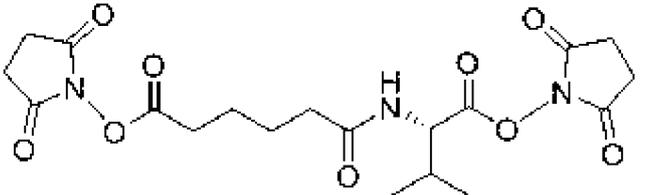
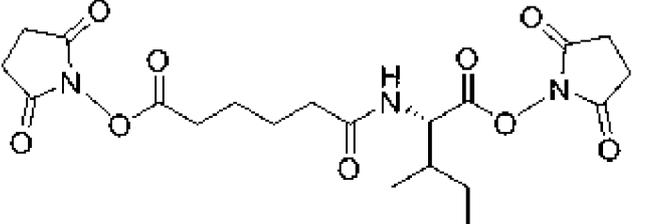
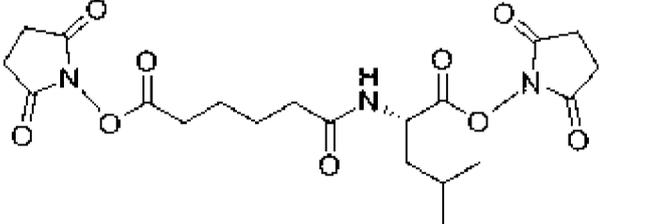
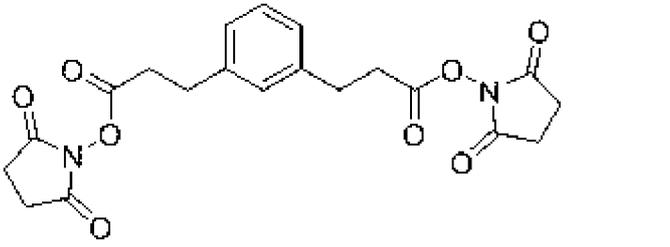
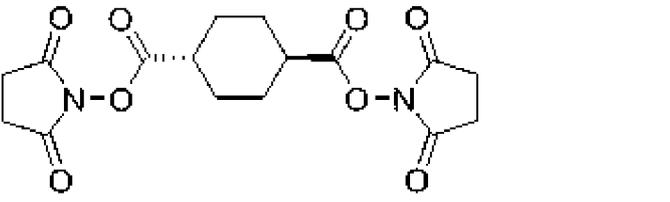
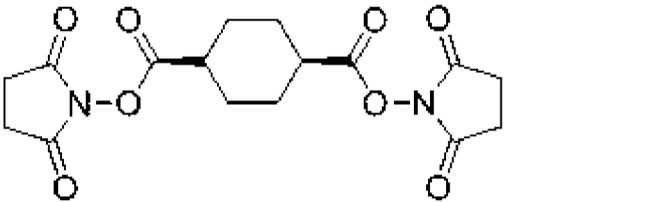
2		C6N+C6+NC 6
3		γE-C8-γE
4		Клик-1
5		Клик-2
6		Клик-3
7		Клик-4

8		Клик-5
9		Клик-6
10		C2
11		C4
12		C6
13		C8

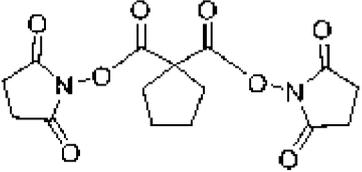
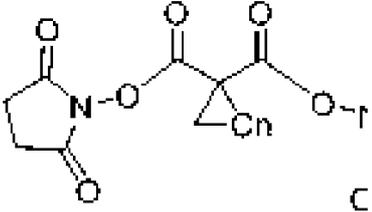
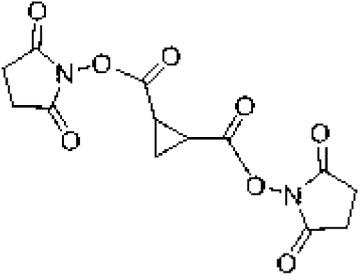
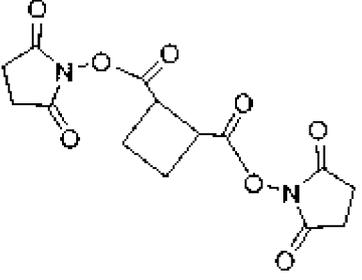
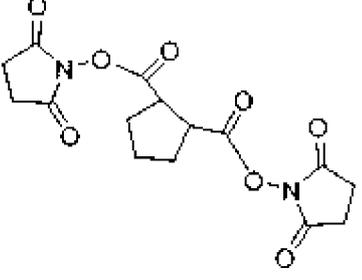
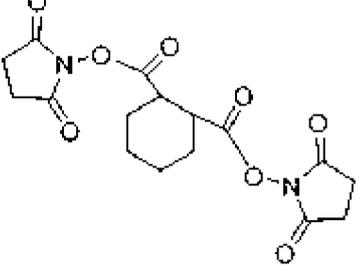
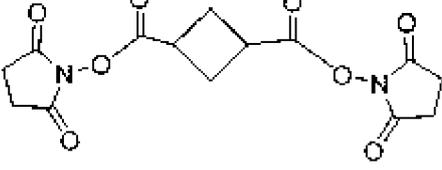
14		C16
15		PEG2
16		PEG3
17		PEG4
18		PEG5

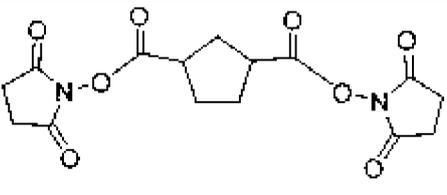
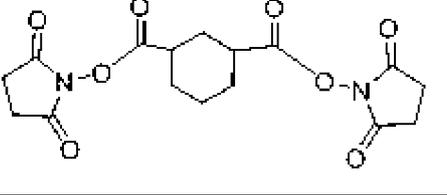
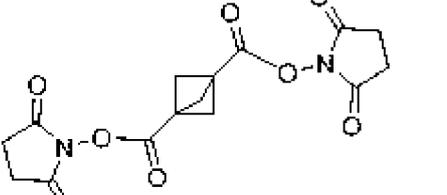
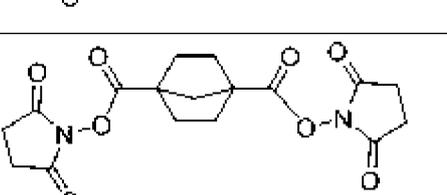
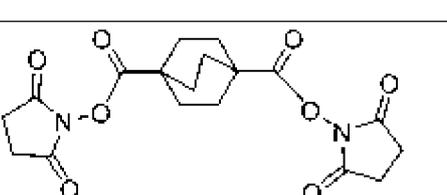
19	 <p>The chemical structure shows a central poly(ethylene glycol) (PEG) chain consisting of six repeating units, represented by six oxygen atoms connected by ethylene groups. At each end of the PEG chain, there is a succinimide ring. The succinimide rings are connected to the PEG chain via their nitrogen atoms, which are linked to the terminal oxygen atoms of the PEG chain through ester-like linkages. The succinimide rings are drawn in a five-membered ring configuration with two carbonyl groups and one nitrogen atom.</p>	PEG6
20	 <p>The chemical structure shows a central poly(ethylene glycol) (PEG) chain consisting of seven repeating units, represented by seven oxygen atoms connected by ethylene groups. At each end of the PEG chain, there is a succinimide ring. The succinimide rings are connected to the PEG chain via their nitrogen atoms, which are linked to the terminal oxygen atoms of the PEG chain through ester-like linkages. The succinimide rings are drawn in a five-membered ring configuration with two carbonyl groups and one nitrogen atom.</p>	PEG7

21		PEG9
22		PEG13
23		PEG25
24		C6-ГЛИЦИН

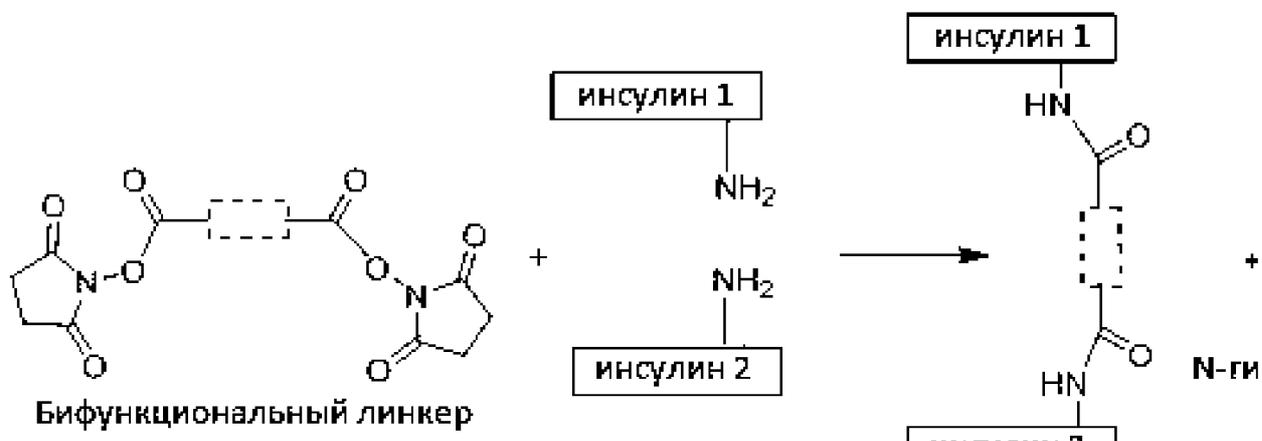
25		С6-аланин
26		С6-изолейцин
27		С6-лейцин
28		С6-валин
29		Дипропилфенол
30		Транс-циклогексан-1,4-дикислота
31		Цис-циклогексан-1,4-дикислота

32	<p>The structure shows a central piperidine ring with a tert-butyl group attached to the nitrogen atom. Two di(2,2,6,6-tetramethyl-1,3-dioxane-5-carboxylate) groups are attached to the 2 and 6 positions of the piperidine ring via their ester oxygen atoms.</p>	Трет- бутилпипе- ридинтрик арбоксила т
33	<p>The structure features a central 1,3,5-triazine ring with a chlorine atom at the 6-position. Two hexyl chains are attached to the 2 and 4 positions of the triazine ring. Each hexyl chain is terminated with a di(2,2,6,6-tetramethyl-1,3-dioxane-5-carboxylate) group.</p>	С6N-хлор- 1,3,5- триазин- NC6
34	<p>The structure shows a central benzene ring with two di(2,2,6,6-tetramethyl-1,3-dioxane-5-carboxylate) groups attached at the para positions (1 and 4) via their ester oxygen atoms.</p>	Терефтала т
35	<p>The structure shows a central benzene ring with two di(2,2,6,6-tetramethyl-1,3-dioxane-5-carboxylate) groups attached at the meta positions (1 and 3) via their ester oxygen atoms.</p>	изофтала т
36	<p>The structure shows a central heptane chain with a BocHN group at one end. Two di(2,2,6,6-tetramethyl-1,3-dioxane-5-carboxylate) groups are attached to the chain via their ester oxygen atoms.</p>	Гептандио ат
37	<p>The structure shows a central cyclopropane ring with two di(2,2,6,6-tetramethyl-1,3-dioxane-5-carboxylate) groups attached to the same carbon atom (1-position) via their ester oxygen atoms.</p>	1,1- диацил-С3
38	<p>The structure shows a central cyclobutane ring with two di(2,2,6,6-tetramethyl-1,3-dioxane-5-carboxylate) groups attached to the same carbon atom (1-position) via their ester oxygen atoms.</p>	1,1- диацил-С4

39		1,1- диацил-С5
40		1,1- диацил-С6
41		1,2- диацил-С3
42		1,2- диацил-С4
43		1,2- диацил-С5
44		1,2- диацил-С6
45		1,3- диацил-С4

46		1,3- диацил-С5
47		1,3- диацил-С6
48		1,4- диацил- циклобути л-С1
49		1,4- циклогекс ил-С1
50		1,4- циклогекс ил-С2

Конъюгация бифункционального линкера с эпсилон-аминогруппой остатка лизина в положении В29 или В28 полипептида В-цепи двух молекул инсулинов или аналогов инсулина с образованием инсулинового димера, связанного посредством связывающего фрагмента, может быть схематически показана как



причем молекулы инсулин 1 и инсулин 2 могут быть одинаковыми или различными, и бифункциональный линкер и

получаемый связывающий фрагмент после конъюгации могут иметь структуру любого линкера и получаемого связывающего фрагмента, раскрытых в настоящем документе.

Модификация инсулиновых полипептидов

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из полипептидов А-цепи или полипептидов В-цепи частичного агониста инсулинового рецептора модифицирован таким образом, что он содержит ацильную группу. Ацильная группа может быть ковалентно связана с аминокислотой инсулинового полипептида непосредственно или с аминокислотой инсулинового полипептида опосредованно через спейсер, причем спейсер расположен между аминокислотой инсулинового полипептида и ацильной группой. Инсулиновый полипептид может быть ацилирован в том же аминокислотном положении, в котором связан гидрофильный фрагмент, или в другом аминокислотном положении. Например, ацилирование может происходить в любом положении, включая любую аминокислоту полипептидов А- или В-цепи, а также положение в пределах связывающего фрагмента, при условии, что активность, проявляемая неацилированным инсулиновым полипептидом, сохраняется после ацилирования. Неограничивающие примеры включают ацилирование в положении А1 А-цепи и положении В1 В-цепи.

В одном конкретном аспекте настоящего изобретения первый и/или второй инсулиновый полипептид (или его производное или конъюгат) модифицирован таким образом, что он содержит ацильную группу, посредством непосредственного ацилирования амина, гидроксила или тиола боковой цепи аминокислоты инсулинового полипептида. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй инсулиновый полипептид непосредственно ацилирован по амину, гидроксилу или тиолу боковой цепи аминокислоты. В связи с этим может быть предложен инсулиновый полипептид, который модифицирован посредством одной или нескольких аминокислотных замен в полипептидной последовательности А- или В-цепи, включая, например, в положениях А1, А14, А15, В1, В10 или В22 или в любом положении связывающего фрагмента, на аминокислоту, содержащую амин, гидроксил или тиол в боковой цепи.

В некоторых вариантах осуществления спейсер между первым

и/или вторым инсулиновым полипептидом и ацильной группой представляет собой аминокислоту, содержащую амин, гидроксил или тиол в боковой цепи (или дипептид или трипептид, содержащий аминокислоту, содержащую амин, гидроксил или тиол в боковой цепи). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит гидрофильный бифункциональный спейсер. В одном конкретном варианте осуществления спейсер содержит аминополи(алкилокси)карбоксилат. В связи с этим спейсер может содержать, например, $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, причем m представляет собой любое целое число от 1 до 6, а n представляет собой любое число от 2 до 12, в том числе, например, 8-амино-3,6-диоксооктановую кислоту, которая коммерчески доступна от Peptides International, Inc. (Louisville, KY). В одном варианте осуществления гидрофильный бифункциональный спейсер содержит две или более реактивные группы, например аминогруппу, гидроксильную, тиольную и карбоксильную группу или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления гидрофильный бифункциональный спейсер содержит гидроксильную группу и карбоксилат. В других вариантах осуществления гидрофильный бифункциональный спейсер содержит аминогруппу и карбоксилат. В других вариантах осуществления гидрофильный бифункциональный спейсер содержит тиольную группу и карбоксилат.

В некоторых вариантах осуществления спейсер между первым и/или вторым инсулиновым полипептидом и ацильной группой представляет собой гидрофобный бифункциональный спейсер. Гидрофобные бифункциональные спейсеры известны в данной области техники. Смотри, например, документ Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996), который включен посредством ссылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный бифункциональный спейсер содержит две или более реактивные группы, например аминогруппу, гидроксильную, тиольную и карбоксильную группу или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный бифункциональный спейсер содержит гидроксильную группу и карбоксилат. В других вариантах осуществления гидрофобный бифункциональный спейсер содержит аминогруппу и карбоксилат. В

других вариантах осуществления гидрофобный бифункциональный спейсер содержит тиольную группу и карбоксилат. Подходящие гидрофобный бифункциональный спейсеры, содержащие карбоксилат и гидроксильную группу или тиольную группу, известны в данной области техники и включают, например, 8-гидроксиоктановую кислоту и 8-меркаптооктановую кислоту.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бифункциональный спейсер может представлять собой синтетическую или природную аминокислоту, содержащую остов аминокислоты, который имеет длину от 3 до 10 атомов (например, 6-аминокапроновую кислоту, 5-аминовалериановую кислоту, 7-аминогептановую кислоту и 8-аминооктановую кислоту). В качестве альтернативы, спейсер может представлять собой дипептидный или трипептидный спейсер, имеющий пептидный остов, который имеет длину от 3 до 10 атомов (например, от 6 до 10 атомов). Каждая аминокислота дипептидного или трипептидного спейсера, прикрепленного к инсулиновому полипептиду, может быть независимо выбрана из группы, состоящей из: природных и/или неприродных аминокислот, включая, например, любой из D или L изомеров природных аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr) или любой D или L изомер неприродных аминокислот, выбранных из группы, состоящей из: β -аланина (β -Ala), *N*- α -метилаланина (Me-Ala), аминomásляной кислоты (Abu), α -аминomásляной кислоты (γ -Abu), аминакапроновой кислоты (ϵ -Ahx), аминоизomásляной кислоты (Aib), аминометилпирролкарбоновой кислоты, аминопиперидинкарбоновой кислоты, аminosерина (Ams), аминотетрагидропиран-4-карбоновой кислоты, *N*-метокси-*N*-метиламида аргинина, β -аспарагиновой кислоты (β -Asp), азетидинкарбоновой кислоты, 3-(2-бензотиазолил)аланина, α -трет-бутилглицина, 2-амино-5-уреидо-*n*-валериановой кислоты (цитруллина, Cit), β -циклогексилаланина (Cha), ацетамидометилцистеина, диаминomásляной кислоты (Dab), диаминопропионовой кислоты (Dpr), дигидроксифенилаланина (DOPA), диметилтиазолидина (DMTA), γ -глутаминовой кислоты (γ -Glu), гомосерина (Hse), гидроксипролина (Hyp), *N*-метокси-*N*-метиламида

изолейцина, метилизолейцина (MeIle), изонипекотиновой кислоты (Isn), метиллейцина (MeLeu), метиллизина, диметиллизина, триметиллизина, метанопролина, метионинсульфоксида (Met(O)), метионинсульфона (Met(O₂)), норлейцина (Nle), метилнорлейцина (Me-Nle), норвалина (Nva), орнитина (Orn), парааминобензойной кислоты (PABA), пеницилламина (Pen), метилфенилаланина (MePhe), 4-хлорфенилаланина (Phe(4-Cl)), 4-фторфенилаланина (Phe(4-F)), 4-нитрофенилаланина (Phe(4-NO₂)), 4-цианофенилаланина ((Phe(4-CN))), фенилглицина (Phg), пиперидинилаланина, пиперидинилглицина, 3,4-дегидропролина, пирролидинилаланина, саркозина (Sar), селеноцистеина (Sec), O-бензилфосфосерина, 4-амино-3-гидрокси-6-метилгептановой кислоты (Sta), 4-амино-5-циклогексил-3-гидроксипентановой кислоты (ACHPA), 4-амино-3-гидрокси-5-фенилпентановой кислоты (АНРРА), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновой кислоты (Tic), тетрагидропиранглицина, тиенилаланина (Thi), O-бензилфосфотирозина, O-фосфотирозина, метокситирозина, этокситирозина, O-(бис-диметиламинофосфоно) тирозина, тирозинсульфата тетрабутиламина, метилвалина (MeVal), 1-амино-1-циклогексанкарбоновой кислоты (Acx), аминовалериановой кислоты, бета-циклопропилаланина (Cpa), пропаргилглицина (Prg), аллилглицина (Alg), 2-амино-2-циклогексилпропановой кислоты (2-Cha), трет-бутилглицина (Tbg), винилглицина (Vg), 1-амино-1-циклопропанкарбоновой кислоты (Acp), 1-амино-1-циклопентанкарбоновой кислоты (Acpe), алкилированной 3-меркаптопропионовой кислоты, 1-амино-1-циклобутанкарбоновой кислоты (Acb). В некоторых вариантах осуществления дипептидный спейсер выбирают из группы, состоящей из: Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, γ -аминомасляная кислота- γ -аминомасляная кислота и γ -Glu- γ -Glu.

Первый и/или второй инсулиновый полипептид может быть модифицирован таким образом, что он содержит ацильную группу, посредством ацилирования длинноцепочечного алкана. В конкретных аспектах длинноцепочечный алкан содержит аминогруппу, гидроксильную или тиольную группу (например октадециламин,

тетрадеканол и гексадекантиол), которые реагируют с карбоксильной группой инсулинового полипептида или ее активированной формой. Карбоксильная группа инсулинового полипептида или ее активированная форма могут быть частью боковой цепи аминокислоты (например, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты) инсулинового полипептида или могут быть частью пептидного остова.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй инсулиновый полипептид модифицирован таким образом, что он содержит ацильную группу, посредством ацилирования длинноцепочечного алкана спейсером, который прикреплен к инсулиновому полипептиду. В конкретных аспектах длинноцепочечный алкан содержит аминогруппу, гидроксильную или тиольную группу, которые реагируют с карбоксильной группой спейсера или ее активированной формой. Подходящие спейсеры, содержащие карбоксильную группу или ее активированную форму, описаны в настоящем документе и включают, например, бифункциональные спейсеры, например аминокислоты, дипептиды, трипептиды, гидрофильные бифункциональные спейсеры и гидрофобные бифункциональные спейсеры. Как используется в настоящем документе термин "активированная форма карбоксильной группы" относится к карбоксильной группе с общей формулой $R(C=O)X$, где X представляет собой уходящую группу, а R представляет собой инсулиновый полипептид или спейсер. Например, активированные формы карбоксильных групп могут включать, но без ограничения, ацилхлориды, ангидриды и сложные эфиры. В некоторых вариантах осуществления активированная карбоксильная группа представляет собой сложный эфир с *N*-гидроксисукцинимидной (NHS) уходящей группой.

В тех аспектах настоящего изобретения, в которых длинноцепочечный алкан ацилирован пептидом, инсулиновым полипептидом или спейсером, длинноцепочечный алкан может иметь любой размер и может содержать углеродную цепь любой длины. Длинноцепочечный алкан может быть линейным или разветвленным. В некоторых аспектах длинноцепочечный алкан представляет собой C_4 - C_{30} алкан. Например, длинноцепочечный алкан может представлять

собой любой алкан из C₄ алкана, C₆ алкана, C₈ алкана, C₁₀ алкана, C₁₂ алкана, C₁₄ алкана, C₁₆ алкана, C₁₈ алкана, C₂₀ алкана, C₂₂ алкана, C₂₄ алкана, C₂₆ алкана, C₂₈ алкана или C₃₀ алкана. В некоторых вариантах осуществления длинноцепочечный алкан содержит C₈-C₂₀ алкан, например C₁₄ алкан, C₁₆ алкан или C₁₈ алкан.

В некоторых вариантах осуществления аминогруппа, гидроксильная или тиольная группа первого и/или второго инсулинового полипептида ацилированы холестериновой кислотой. В одном конкретном варианте осуществления пептид связан с холестериновой кислотой посредством алкилированного дезамино-Cys-спейсера, то есть спейсера на основе алкилированной 3-меркаптопропионовой кислоты. Подходящие способы ацилирования пептидов по аминам, гидроксилам и тиолам известны в данной области техники. Смотри, например, Miller, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 218: 377-382 (1996); Shimohigashi and Stammer, *Int. J. Pept. Protein Res.* 19: 54-62 (1982); и Previero et al., *Biochim. Biophys. Acta* 263: 7-13 (1972) (в отношении способов ацилирования по гидроксилу); и San and Silvius, *J. Pept. Res.* 66: 169-180 (2005) (в отношении способов ацилирования по тиолу); *Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications"* p. 1, 2-12 (1990); Hashimoto et al., *Pharmacuetical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity"* Vol. 6, NO: 2 pp. 171-176 (1989).

Ацильная группа ацилированного пептида первого и/или второго инсулинового полипептида может иметь любой размер, например любую длину углеродной цепи, и может быть линейной или разветвленной. В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения ацильная группа представляет собой C₄-C₃₀ жирную кислоту. Например, ацильная группа может представлять собой любую из C₄ жирной кислоты, C₆ жирной кислоты, C₈ жирной кислоты, C₁₀ жирной кислоты, C₁₂ жирной кислоты, C₁₄ жирной кислоты, C₁₆ жирной кислоты, C₁₈ жирной кислоты, C₂₀ жирной кислоты, C₂₂ жирной кислоты, C₂₄ жирной кислоты, C₂₆ жирной кислоты, C₂₈ жирной кислоты или C₃₀ жирной кислоты. В некоторых вариантах осуществления ацильная группа представляет собой C₈-C₂₀

жирную кислоту, например C₁₄ жирную кислоту или C₁₆ жирную кислоту. В некоторых вариантах осуществления ацильная группа представляет собой мочевины.

В альтернативном варианте осуществления ацильная группа представляет собой желчную кислоту. Желчная кислота может представлять собой любую подходящую желчную кислоту, включая, но без ограничения, холевую кислоту, хенодезоксихолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, литохолевую кислоту, таурохолевую кислоту, гликохолевую кислоту и холестериновую кислоту.

Ацилированный первый и/или второй инсулиновый полипептид, описанный в настоящем документе, может быть дополнительно модифицирован таким образом, что он содержит гидрофильный фрагмент. В некоторых конкретных вариантах осуществления гидрофильный фрагмент может содержать полиэтиленгликолевую (PEG) цепь. Включение гидрофильного фрагмента может быть осуществлено любыми подходящими способами, такими как любой из способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ацилированный одноцепочечный аналог содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Cys, Lys, Orn, гомо-Cys или Ac-Phe, и боковая цепь аминокислоты ковалентно связана с гидрофильным фрагментом (например, PEG). В одном варианте осуществления ацильная группа прикреплена к положению A1, A14, A15, B1, B2, B10 или B22 (в соответствии с нумерацией аминокислот A и B-цепей нативного инсулина), необязательно посредством спейсера, содержащего Cys, Lys, Orn, гомо-Cys или Ac-Phe.

В качестве альтернативы, ацилированный первый и/или второй инсулиновый полипептид содержит спейсер, причем спейсер является как ацилированным, так и модифицированным таким образом, что он содержит гидрофильный фрагмент. Неограничивающие примеры подходящих спейсеров включают спейсер, содержащий одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Cys, Lys, Orn, гомо-Cys и Ac-Phe.

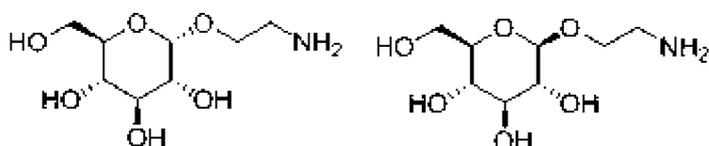
В некоторых вариантах осуществления аминоконец по меньшей мере одной N-концевой аминокислоты по меньшей мере одного из полипептидов A-цепи и полипептидов B-цепи частичного агониста

инсулинового рецептора модифицирован таким образом, что он содержит заместитель. Заместитель может быть ковалентно связан с аминокислотной группой N-концевой аминокислоты непосредственно или с аминокислотной группой опосредованно через спейсер, причем спейсер расположен между аминокислотной группой N-концевой аминокислоты инсулинового полипептида и заместителем. Заместитель может представлять собой ацильный фрагмент, как рассмотрено выше. Заместитель может иметь общую формулу $RC(O)-$, где R может представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, полиэтиленгликоль (PEG), сахараиды, то есть в отдельных аспектах $RC(O)-$ может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель представляет собой карбамоильную группу, ацетильную группу, глицин, метильную группу, метоксигруппу, диметильную группу, изобутильную группу, PEG1-группу или PEG2-группу (структуры заместителей смотри в примерах в настоящем документе). Карбамоилирование инсулина было раскрыто Oimoni et al., Nephron 46: 63-66 (1987), а инсулиновые димеры, содержащие карбамоильные группы на N-конце были раскрыты в опубликованной заявке РСТ № WO2014052451 (например, MIU-90).

В отдельных вариантах осуществления по меньшей мере одна N-концевая аминокислота конъюгирована по азоту N2 с заместителем, содержащим N-гидроксисукцинимидный сложный эфир, связанный с группой, имеющей общую формулу $RC(O)-$, где R может представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, полиэтиленгликоль (PEG), сахараиды, то есть в отдельных аспектах $RC(O)-$ может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель представляет собой карбамоильную группу, ацетильную группу, глицин, метильную группу, метоксигруппу, диметильную группу, изобутильную группу, PEG1-группу или PEG2-группу.

В отдельных вариантах осуществления сахараид, ковалентно связанный с одним или несколькими амино-концами первого и

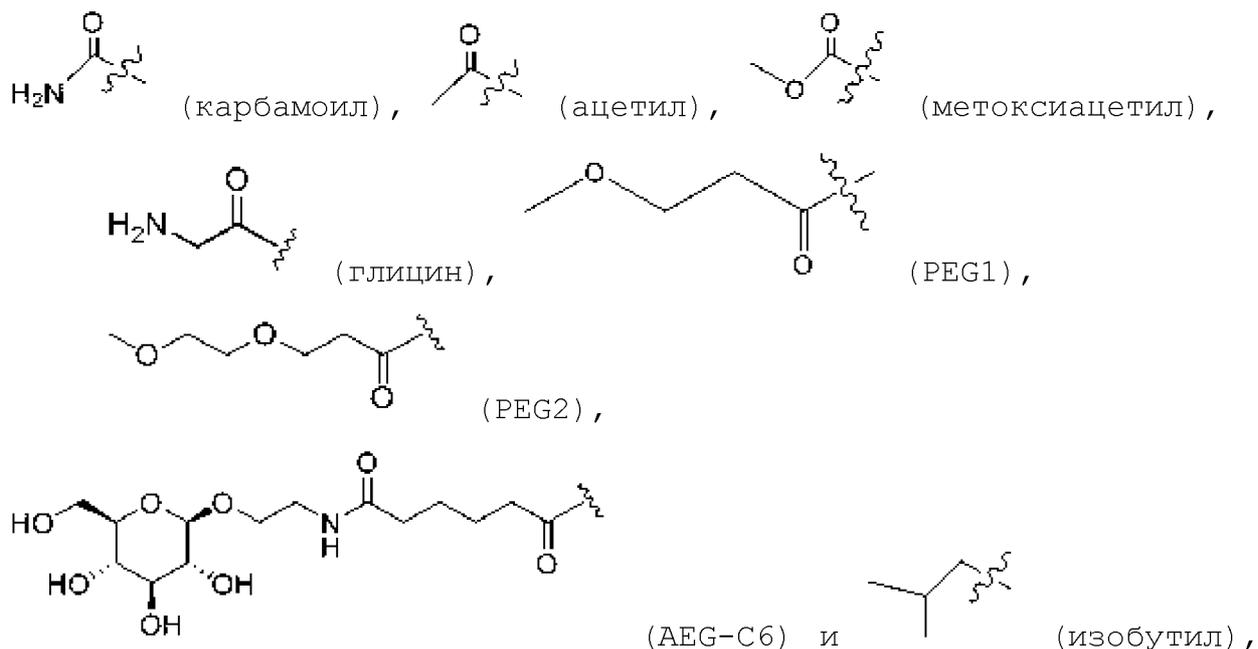
второго инсулиновых полипептидов, может представлять собой моносахарид, смотри, например димер 51. В некоторых вариантах осуществления сахарид содержит одну или несколько аминогрупп. В некоторых вариантах осуществления сахарид и аминогруппа разделены C_1-C_6 алкильной группой, например C_1-C_3 алкильной группой. В некоторых вариантах осуществления сахарид представляет собой аминоэтилглюкозу (АЕГ). В некоторых вариантах осуществления сахаридный лиганд находится в конфигурации "D". В других вариантах осуществления сахаридный лиганд находится в конфигурации "L". Ниже показаны структуры этих типичных сахаридов. Другие типичные сахариды будут очевидны для специалистов в данной области техники.



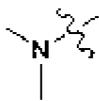
АЕГ-альфа АЕГ-бета

Обычно сахариды могут быть непосредственно или опосредованно конъюгированы посредством линкера с амино-концом одного или нескольких из первого и второго инсулиновых полипептидов. В отдельных аспектах линкер представляет собой алкилдидоил, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$, где $n=0-45$, $0-20$, $0-10$ или $0-5$.

Типичными заместителями, конъюгированными с *N*-концевой аминогруппой, могут быть



причем волнистая линия обозначает связь между заместителем и *N*-концевой аминогруппой. Заместитель может также представлять собой



(Me₂; *N*-диметил) причем волнистая линия обозначает связь между Me₂ и углеродом-альфа *N*-концевой аминокислоты.

Примеры инсулиновых димеров

В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает инсулиновые димеры, в которых первый B29 или B28 Lys молекулы первого инсулинового гетеродимера, содержащего первый полипептид А-цепи и первый полипептид В-цепи, и второй B29 или B28 Lys второго инсулинового гетеродимера, содержащего второй полипептид А-цепи и второй полипептид В-цепи, конъюгированы вместе посредством бифункционального линкера, выбранного из группы, состоящей из линкера 1, линкера 2, линкера 3, линкера 10, линкера 11, линкера 12, линкера 13, линкера 14, линкера 15, линкера 16, линкера 17, линкера 18, линкера 19, линкера 20, линкера 21, линкера 22, линкера 23, линкера 24, линкера 25, линкера 26, линкера 27, линкера 28, линкера 29, линкера 30, линкера 31, линкера 32, линкера 33, линкера 34, линкера 35, линкера 36, линкера 37, линкера 38, линкера 39, линкера 40, линкера 41, линкера 42, линкера 43, линкера 44, линкера 45, линкера 46, линкера 47, линкера 48, линкера 49 и линкера 50, при условии, что когда бифункциональный линкер представляет собой линкер 10, линкер 11, линкер 12, линкер 13 или линкер 14, по меньшей мере один из первого или второго полипептидов А-цепи или В-цепи конъюгирован своей *N*-концевой аминокислотой с заместителем, раскрытым в настоящем документе, или по меньшей мере *N*-концевые аминокислоты молекулы первого инсулинового гетеродимера конъюгированы с заместителем, раскрытым в настоящем документе, или *N*-концевые аминокислоты как первого инсулинового гетеродимера, так и второго инсулинового гетеродимера конъюгированы с заместителем. В отдельных вариантах осуществления заместитель содержит *N*-гидроксисукцинимидный сложный эфир, связанный с группой, имеющей общую формулу RC(O)-,

где R может представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, полиэтиленгликоль (PEG), сахараиды, то есть в отдельных аспектах $RC(O)$ – может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель представляет собой карбамоильную группу, ацетильную группу, глицин, метильную группу, метоксигруппу, диметильную группу, изобутильную группу, PEG1-группу, AEG-группу, AEG-C6 алкильную группу или PEG2-группу.

В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает инсулиновые димеры, в которых первый B29 или B28 Lys молекулы первого инсулинового гетеродимера, содержащего первый полипептид А-цепи и первый полипептид В-цепи, конъюгированный с первым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 5 и линкера 7, и второй B29 или B28 Lys второго инсулинового гетеродимера, содержащего второй полипептид А-цепи и второй полипептид В-цепи, конъюгированный со вторым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 4, линкера 6, линкера 8 и линкера 9, конъюгированы вместе посредством первого линкера и второго линкера. В отдельных вариантах осуществления по меньшей мере один из первого или второго полипептидов А-цепи или В-цепи конъюгирован своей N-концевой аминокислотой с заместителем, раскрытым в настоящем документе, или по меньшей мере N-концевые аминокислоты молекулы первого инсулинового гетеродимера конъюгированы с заместителем, раскрытым в настоящем документе, или N-концевые аминокислоты как первого инсулинового гетеродимера, так и второго инсулинового гетеродимера конъюгированы с заместителем. В отдельных вариантах осуществления заместитель содержит N-гидроксисукцинимидный сложный эфир, связанный с группой, имеющей общую формулу $RC(O)$ –, где R может представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и R' может представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, полиэтиленгликоль (PEG), сахараиды, то есть в отдельных аспектах $RC(O)$ – может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных

аспектах заместитель представляет собой карбамоильную группу, ацетильную группу, глицин, метильную группу, метоксигруппу, диметильную группу, изобутильную группу, PEG1-группу, AEG-группу, AEG-C6 алкильную группу или PEG2-группу.

В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает инсулиновые димеры, в которых первый B29 или B28 Lys молекулы первого инсулинового гетеродимера, содержащего первый полипептид А-цепи и первый полипептид В-цепи, конъюгирован с первым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 5 и линкера 7, и второй B29 или B28 Lys второго инсулинового гетеродимера, содержащего второй полипептид А-цепи и второй полипептид В-цепи, конъюгирован со вторым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 5 и линкера 7, причем первый и второй линкеры конъюгированы вместе посредством мостикового линкера, имеющего структуру



где R представляет собой ковалентную связь, атом углерода, фенил, гетероатом или необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. В отдельных аспектах R представляет собой C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 или C10 ацильную группу или PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13 или PEG25. В отдельных вариантах осуществления по меньшей мере один из первого или второго полипептидов А-цепи или В-цепи конъюгирован своей N-концевой аминокислотой с заместителем, раскрытым в настоящем документе, или по меньшей мере N-концевые аминокислоты молекулы первого инсулинового гетеродимера конъюгированы с заместителем, раскрытым в настоящем документе, или N-концевые аминокислоты как первого инсулинового гетеродимера, так и второго инсулинового гетеродимера конъюгированы с заместителем. В отдельных вариантах осуществления заместитель содержит N-гидроксисукцинимидный сложный эфир, связанный с группой, имеющей общую формулу RC(O)-, где R может представлять собой R'CH₂, R'NH, R'O, и R' может

представлять собой H, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, полиэтиленгликоль (PEG), сахараиды, то есть в отдельных аспектах R(O) – может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, N-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель представляет собой карбамоильную группу, ацетильную группу, глицин, метильную группу, метоксигруппу, диметильную группу, изобутильную группу, PEG1-группу, AEG-группу, AEG-C6 алкильную группу или PEG2-группу.

В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает инсулиновые димеры, в которых первый B29 или B28 Lys молекулы первого инсулинового гетеродимера, содержащего первый полипептид А-цепи и первый полипептид В-цепи, конъюгирован с первым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 4, линкера 6, линкера 8 и линкера 9, и второй B29 или B28 Lys второго инсулинового гетеродимера, содержащего второй полипептид А-цепи и второй полипептид В-цепи, конъюгирован со вторым линкером, выбранным из группы, состоящей из линкера 4, линкера 6, линкера 8 и линкера 9, причем первый и второй линкеры конъюгированы вместе посредством мостикового линкера, имеющего структуру

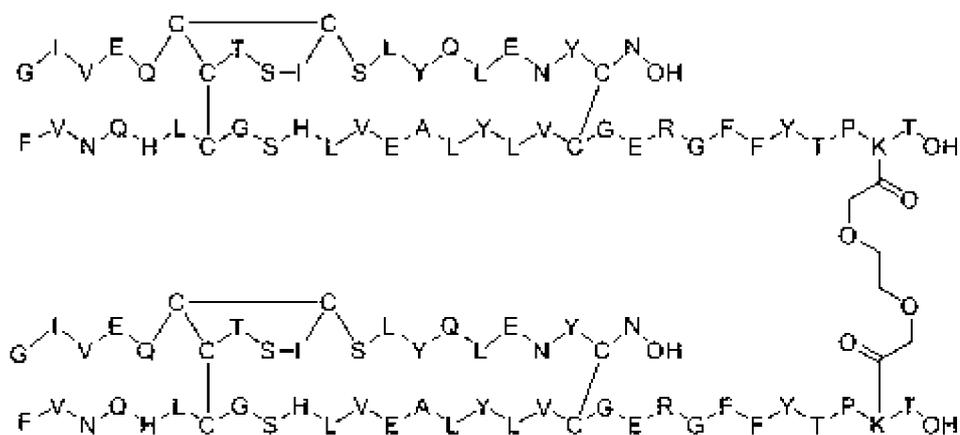


где R представляет собой ковалентную связь, атом углерода, фенил, гетероатом или необязательно замещенную группу, выбранную из группы, состоящей из ацильной, алифатической, гетероалифатической, арильной, гетероарильной и гетероциклической. В отдельных аспектах R представляет собой C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 или C10 ацильную группу или PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13 или PEG25. В отдельных вариантах осуществления по меньшей мере один из первого или второго полипептидов А-цепи или В-цепи конъюгирован своей N-концевой аминокислотой с заместителем, раскрытым в настоящем документе, или по меньшей мере N-концевые аминокислоты молекулы первого инсулинового гетеродимера конъюгированы с заместителем, раскрытым в настоящем документе, или N-концевые аминокислоты как первого инсулинового

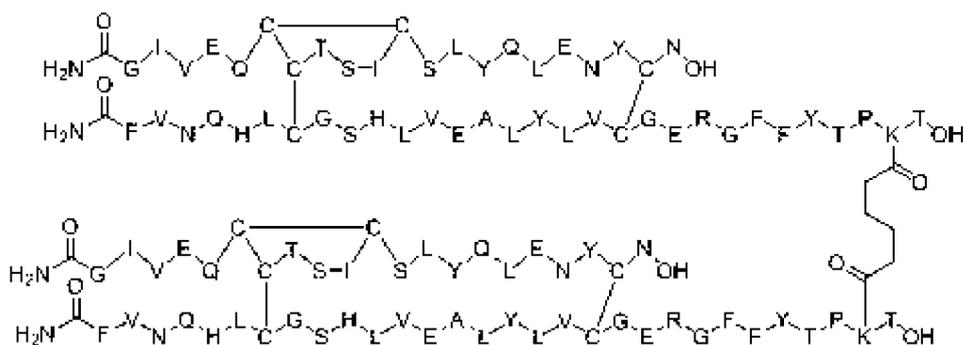
гетеродимера, так и второго инсулинового гетеродимера конъюгированы с заместителем. В отдельных вариантах осуществления заместитель содержит *N*-гидроксисукцинимидный сложный эфир, связанный с группой, имеющей общую формулу $RC(O)-$, где *R* может представлять собой $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, и *R'* может представлять собой *H*, линейную алкильную цепь, аминокислоту, пептид, полиэтиленгликоль (PEG), сахарады, то есть в отдельных аспектах $RC(O)-$ может представлять собой ацетил, фенилацетил, карбамоил, *N*-алкилкарбамоил или алкоксикарбонил. В отдельных аспектах заместитель представляет собой карбамоильную группу, ацетильную группу, глицин, метильную группу, метоксигруппу, диметильную группу, изобутильную группу, PEG1-группу, AEG-группу, AEG-C6 алкильную группу или PEG2-группу.

В других вариантах осуществления первый и второй инсулиновые гетеродимеры могут содержать любую из молекул инсулинов или аналогов инсулина, раскрытых в настоящем документе.

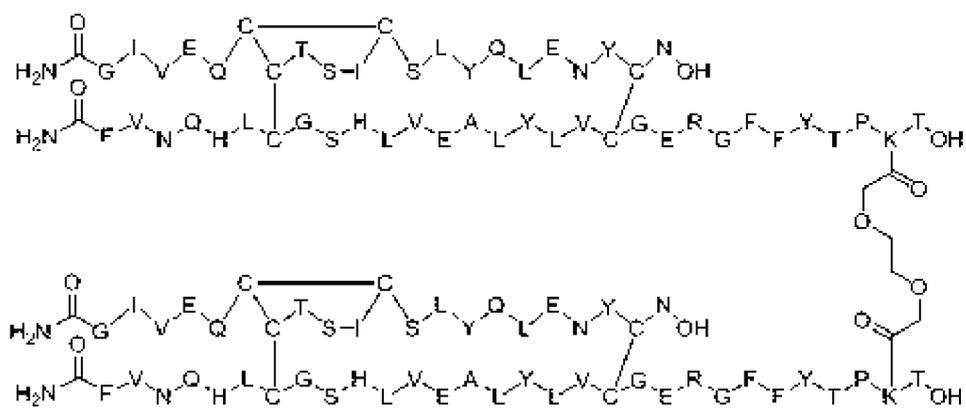
Настоящее изобретение предлагает также инсулиновые димеры, выбранные из



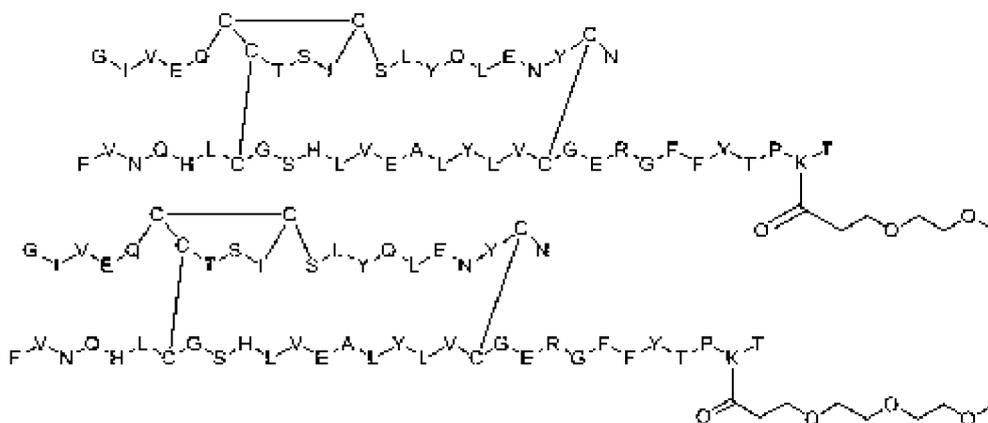
димера 1;



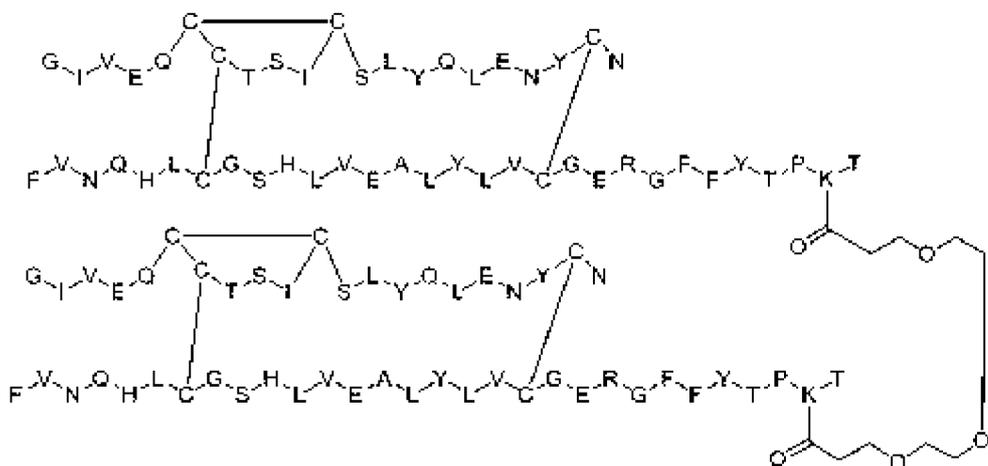
димера 2;



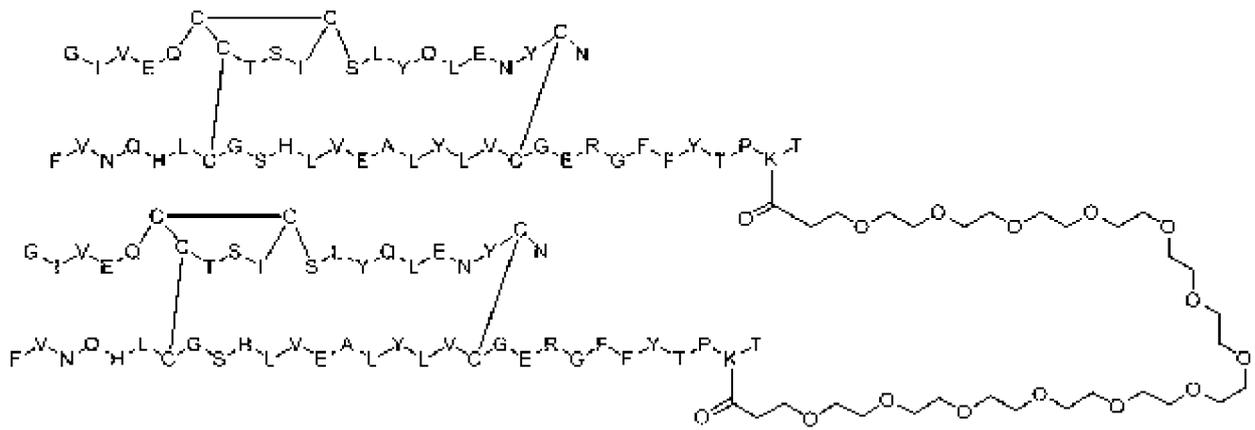
димера 3;



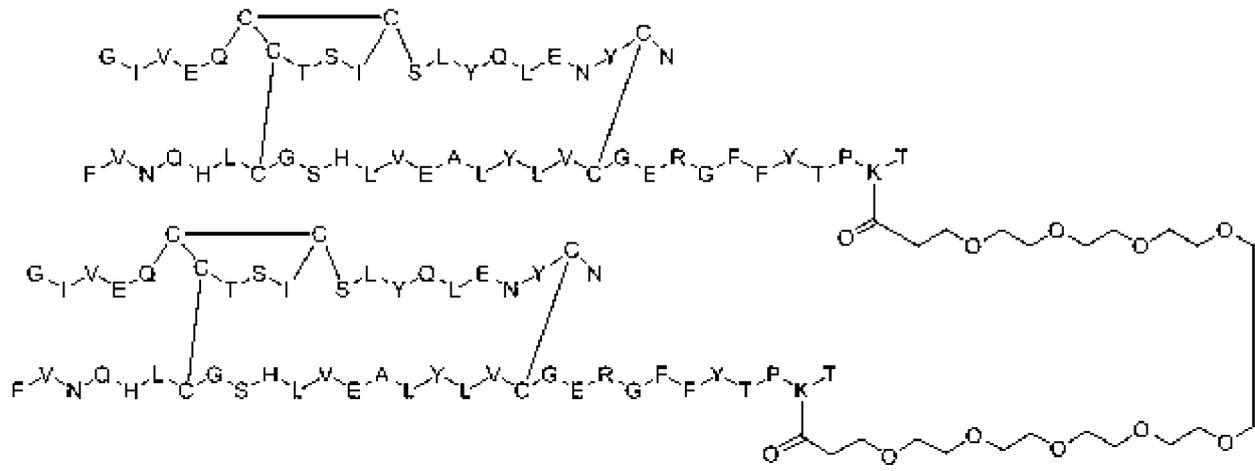
димера 4;



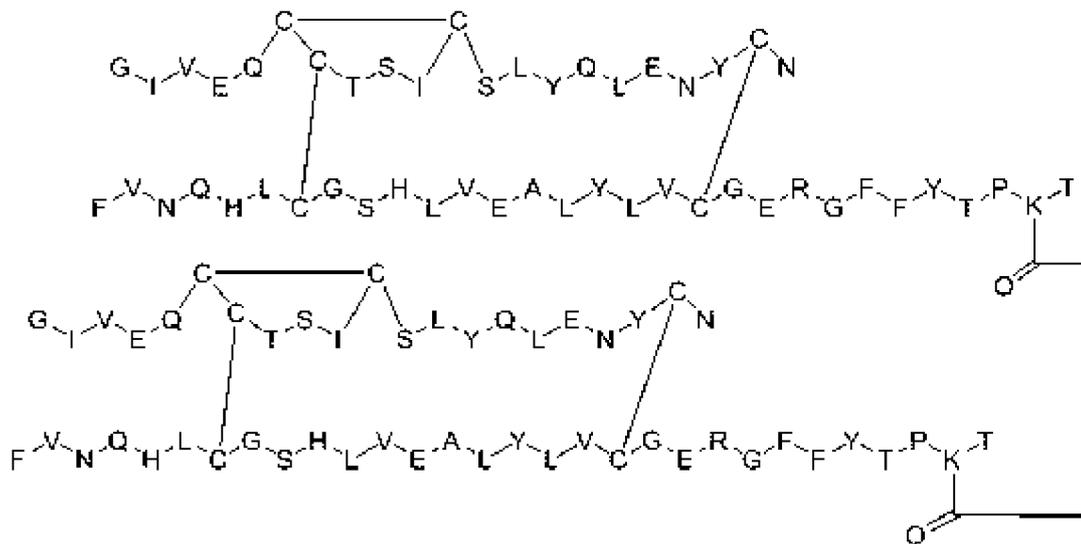
димера 5;



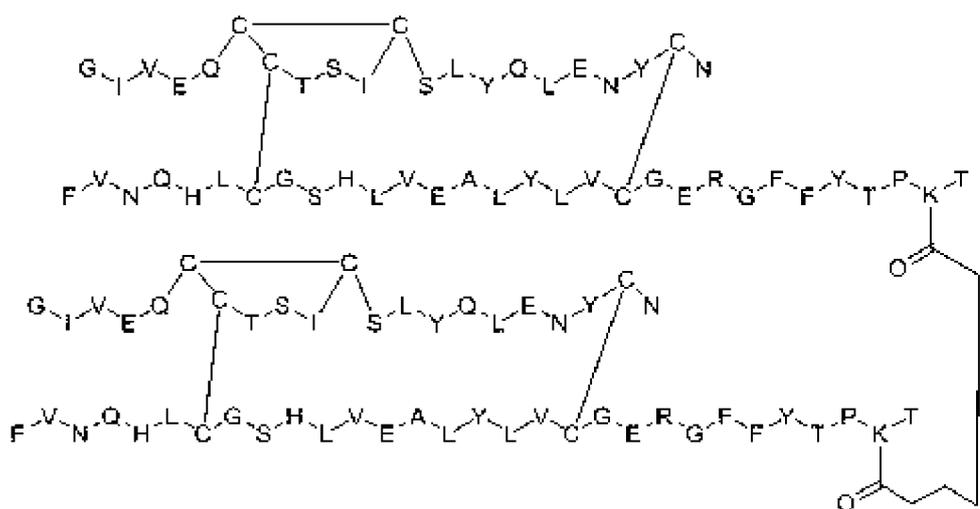
димера 6;



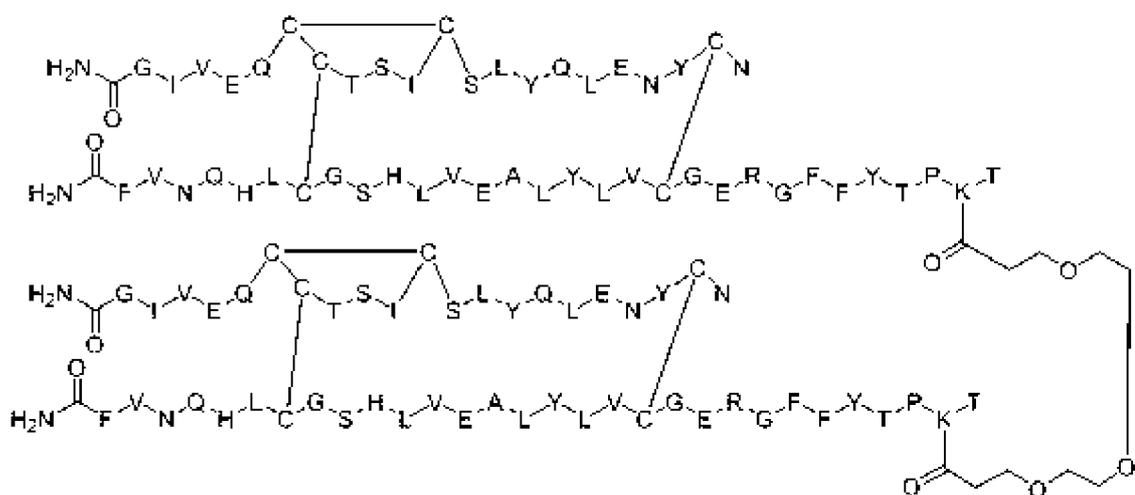
димера 7;



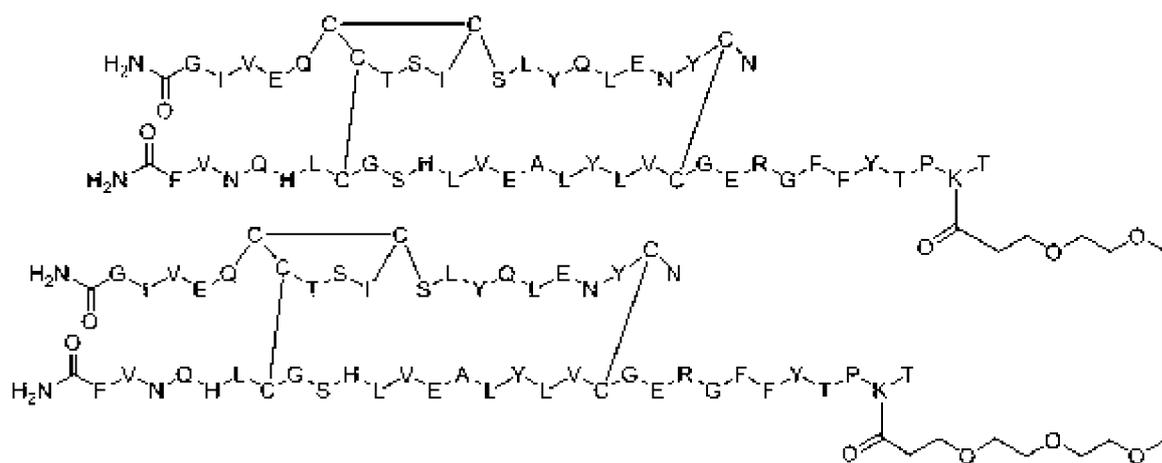
димера 8;



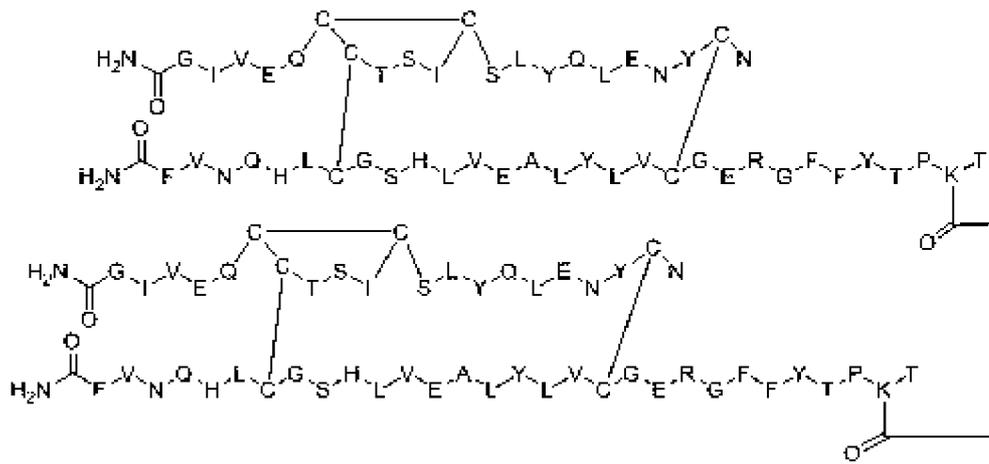
димера 9;



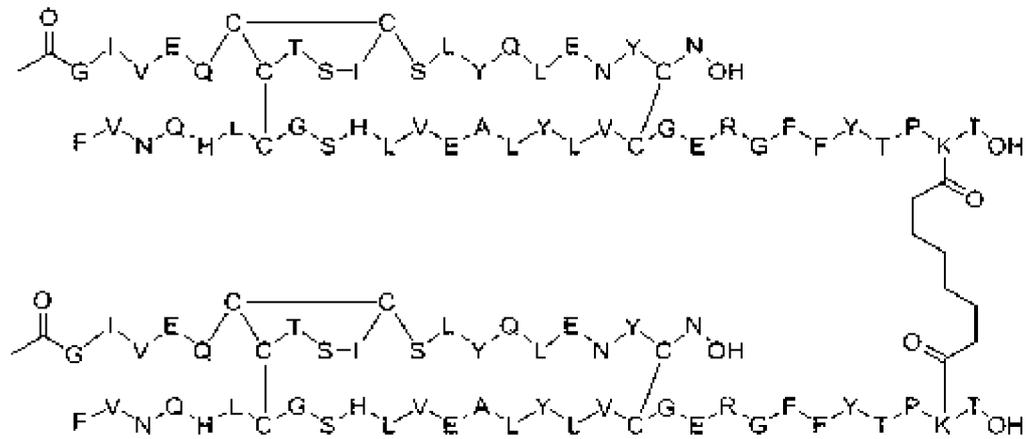
димера 10;



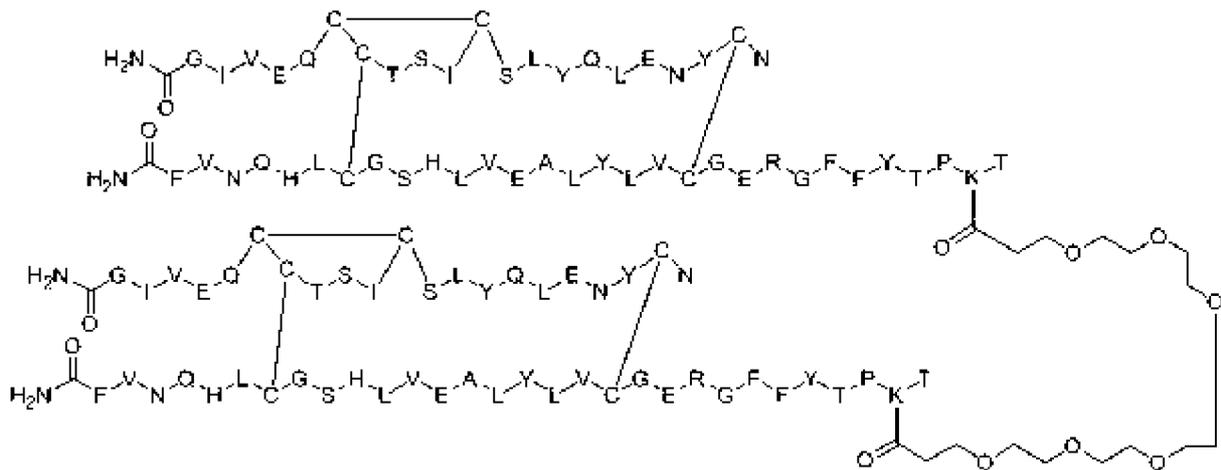
димера 11;



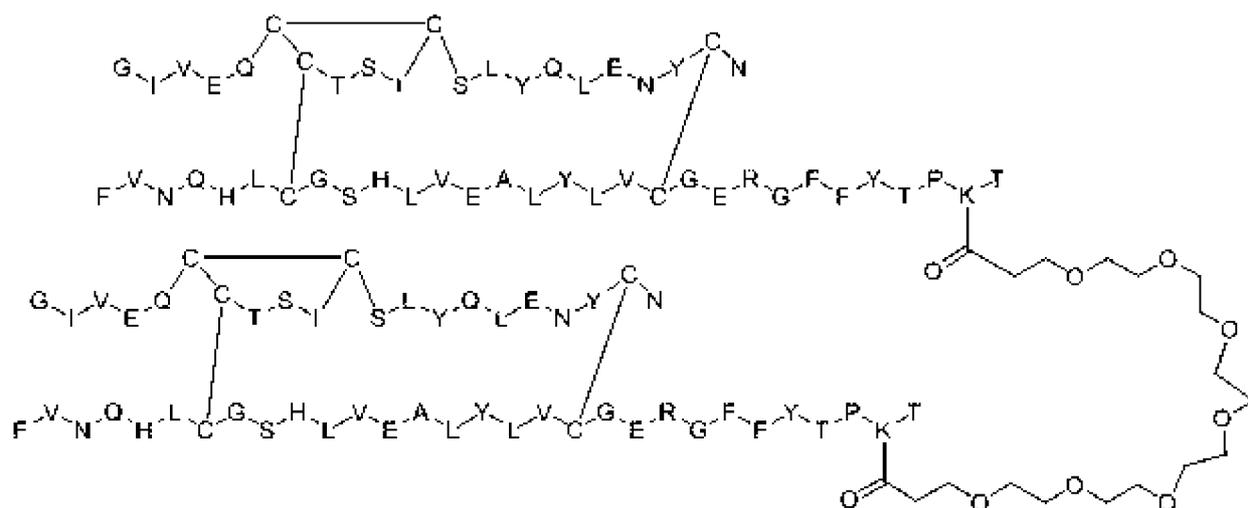
димера 12;



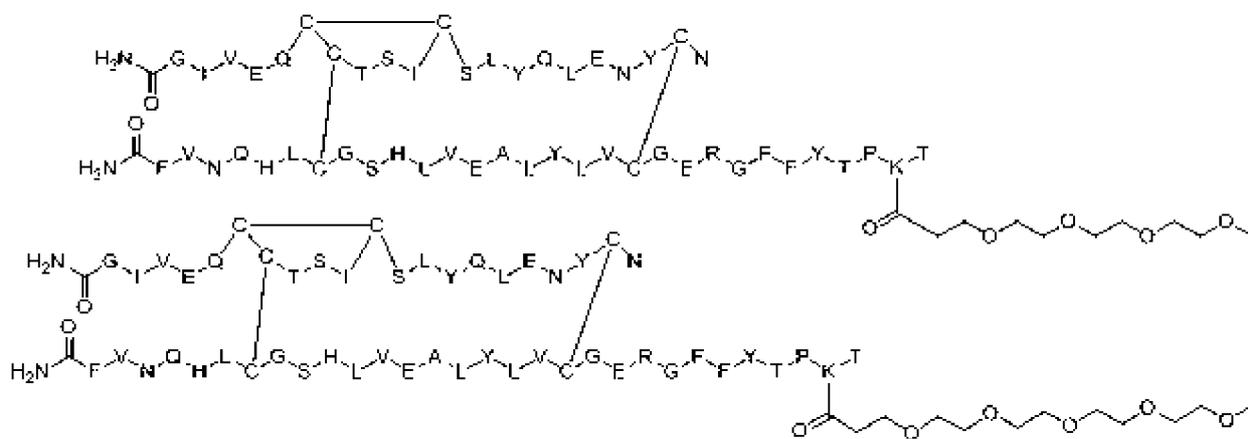
димера 13;



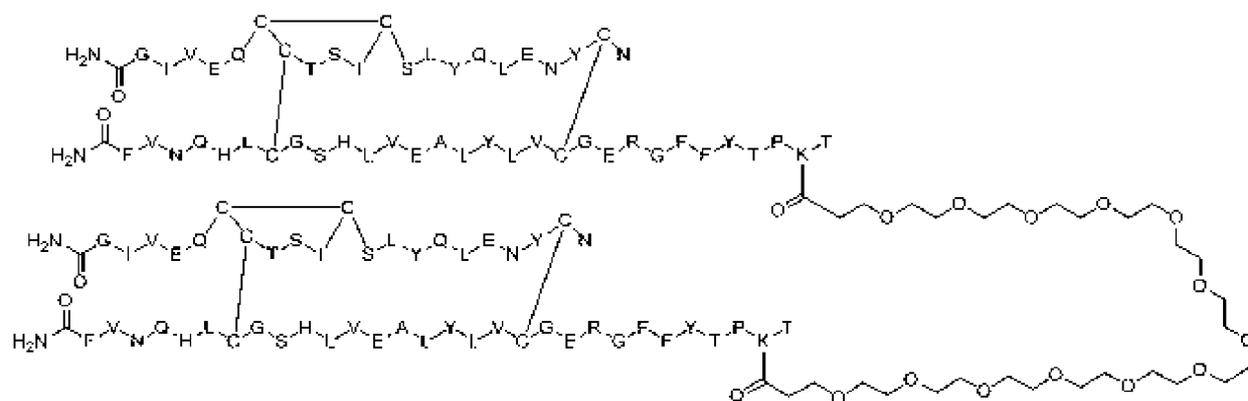
димера 14;



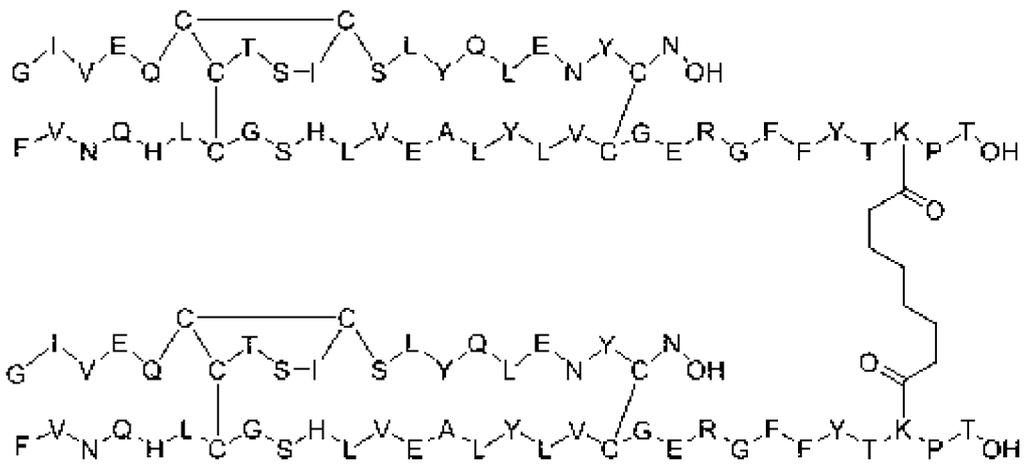
димера 15;



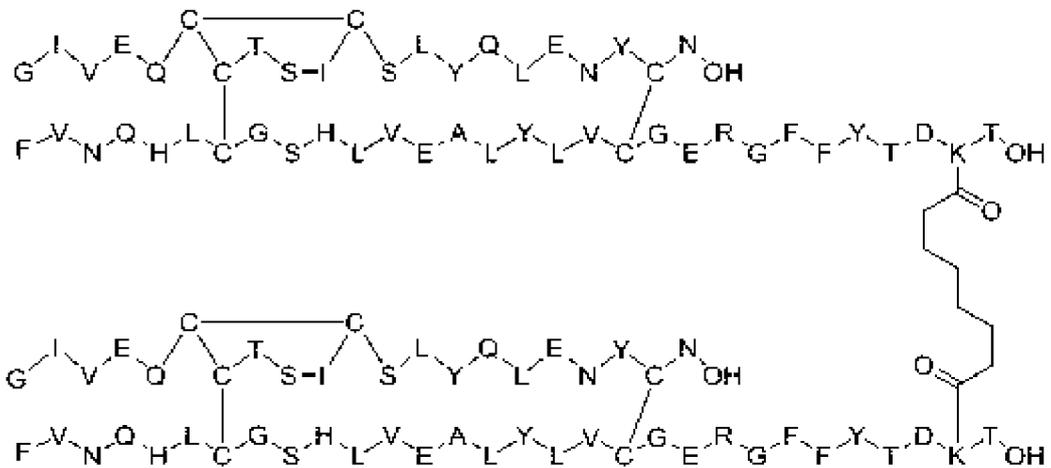
димера 16;



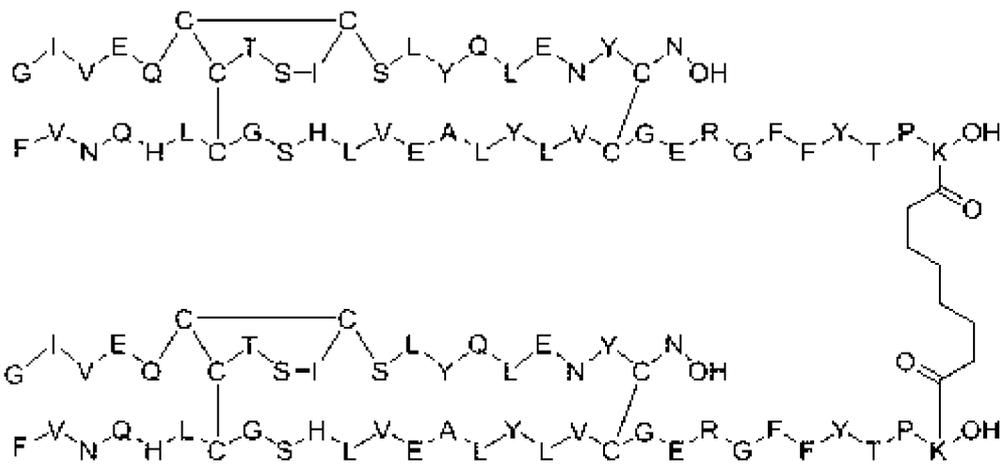
димера 17;



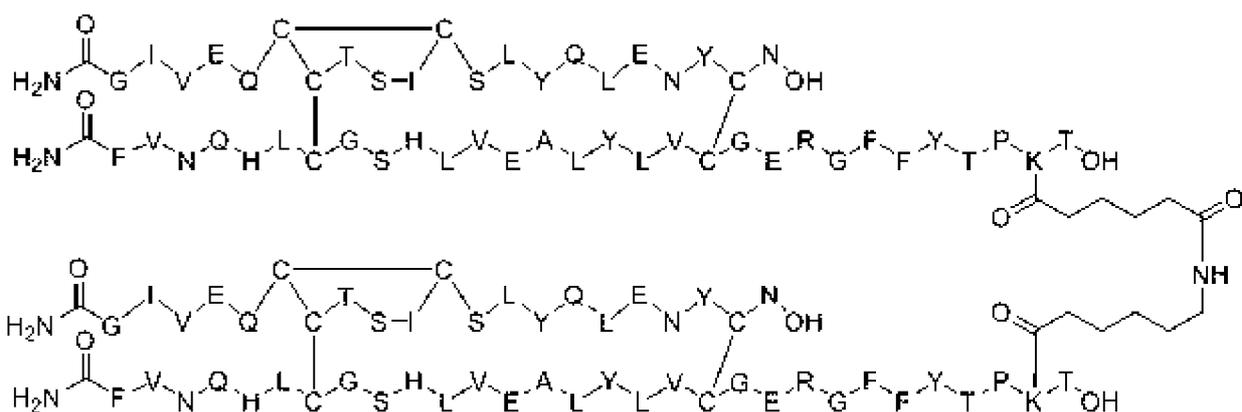
димера 18;



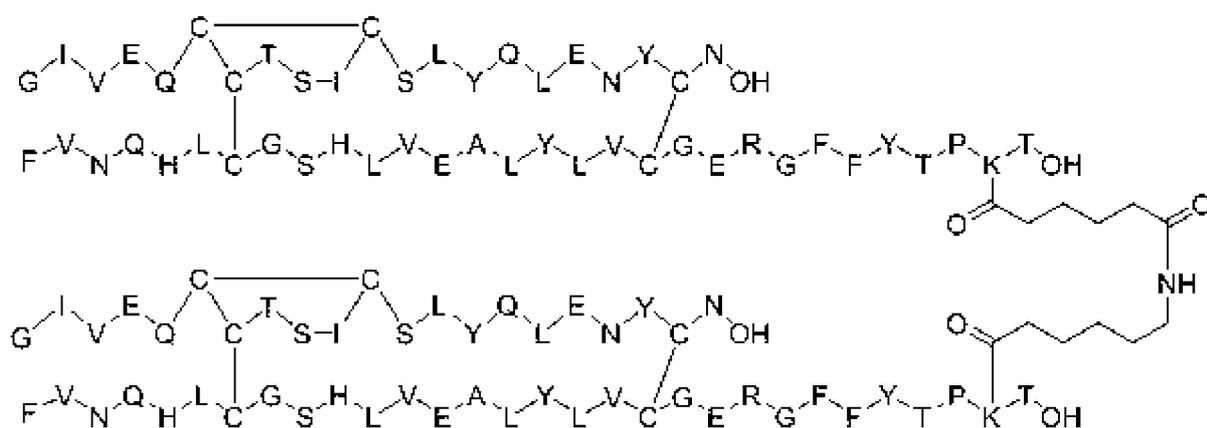
димера 19;



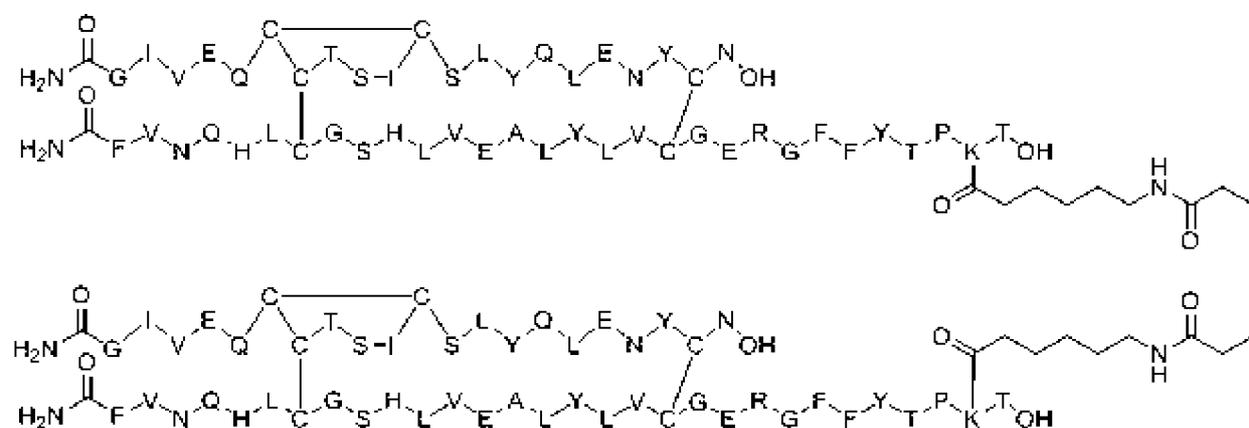
димера 20;



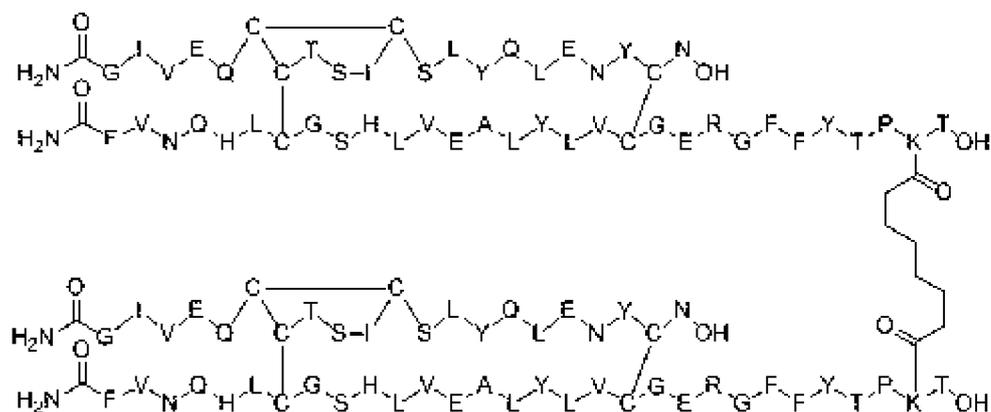
димера 21;



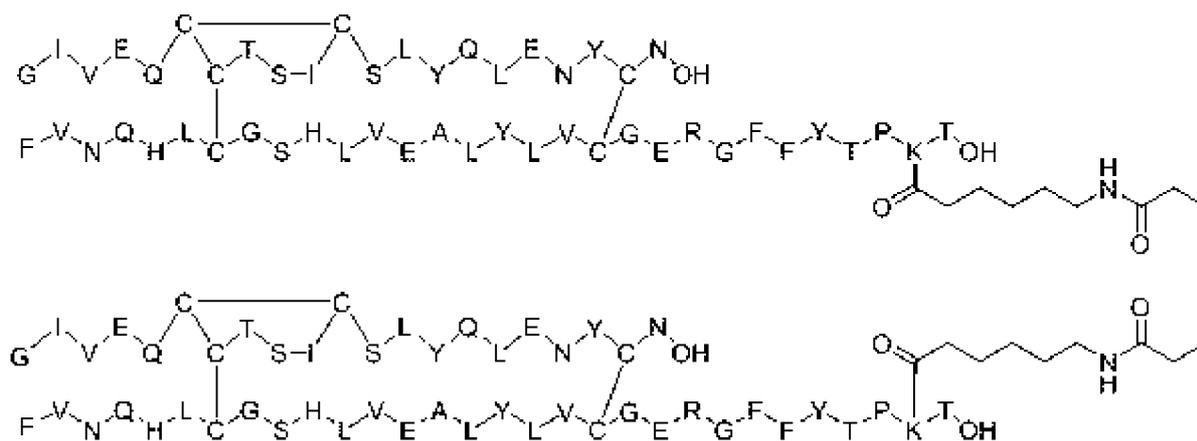
димера 22;



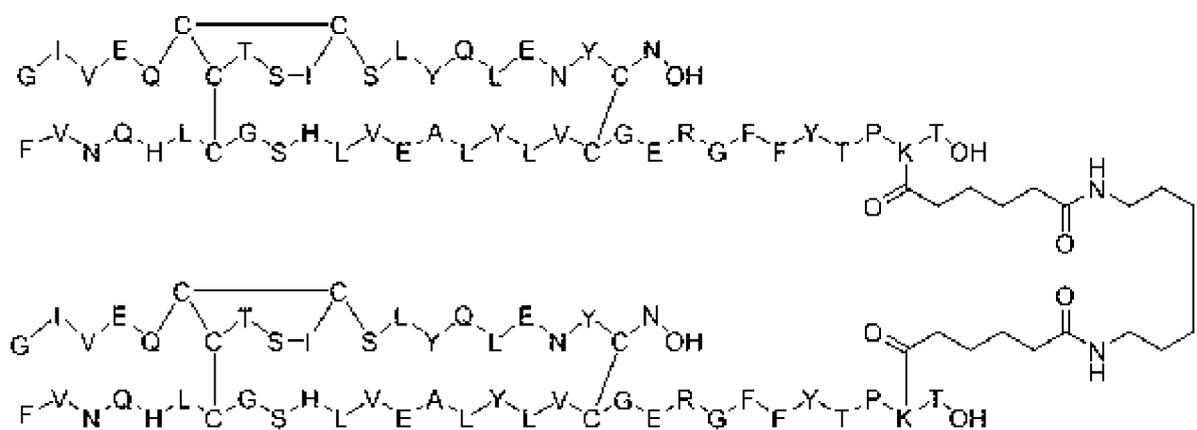
димера 23;



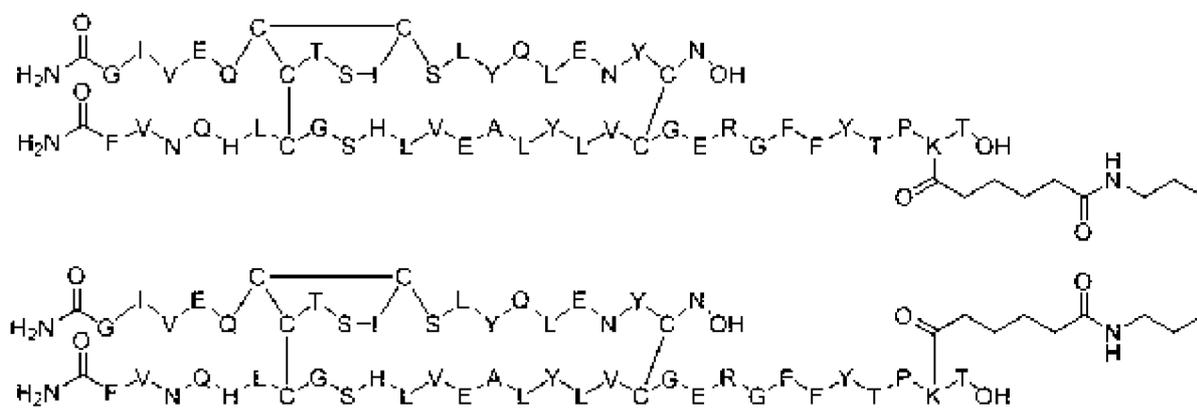
димера 24;



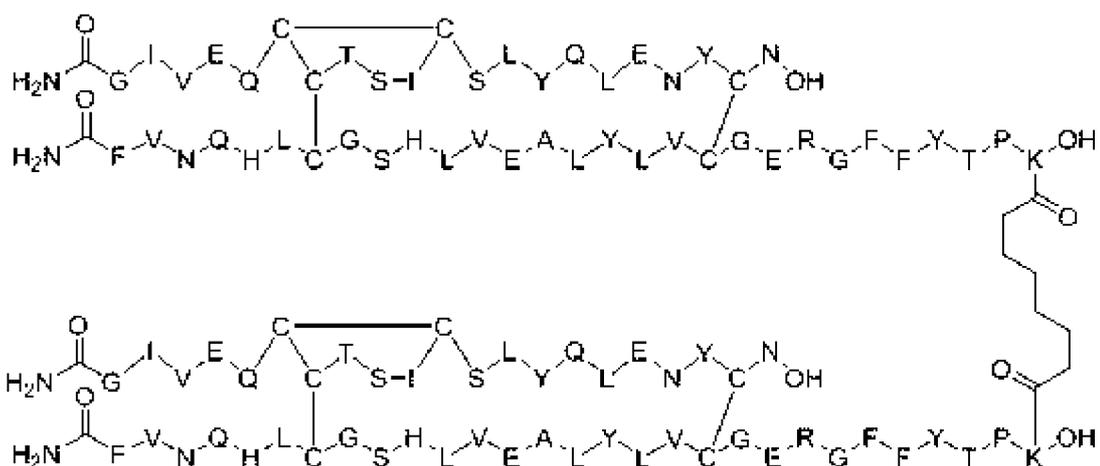
димера 25;



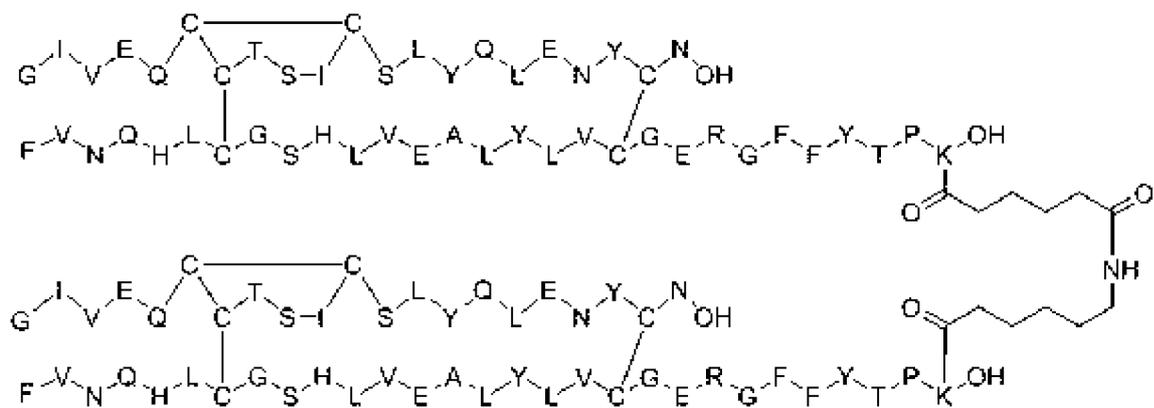
димера 26;



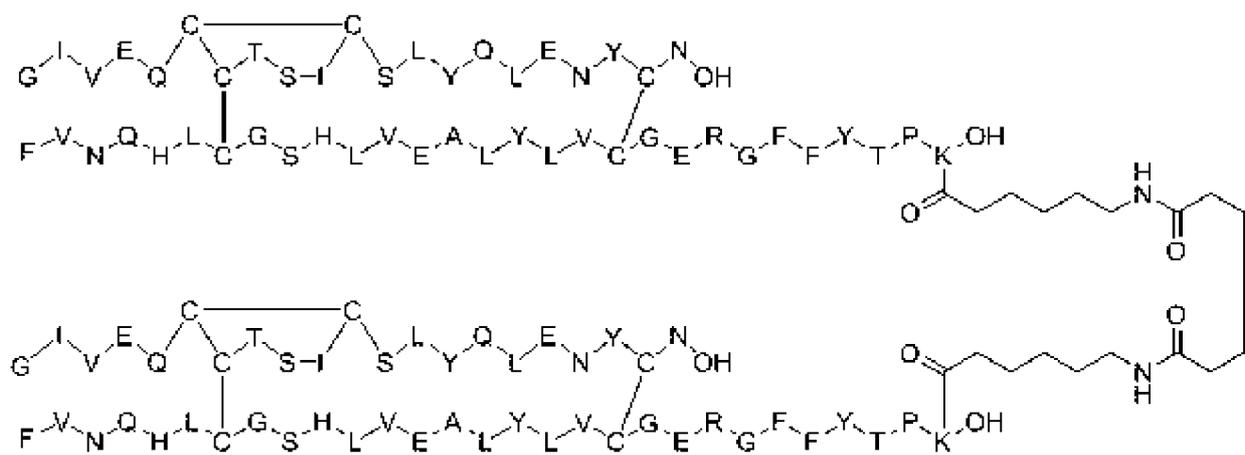
димера 27;



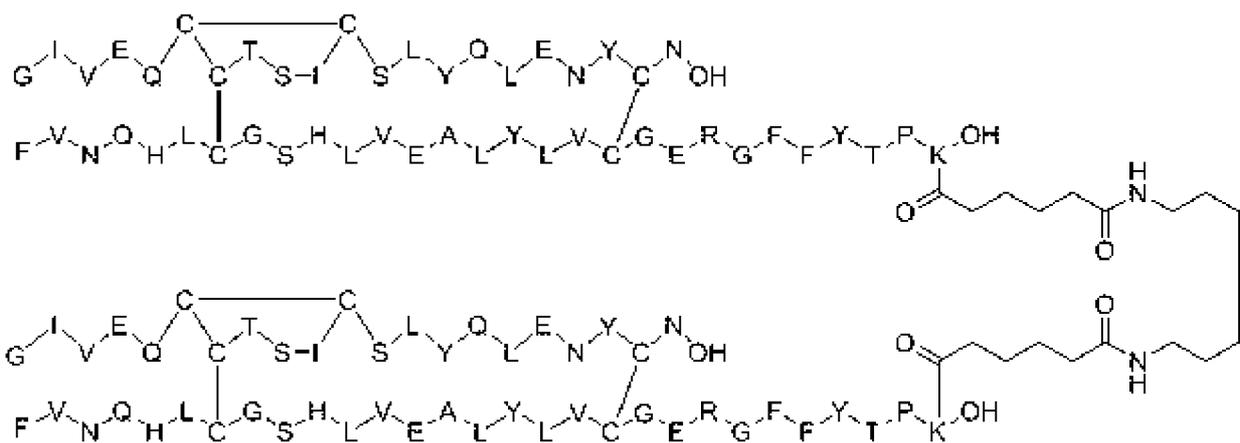
димера 28;



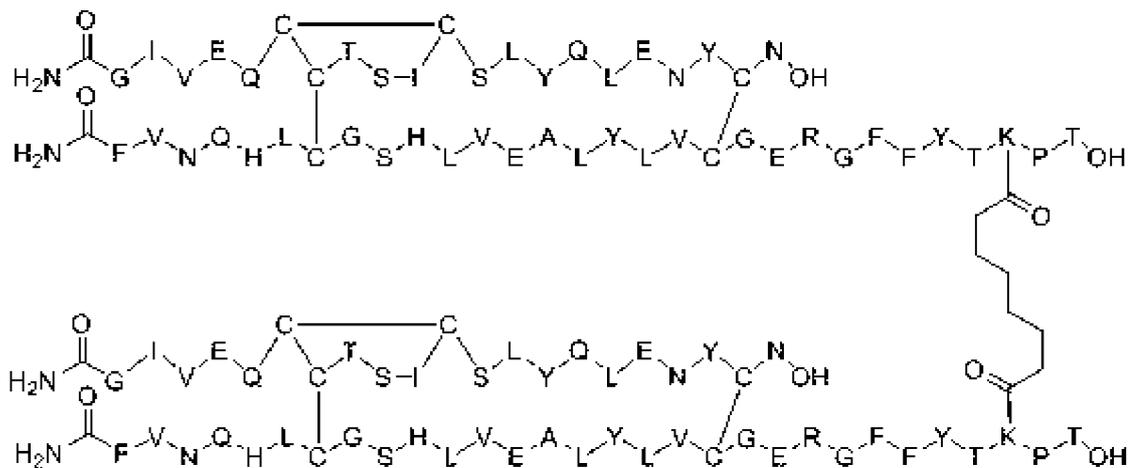
димера 29;



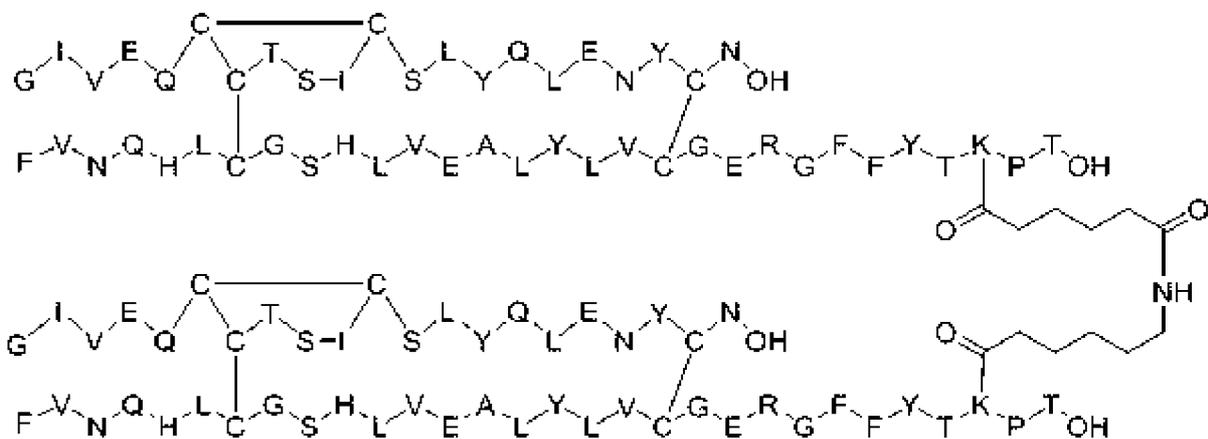
димера 30;



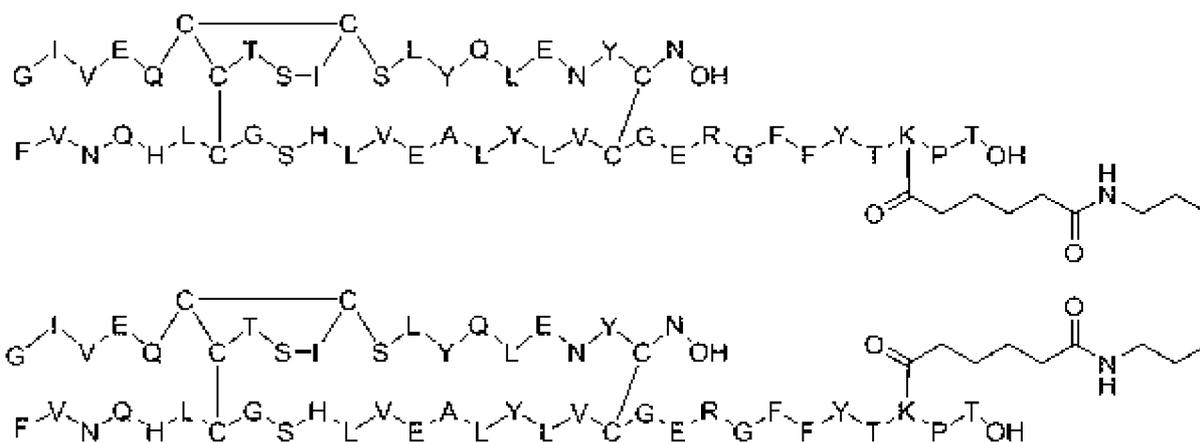
димера 31;



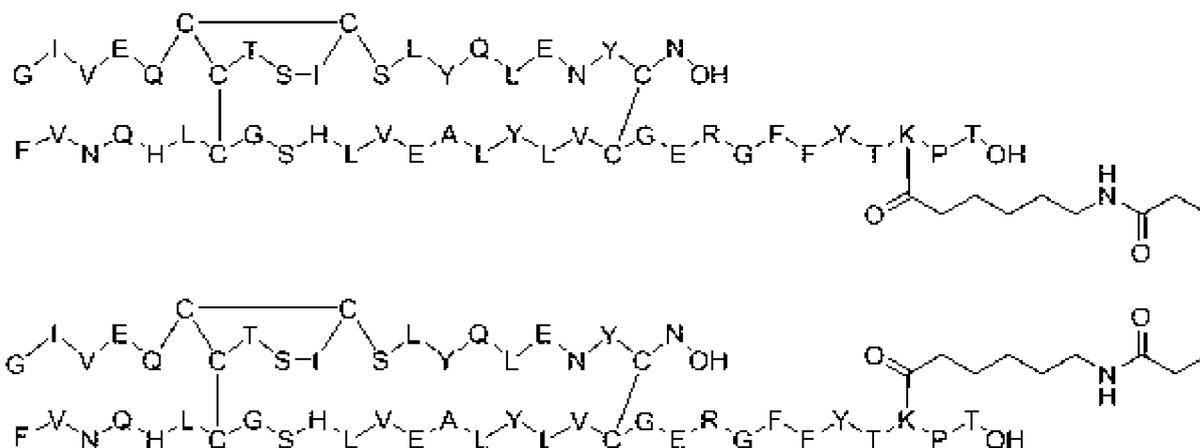
димера 32;



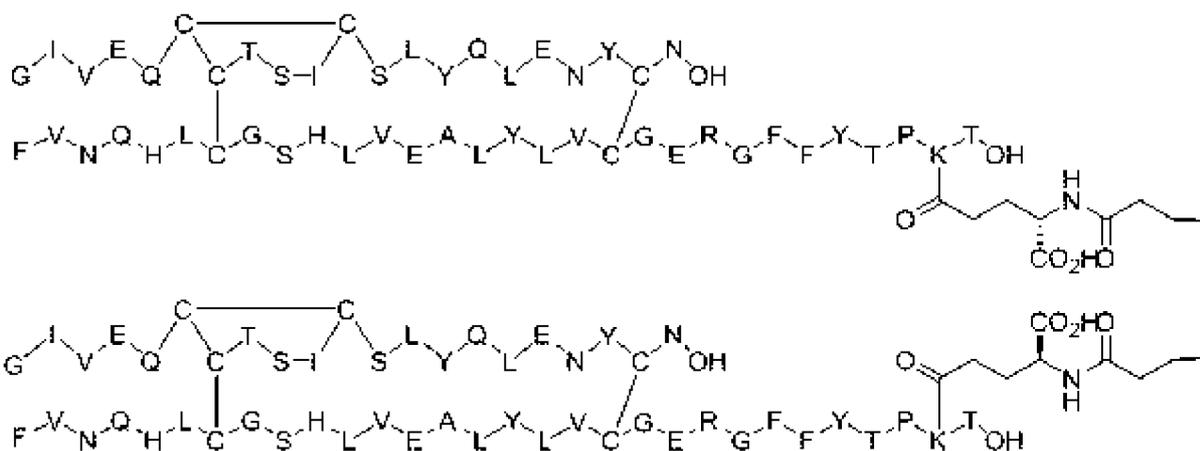
димера 33;



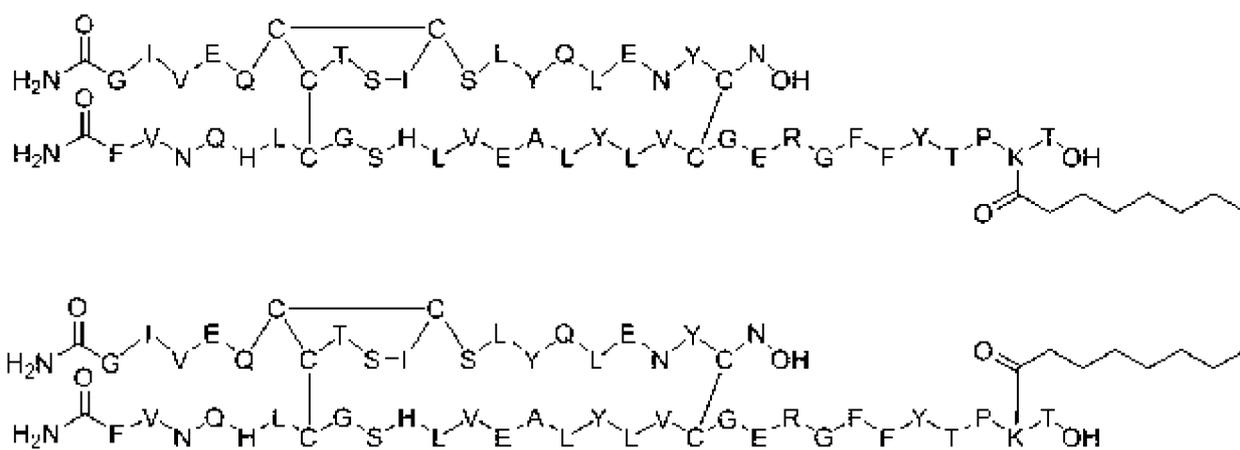
димера 34;



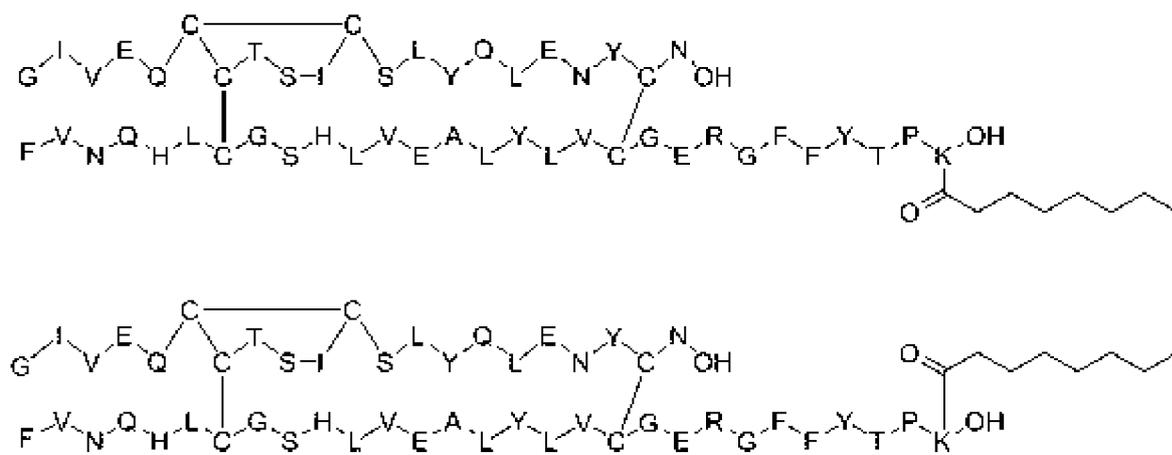
димера 35;



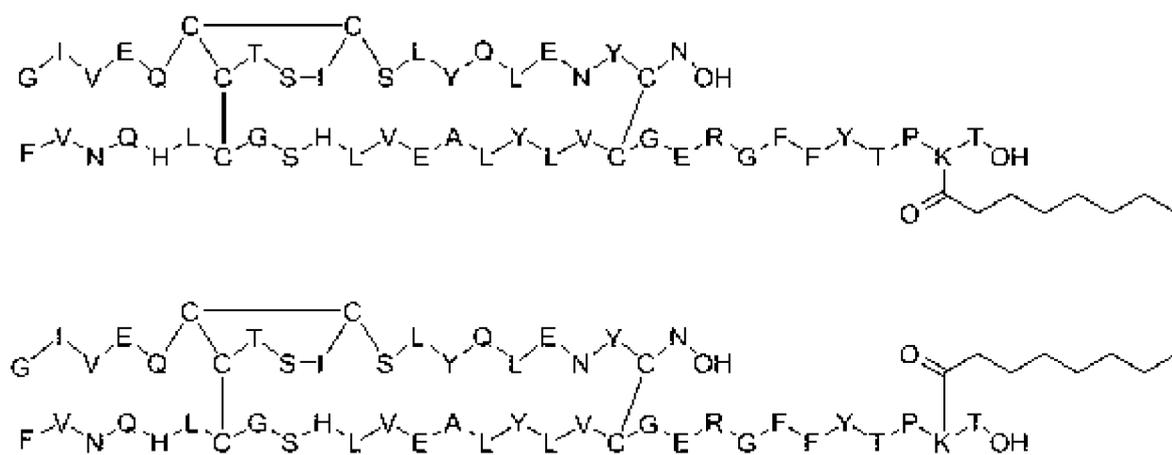
димера 36;



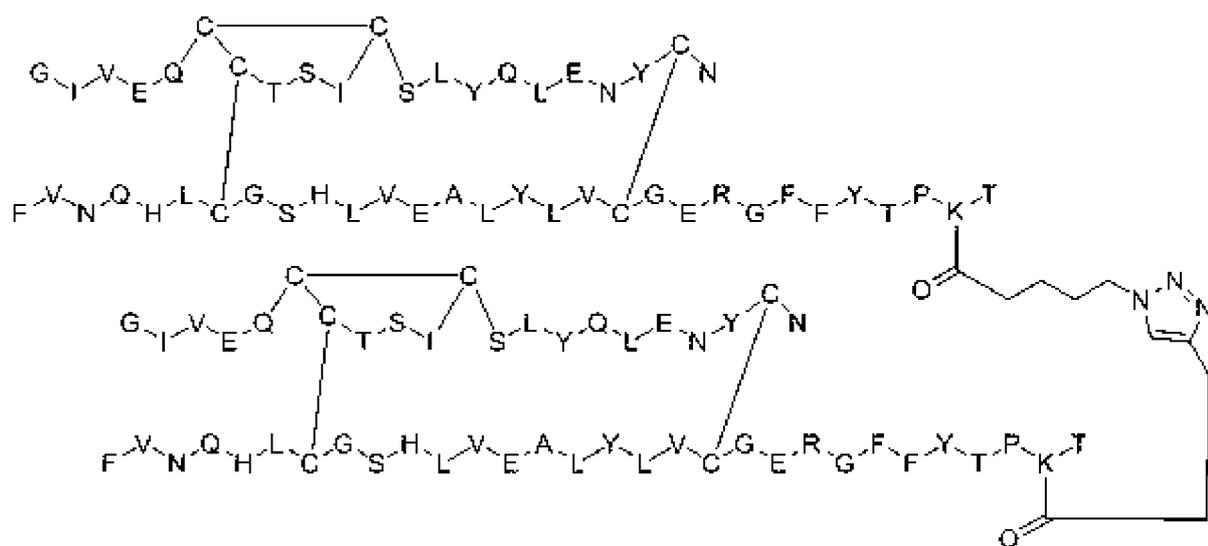
димера 37;



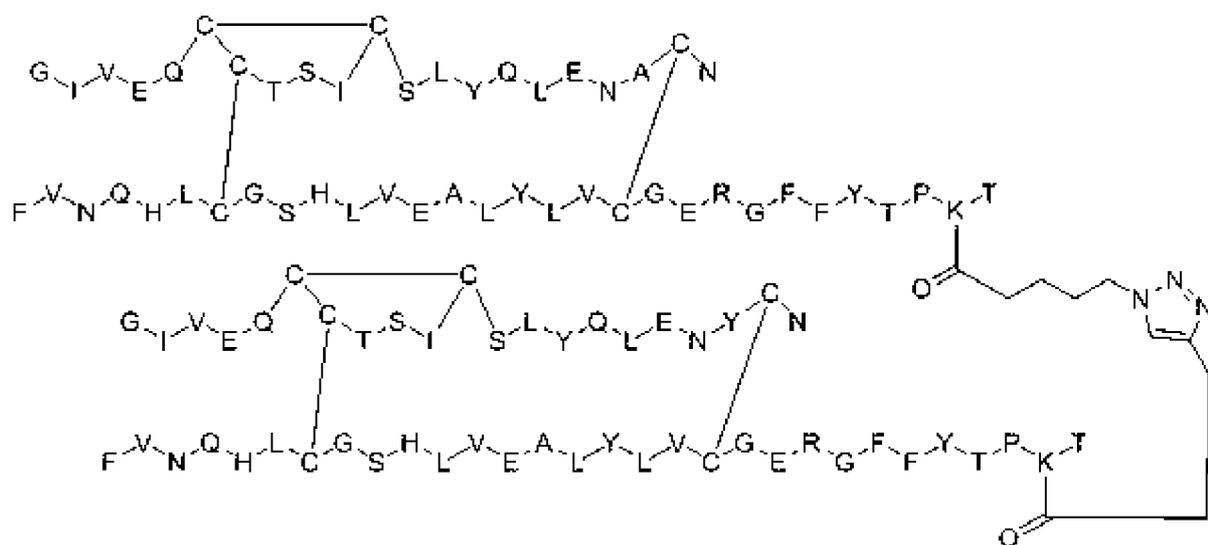
димера 38;



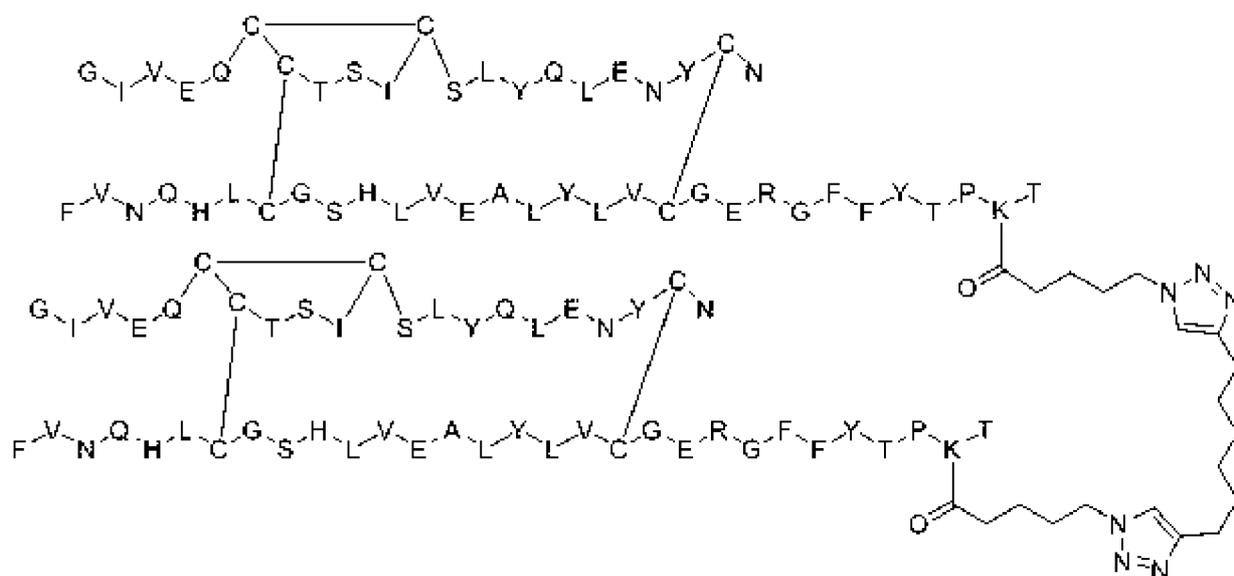
димера 39;



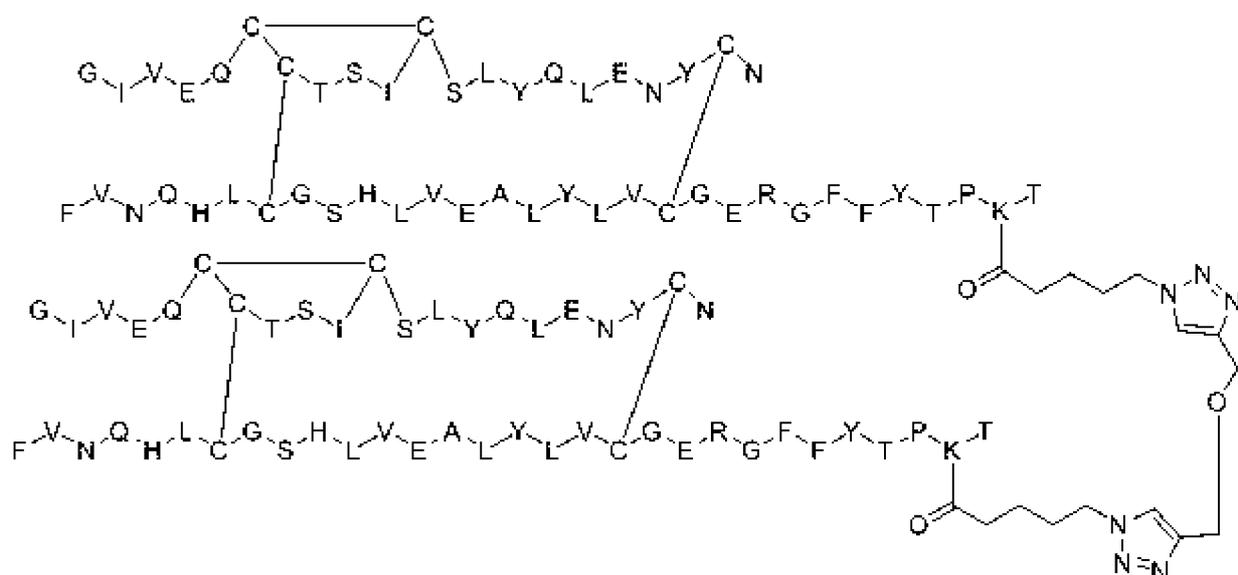
димера 40;



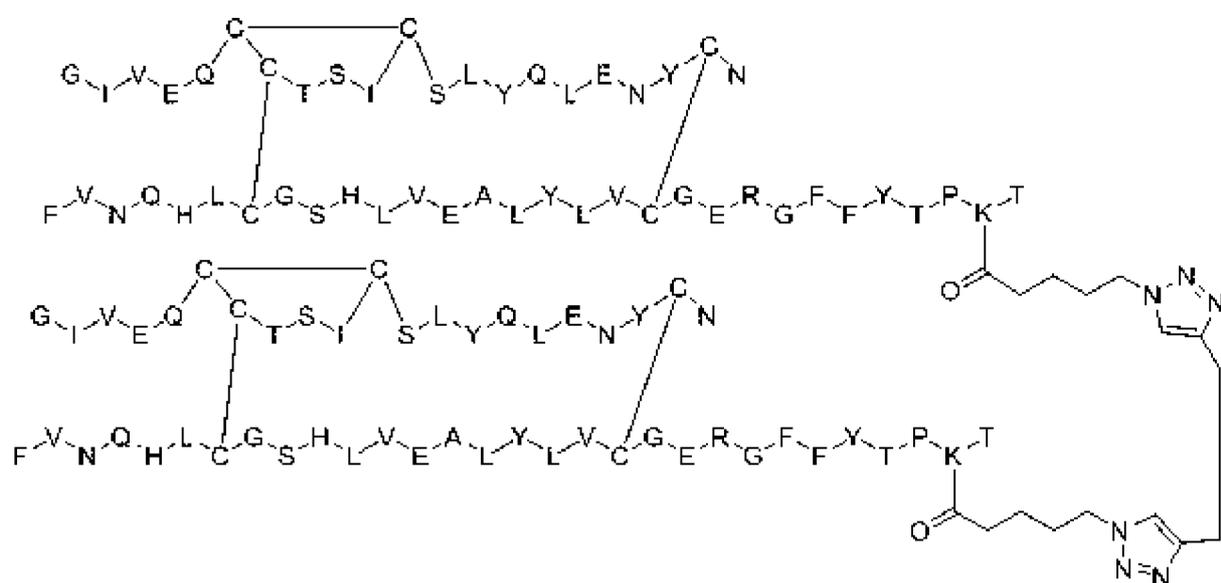
димера 41;



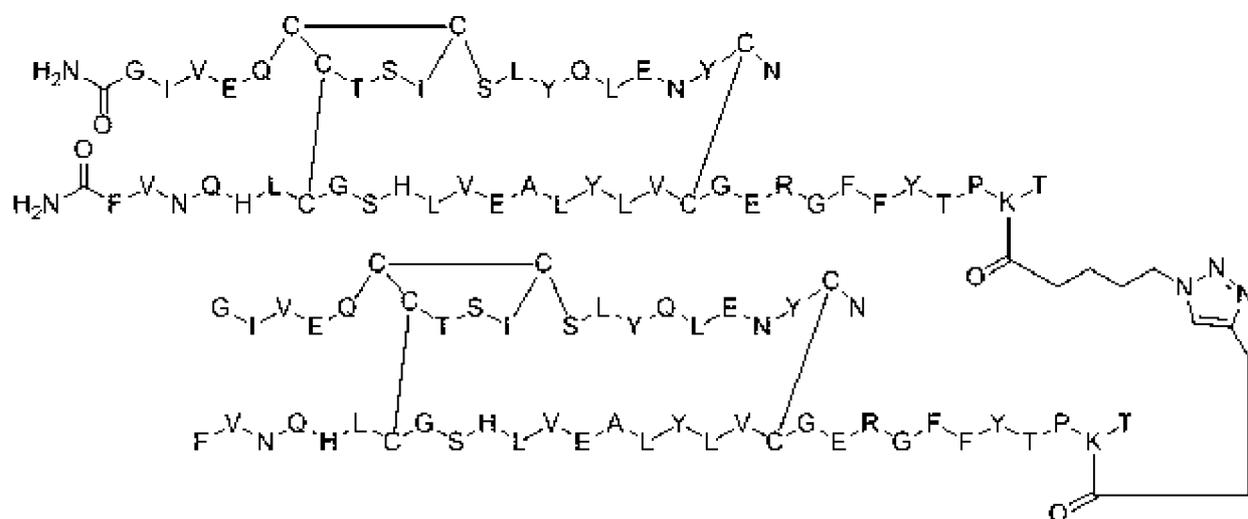
димера 42;



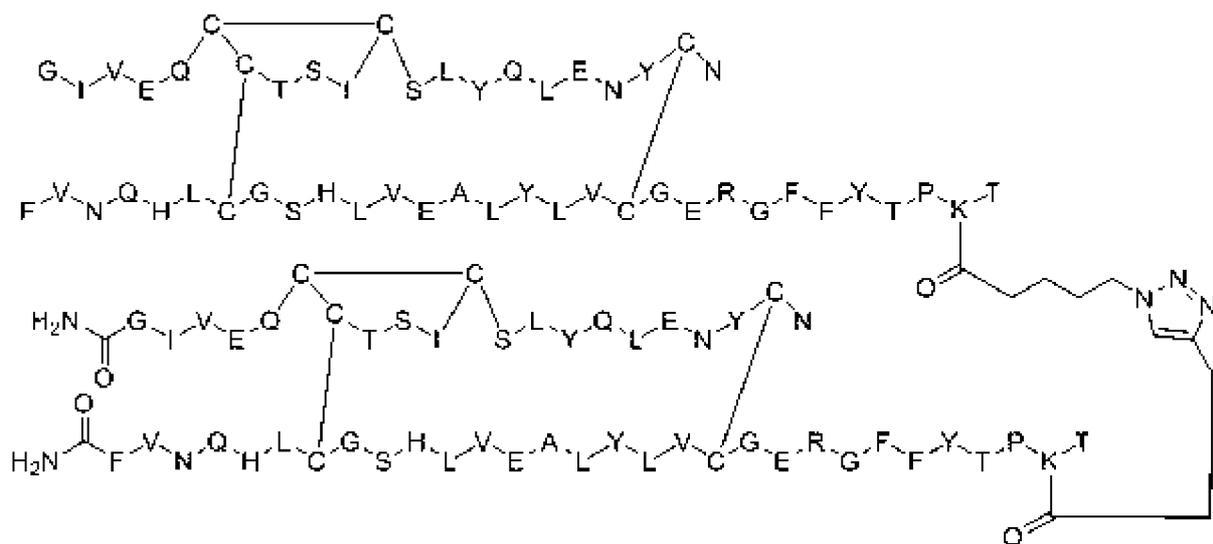
димера 43;



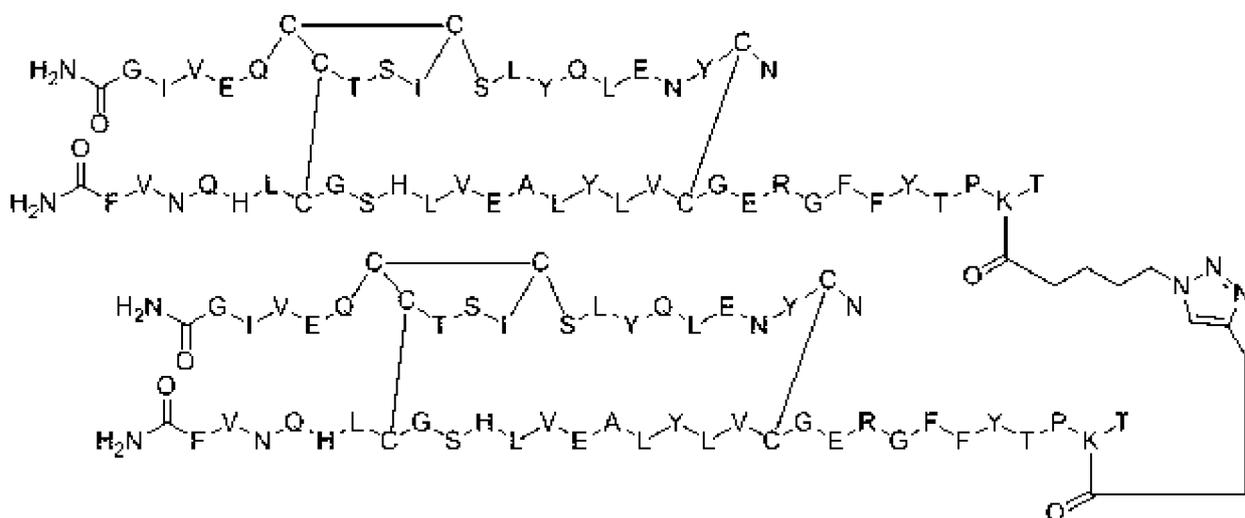
димера 44;



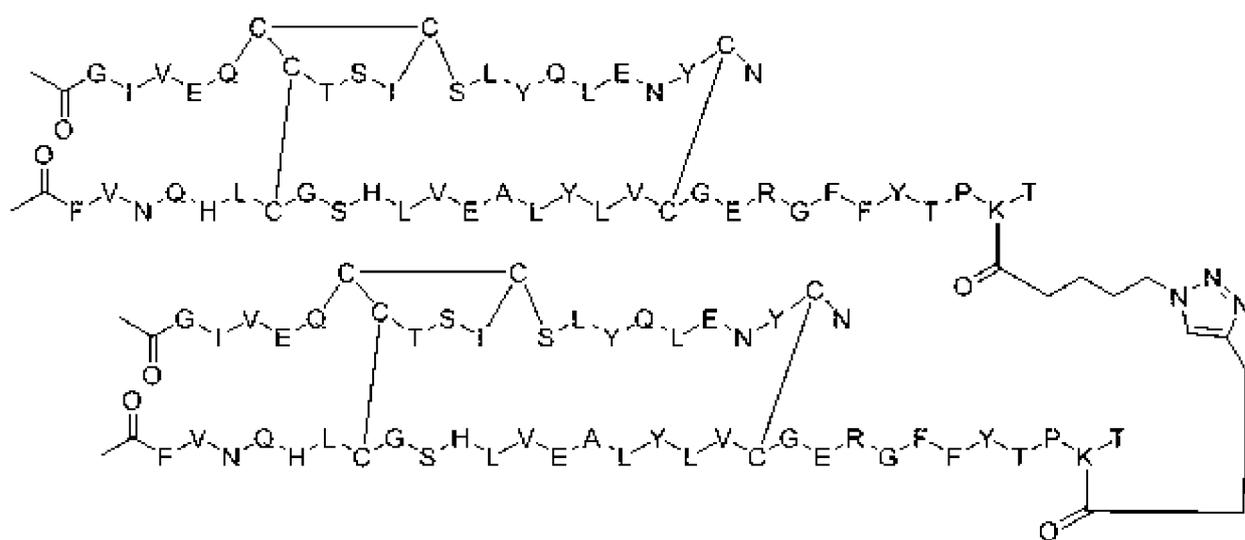
димера 45;



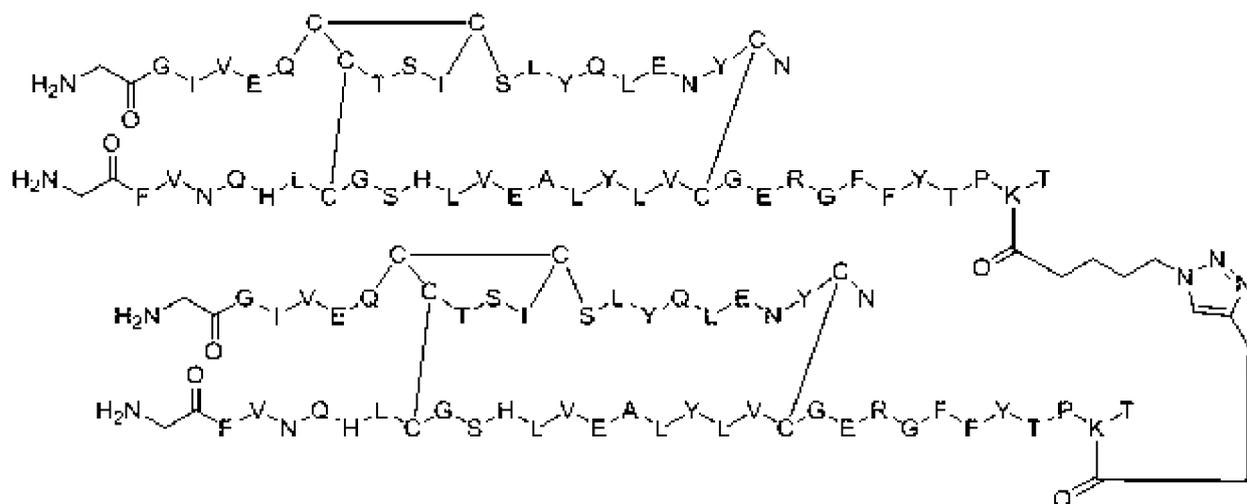
димера 46;



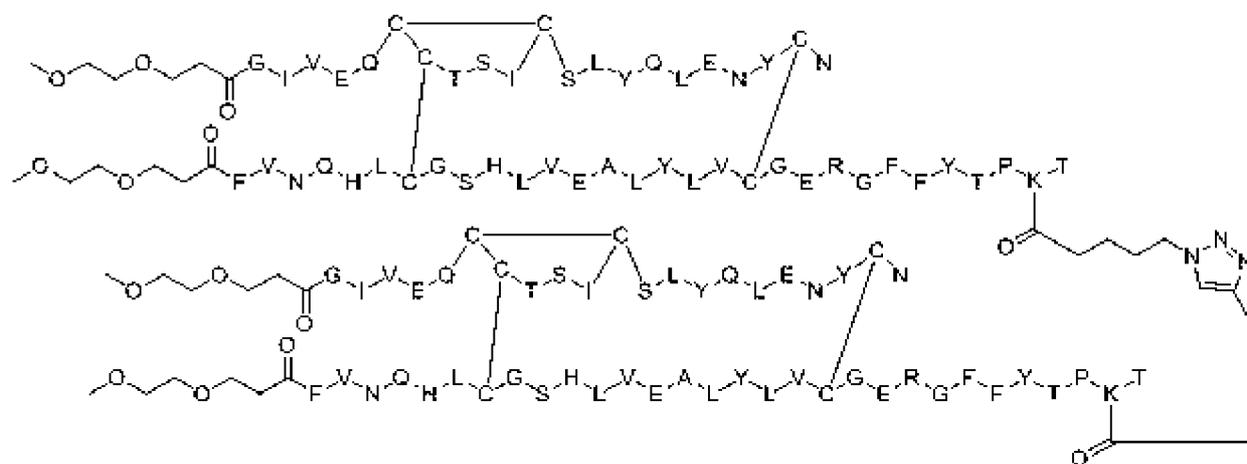
димера 47;



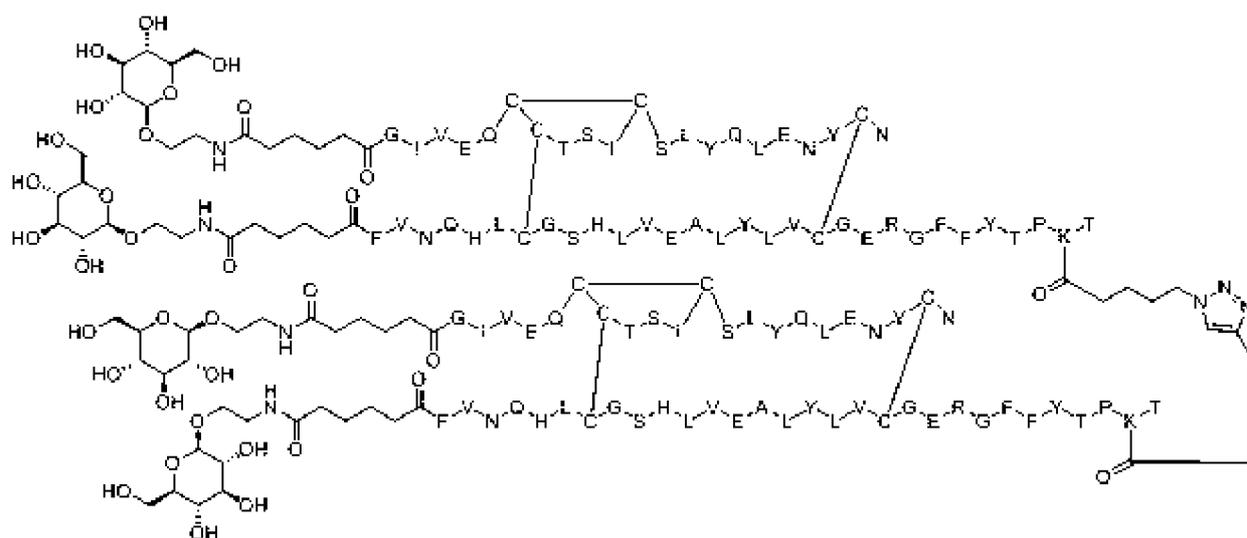
димера 48;



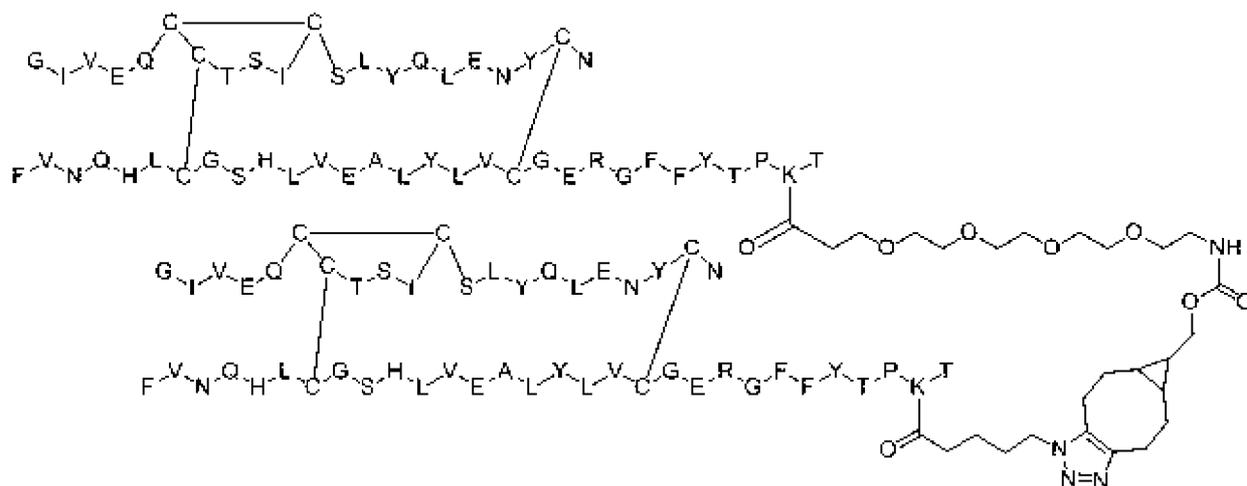
димера 49;



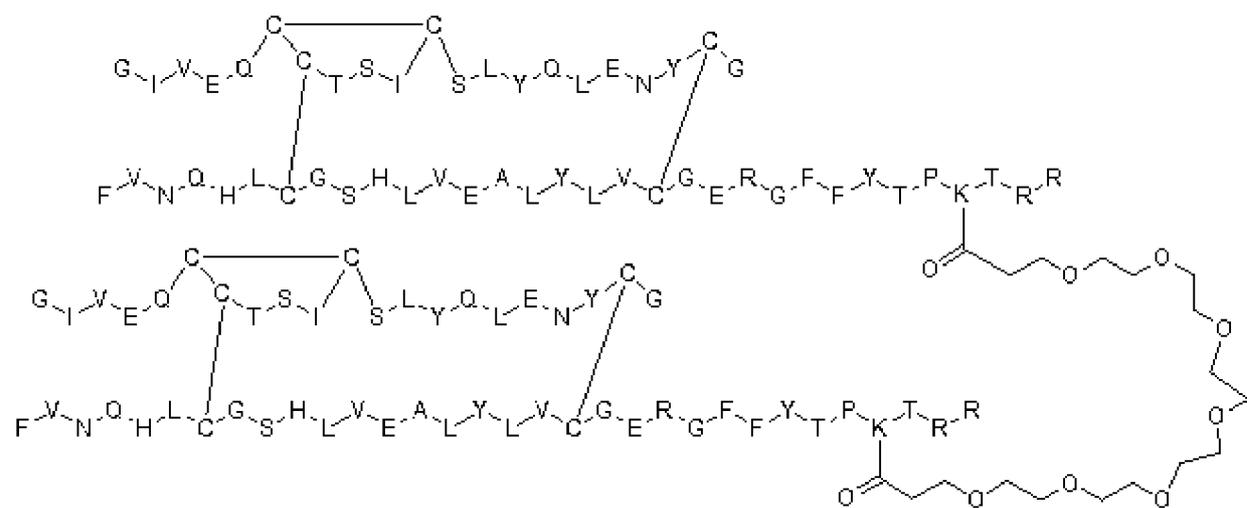
димера 50;



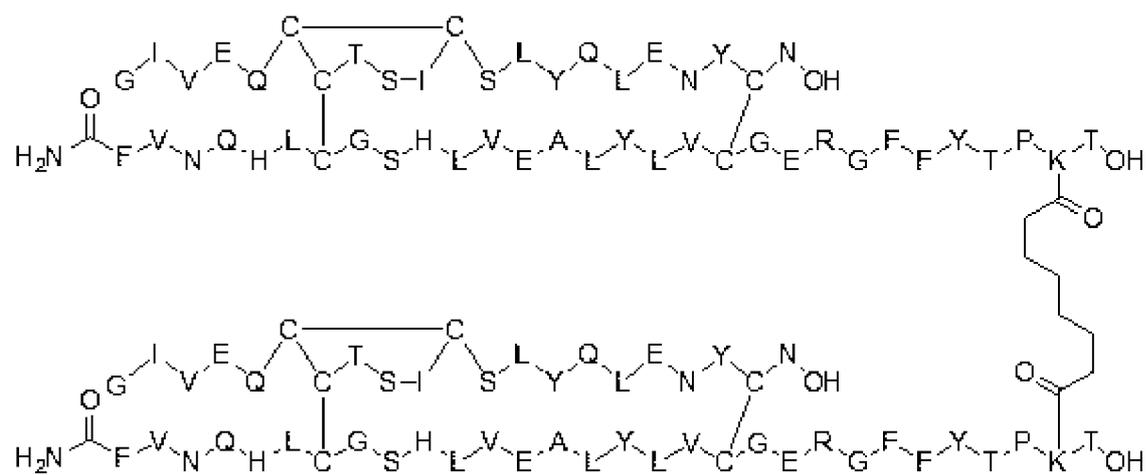
димера 51;



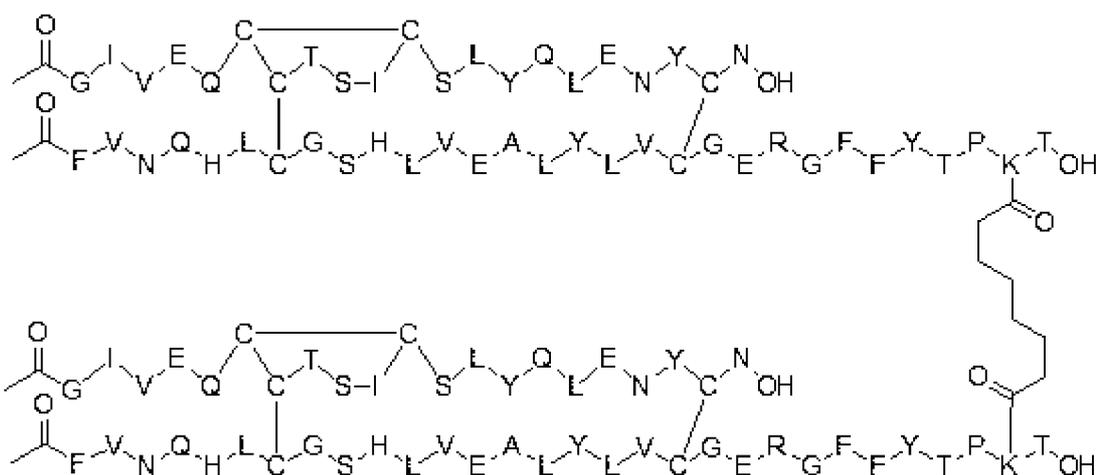
димера 52;



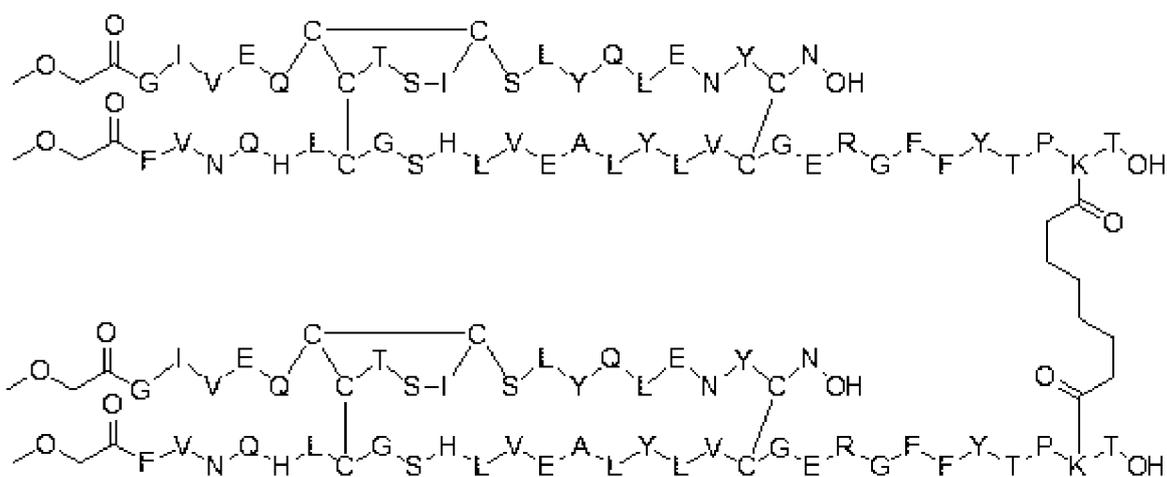
димера 53;



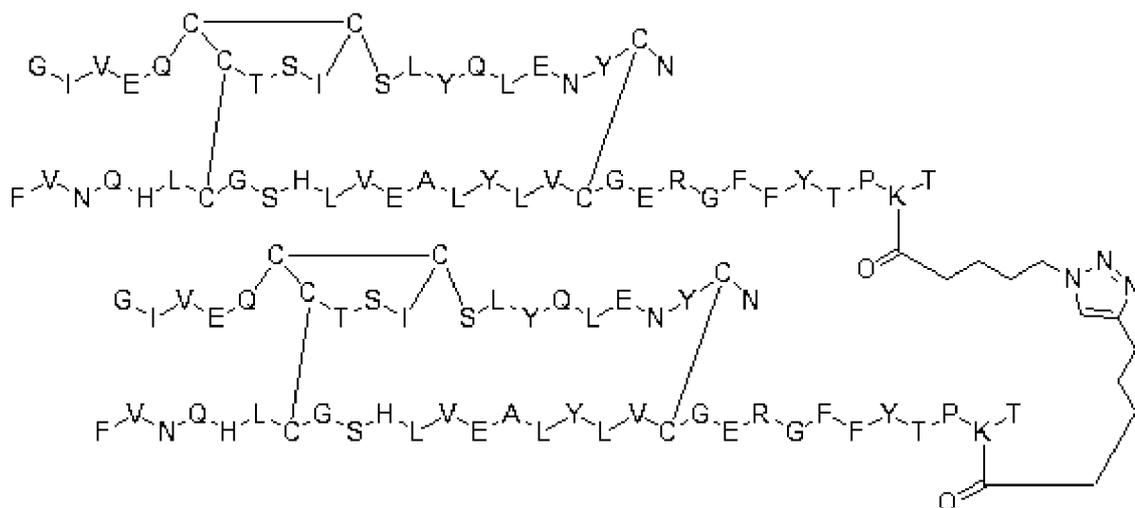
димера 54;



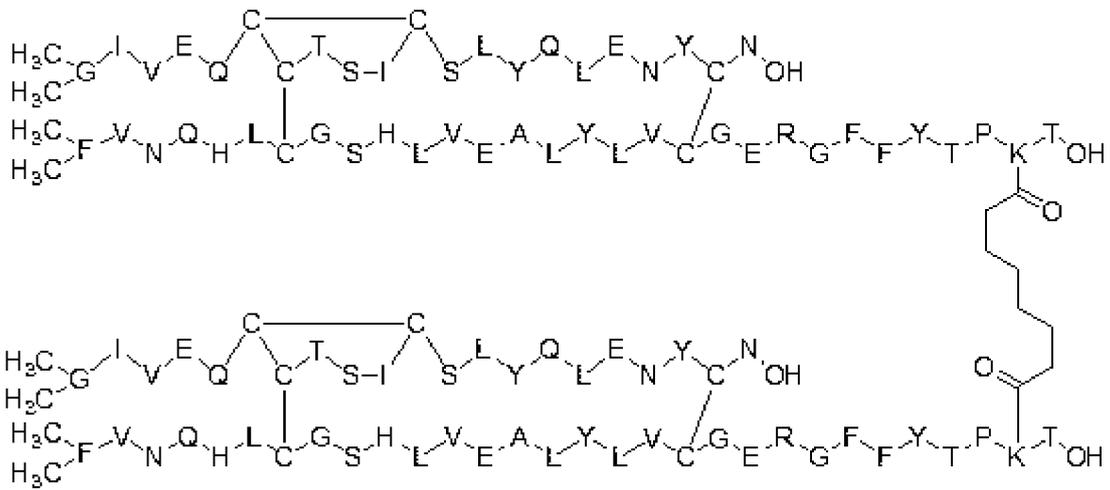
димера 55;



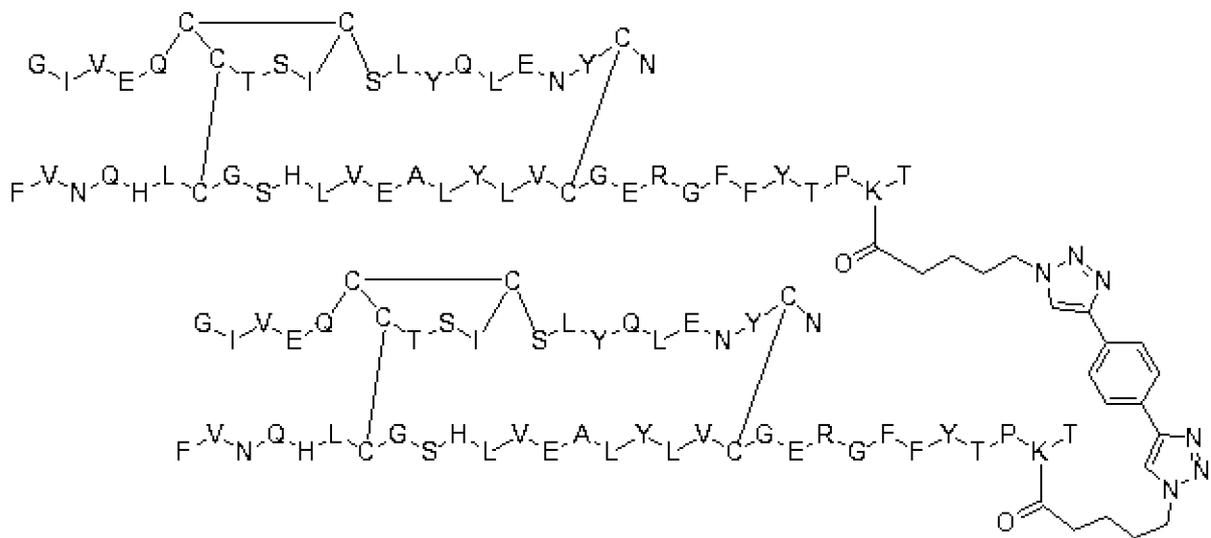
димера 56;



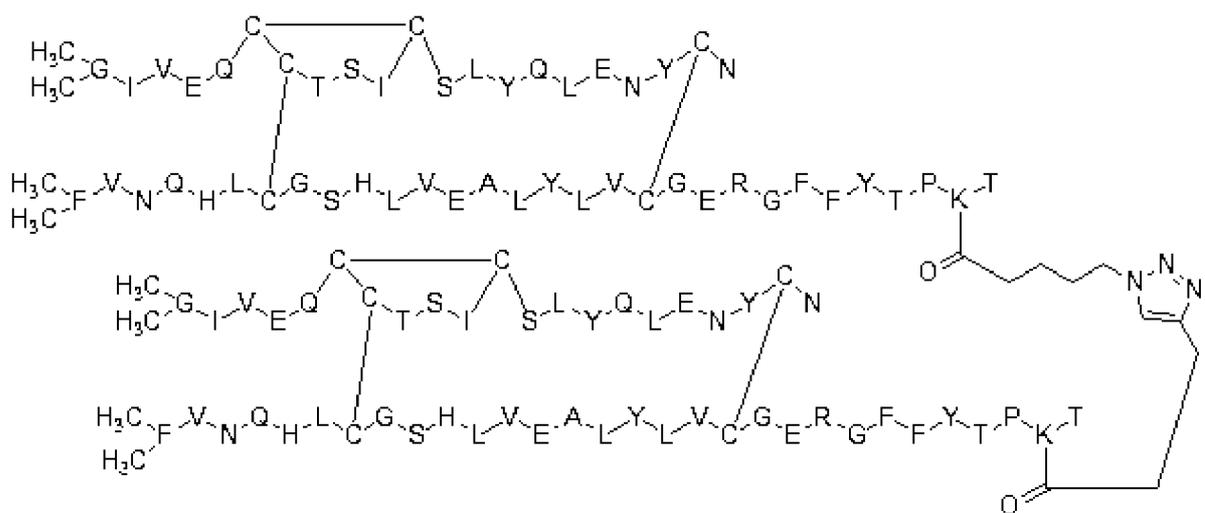
димера 57;



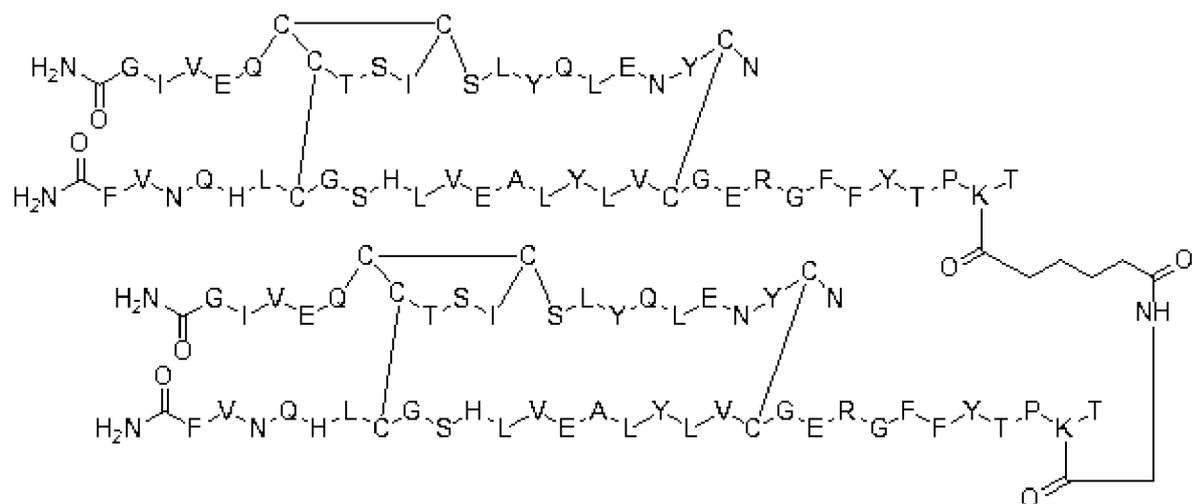
димера 58;



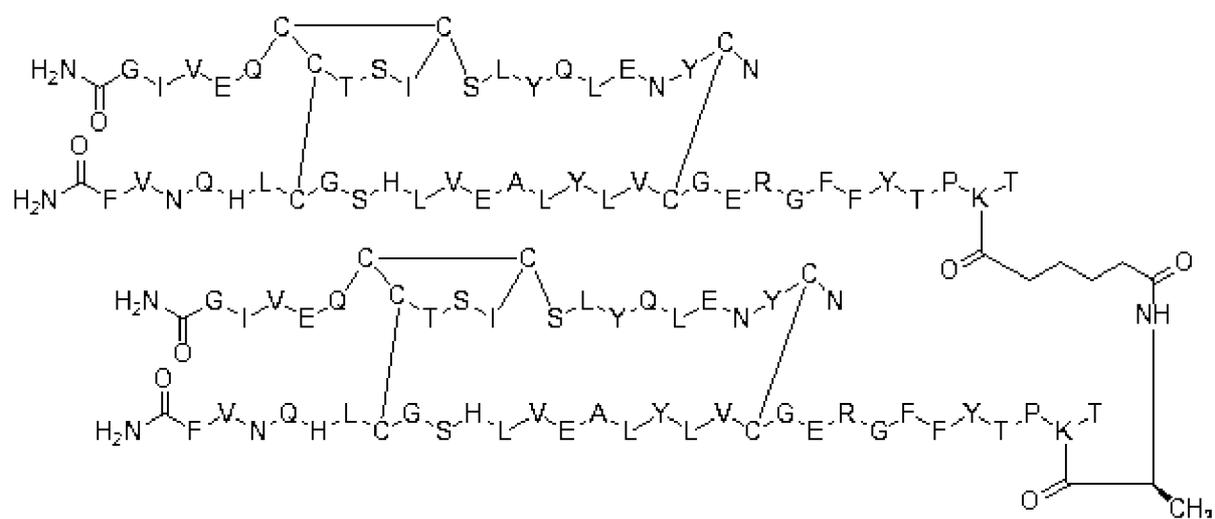
димера 59;



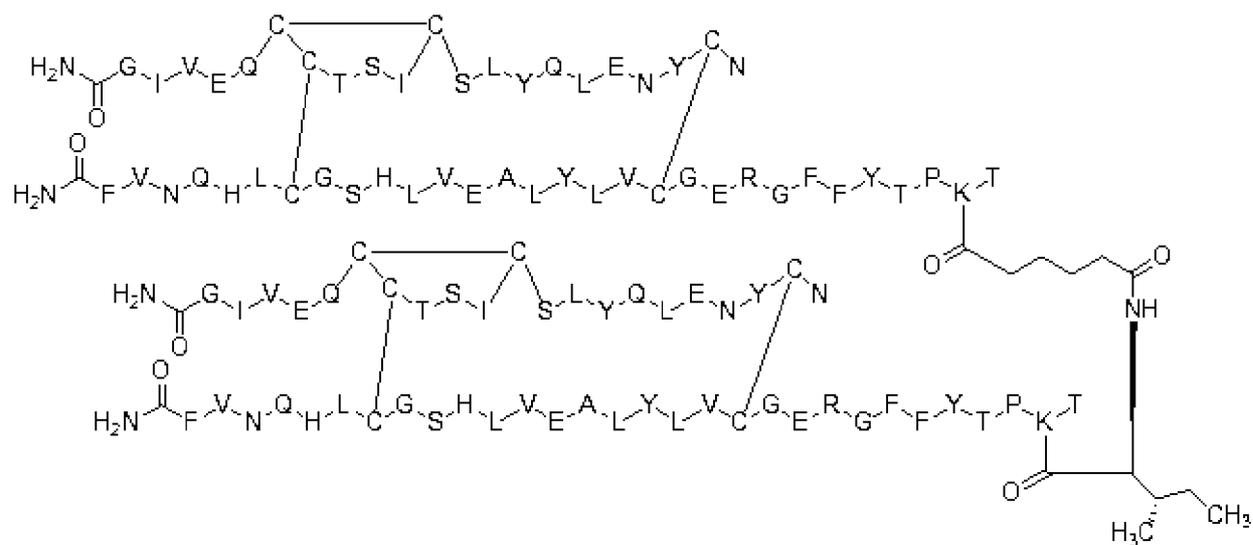
димера 60;



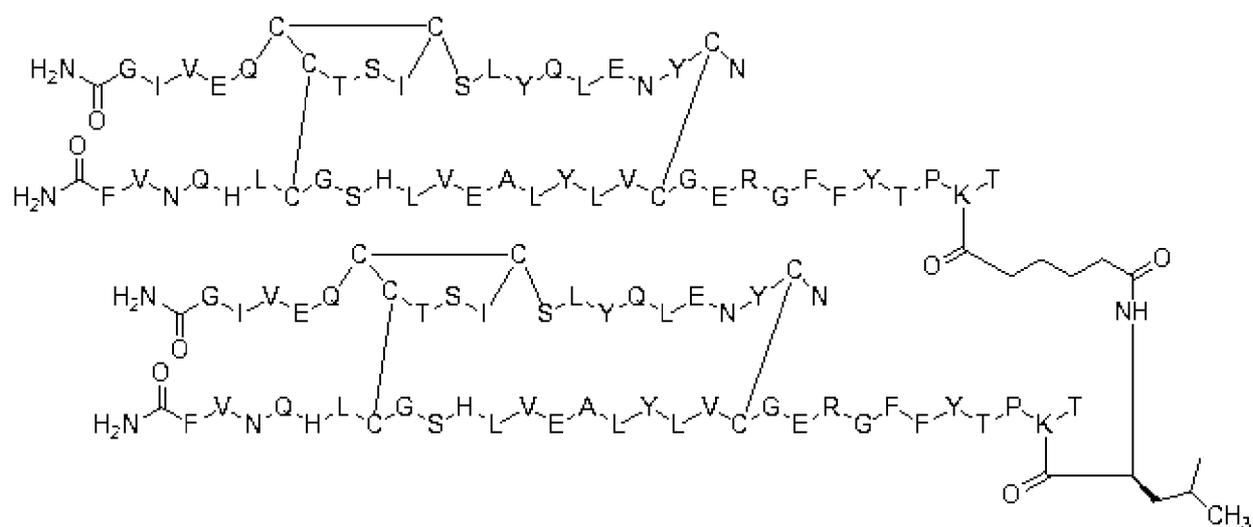
димера 61;



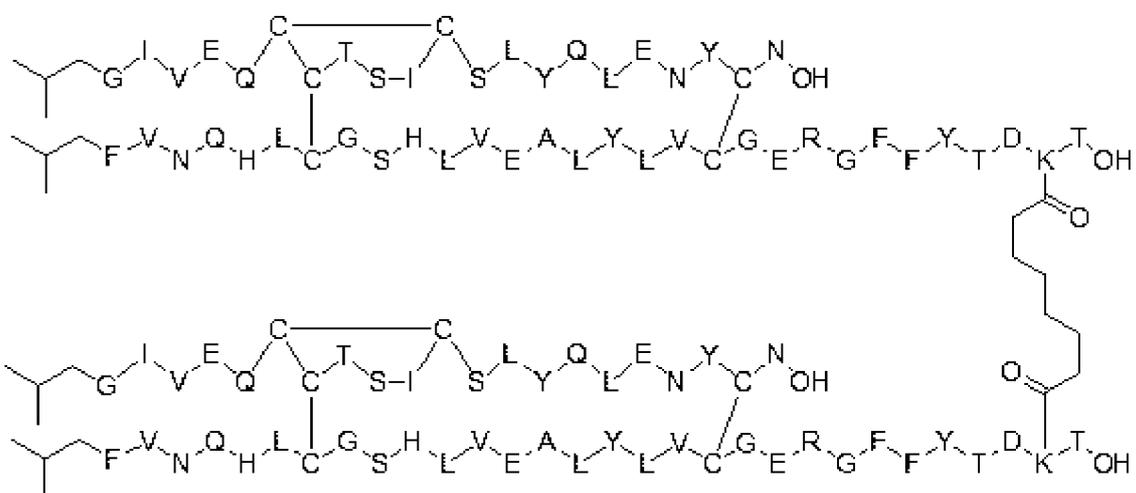
димера 62;



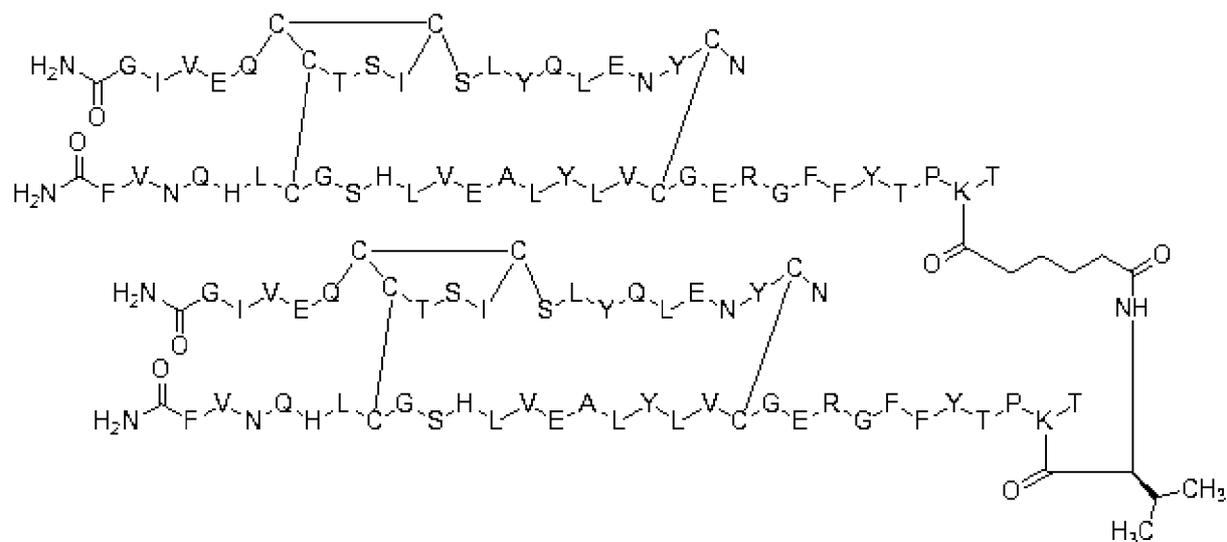
димера 63;



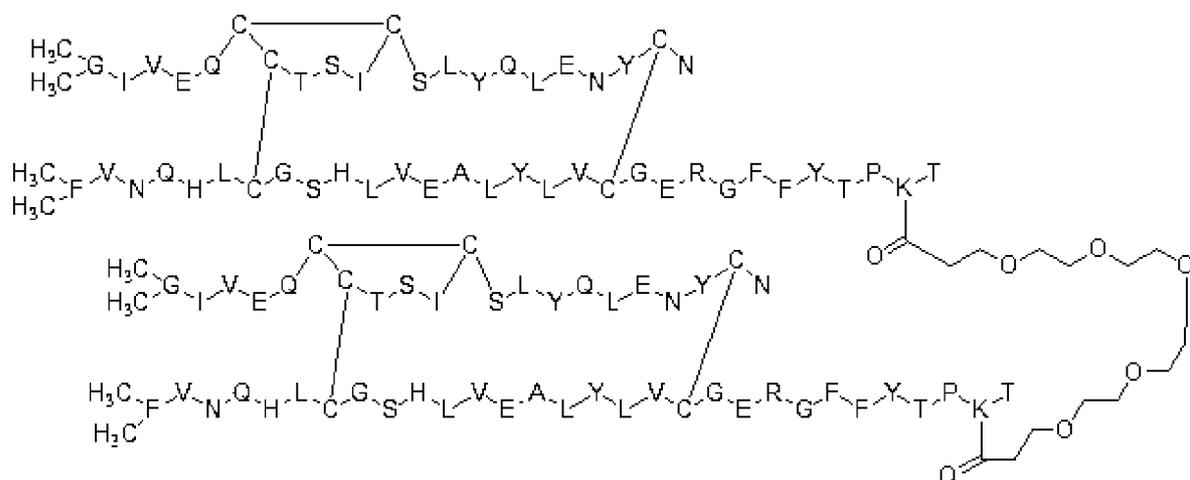
димера 64;



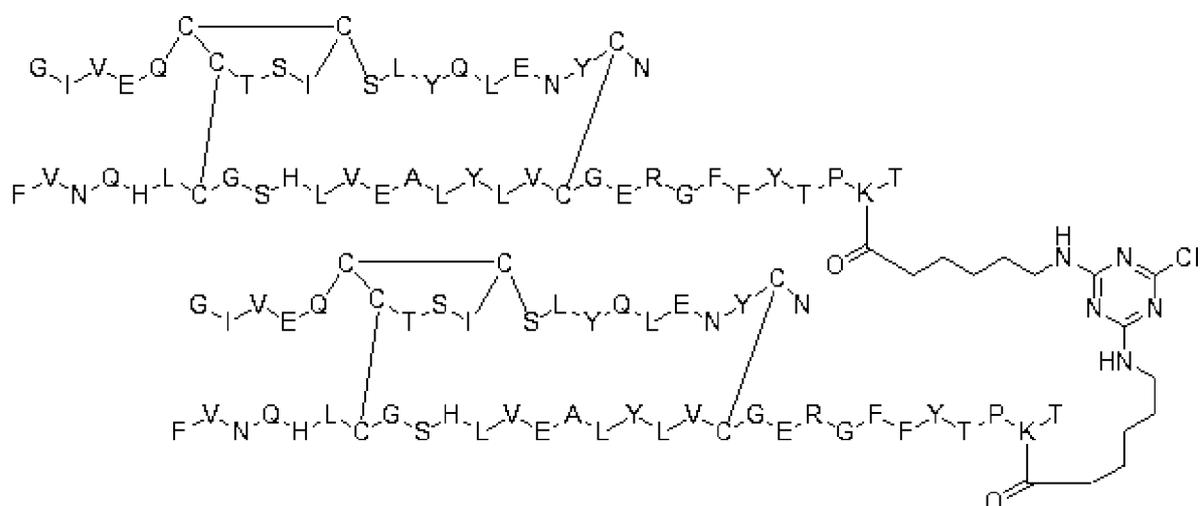
димера 65;



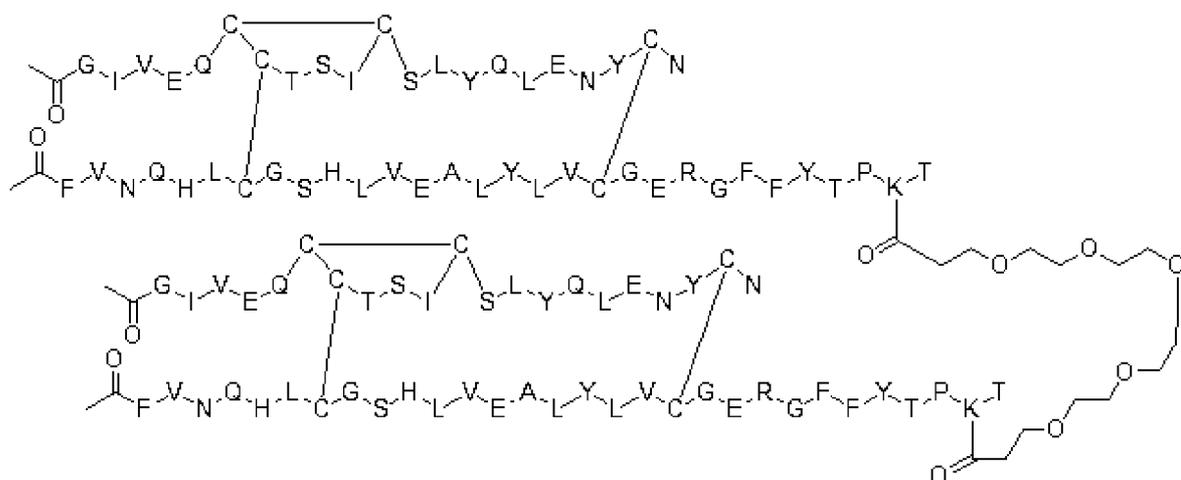
димера 66;



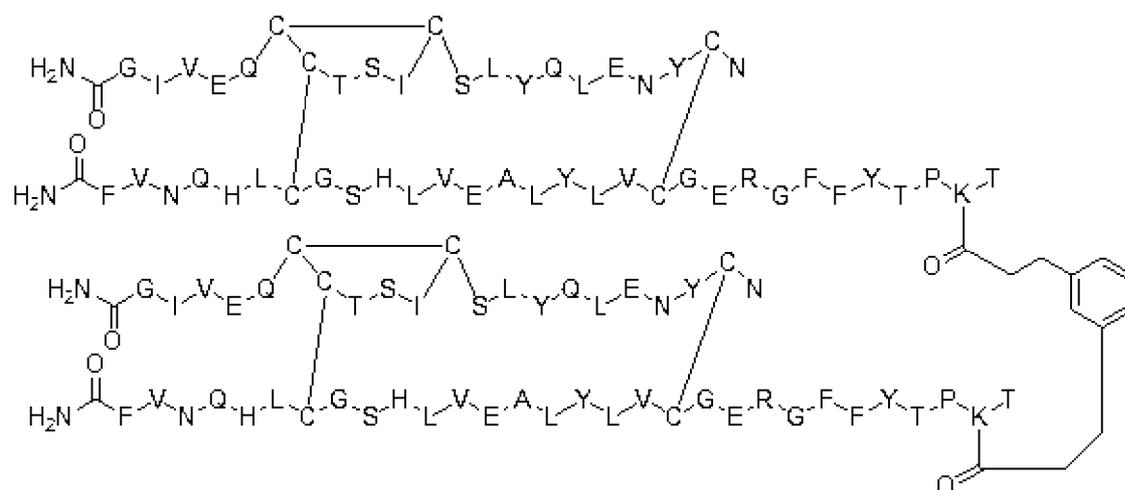
димера 67;



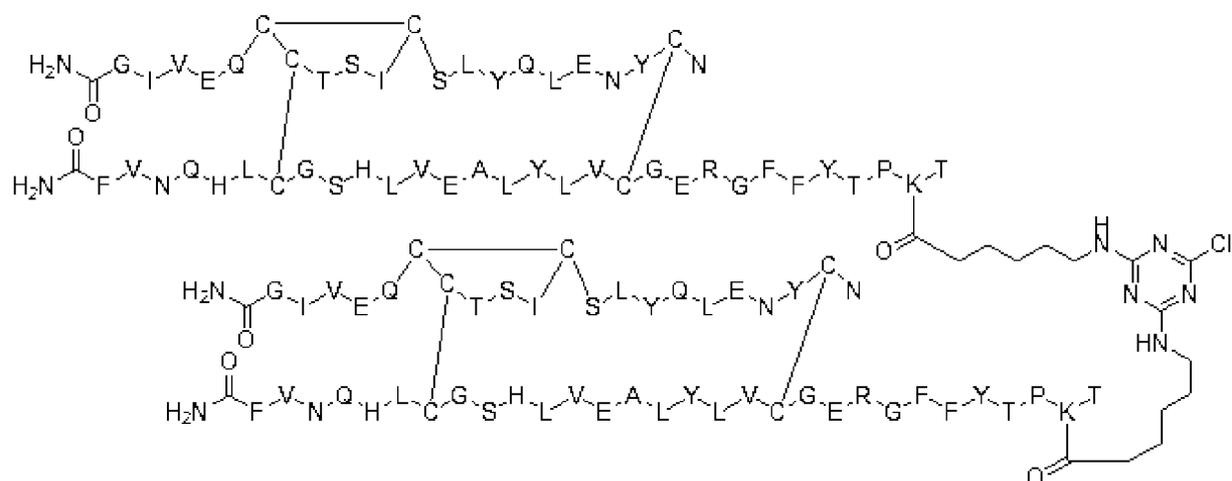
димера 68;



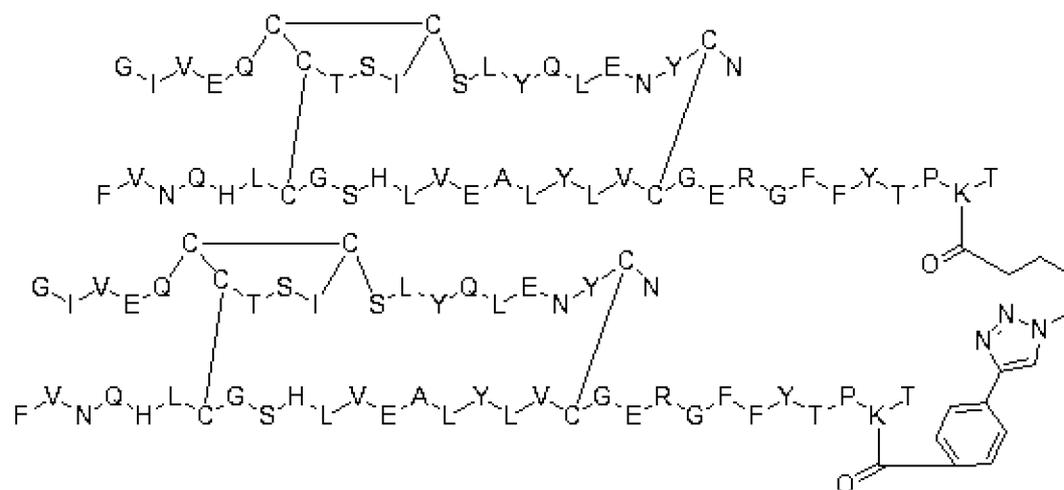
димера 69;



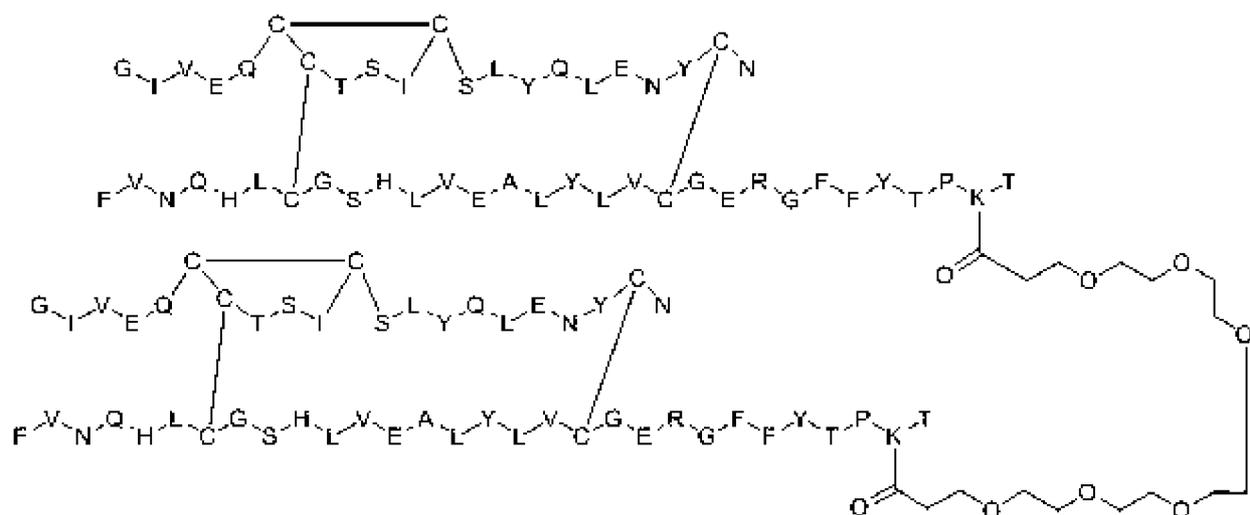
димера 73;



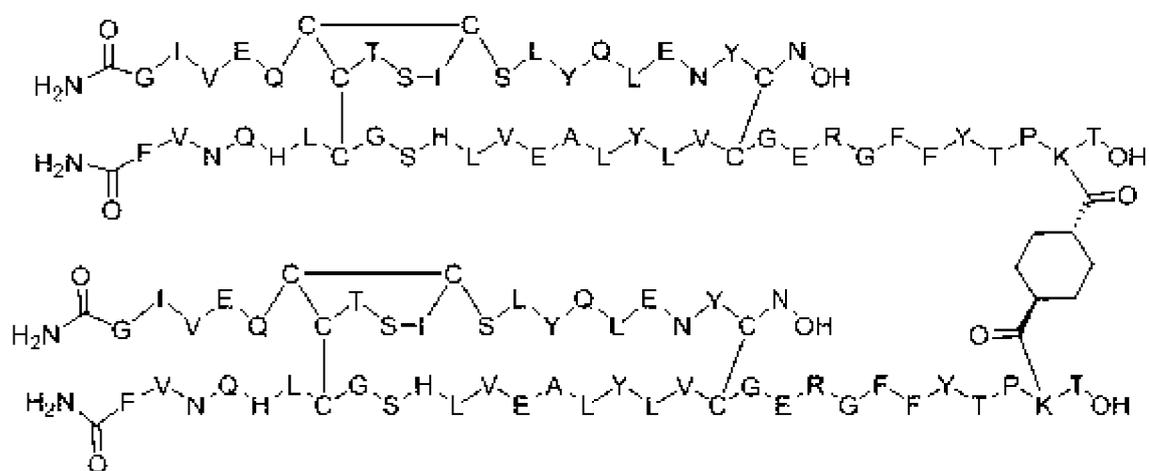
димера 74;



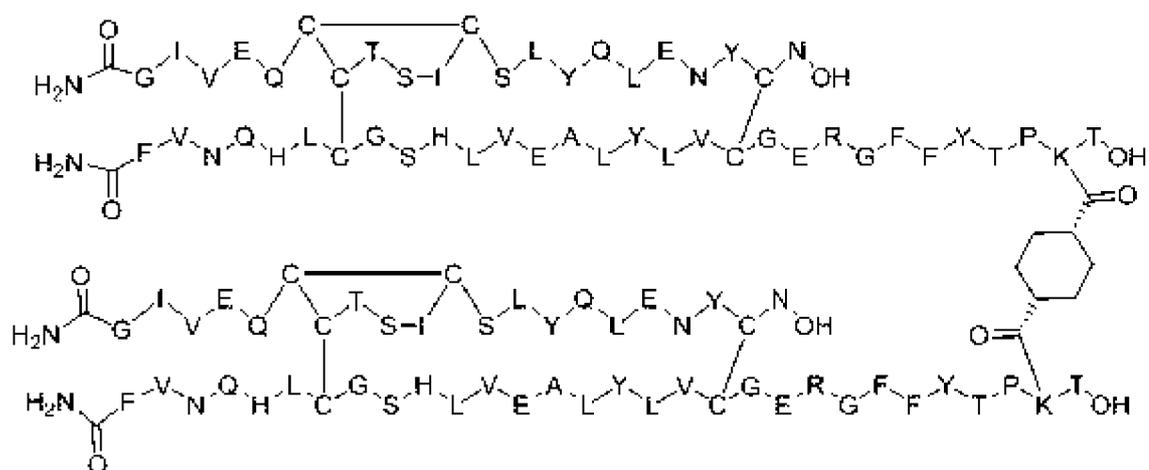
димера 75;



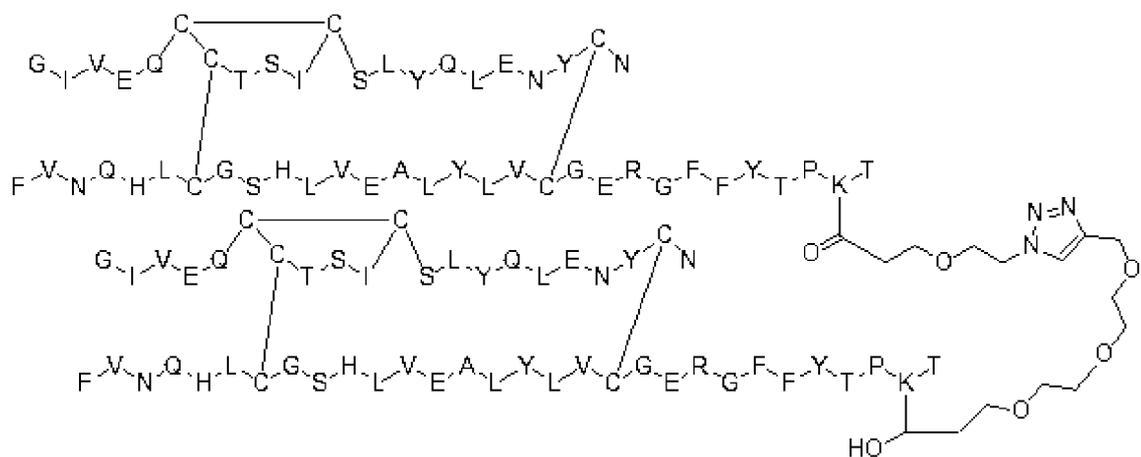
димера 76;



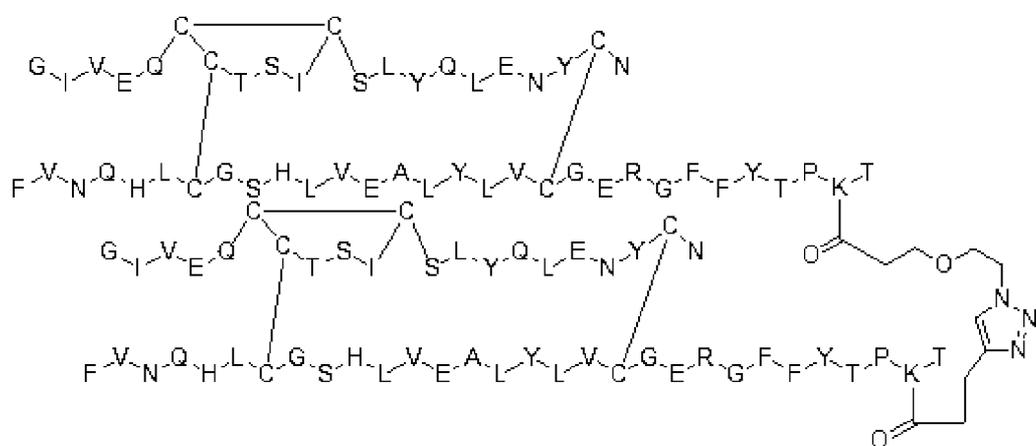
димера 77;



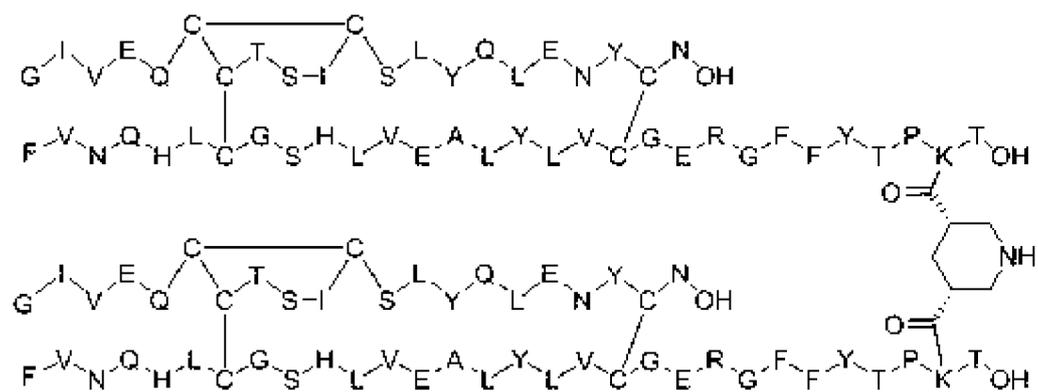
димера 78;



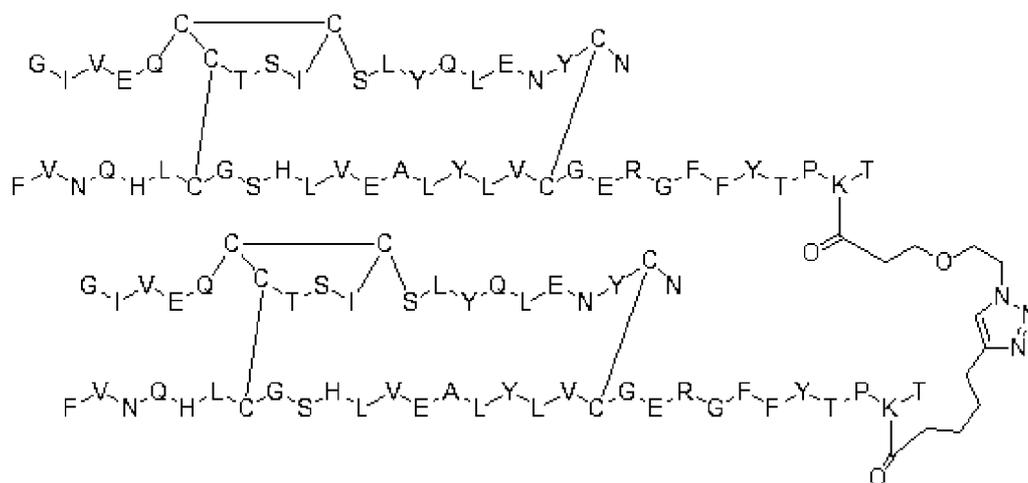
димера 79;



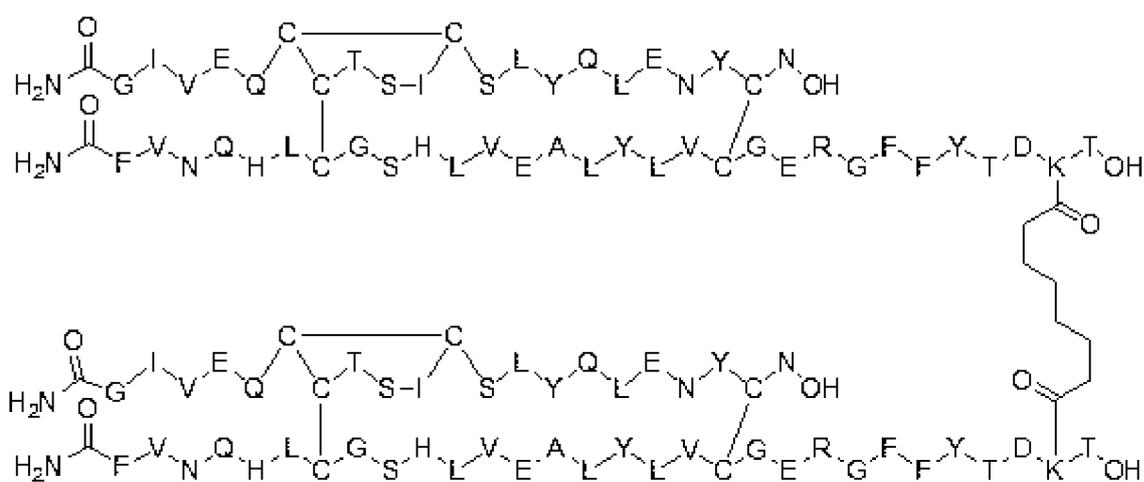
димера 80;



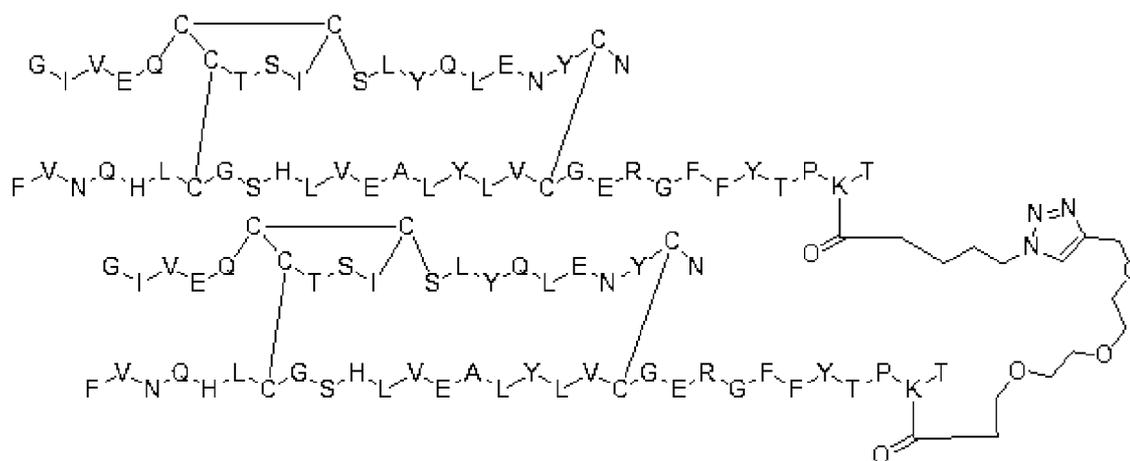
димера 81;



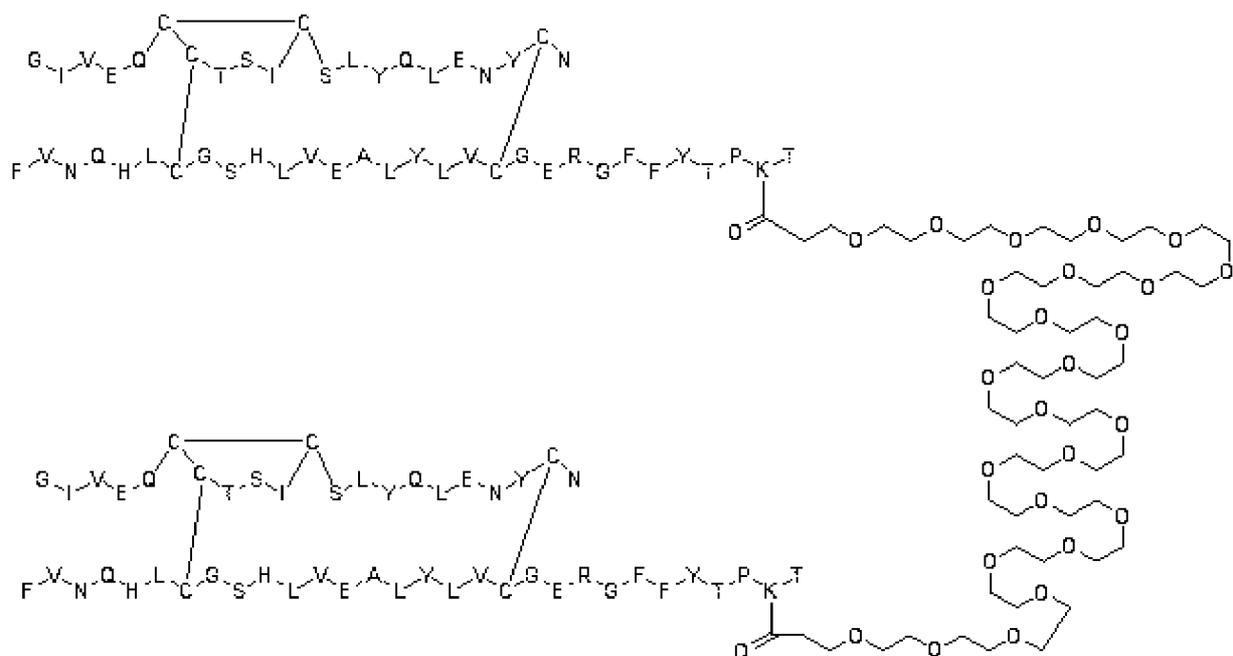
димера 82;



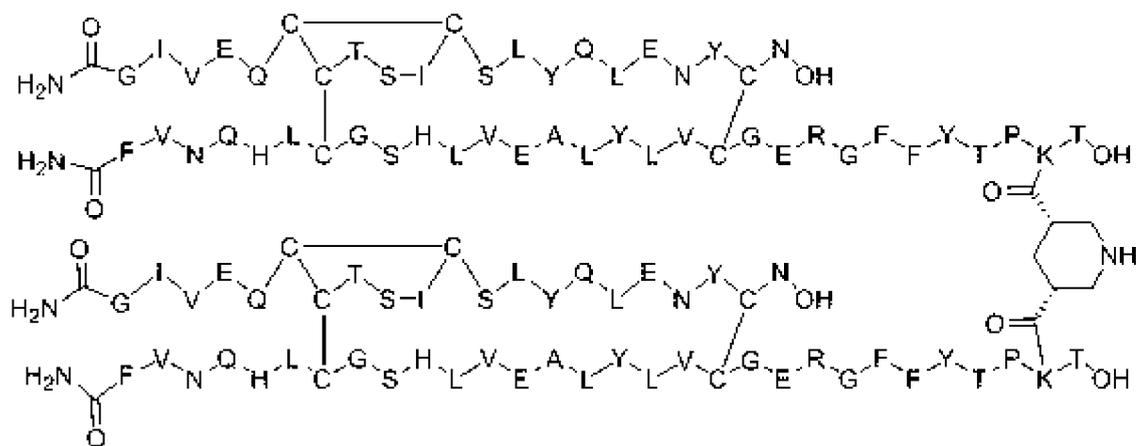
димера 83;



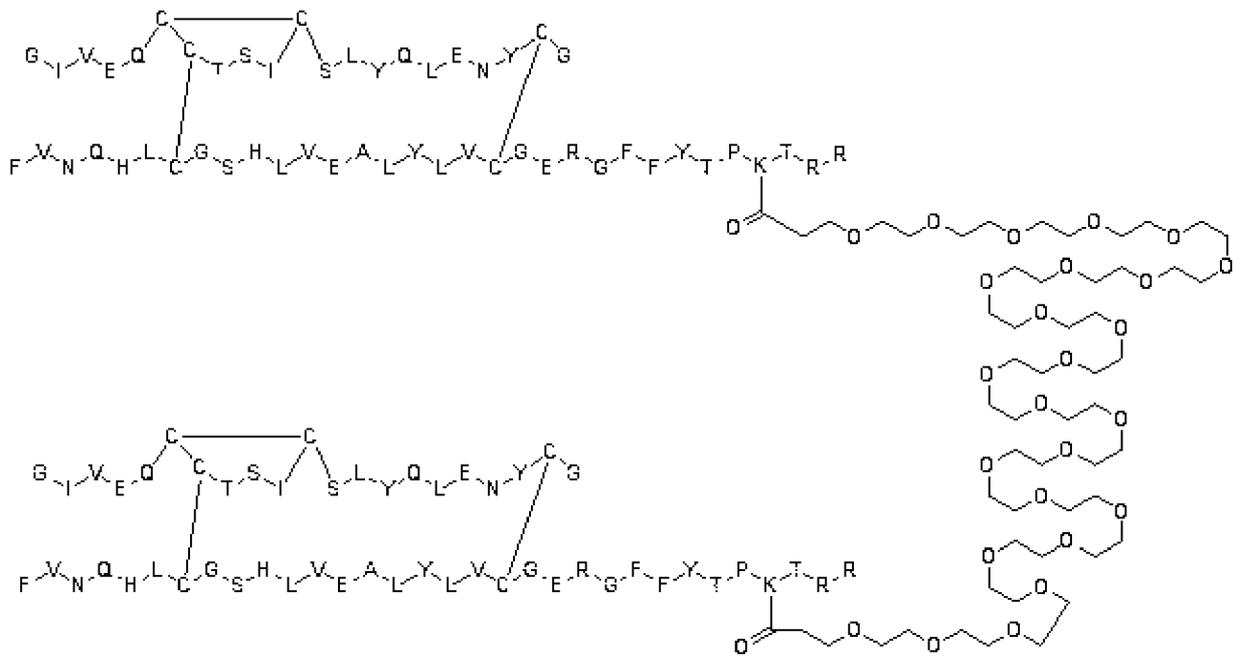
димера 84;



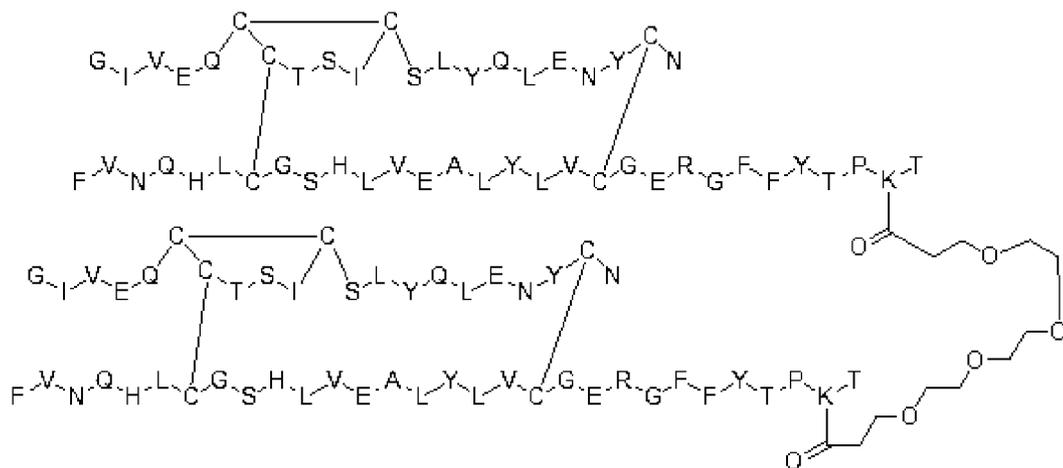
димера 85;



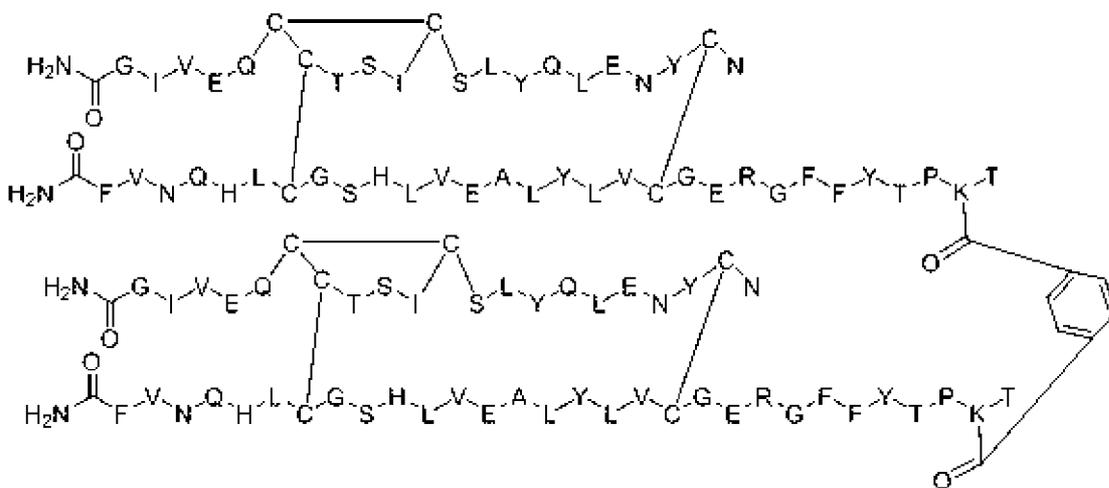
димера 86;



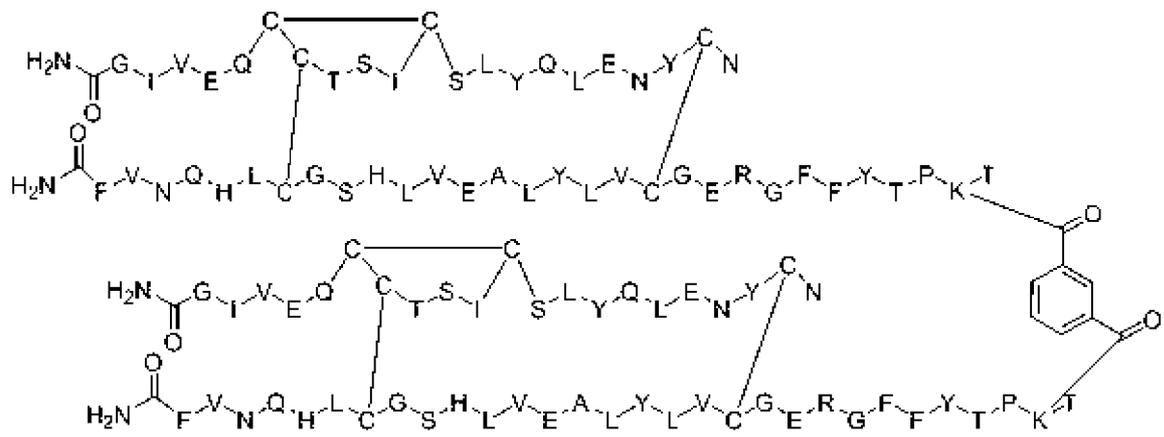
димера 87;



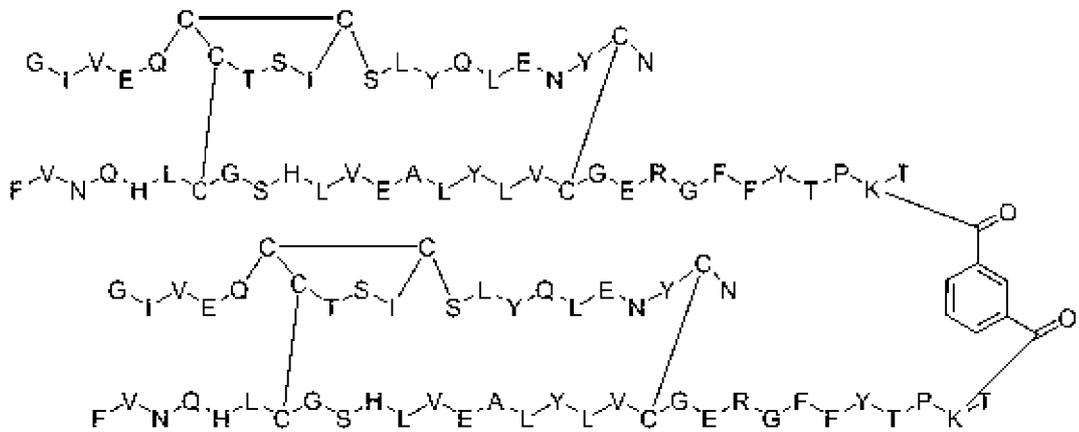
димера 88;



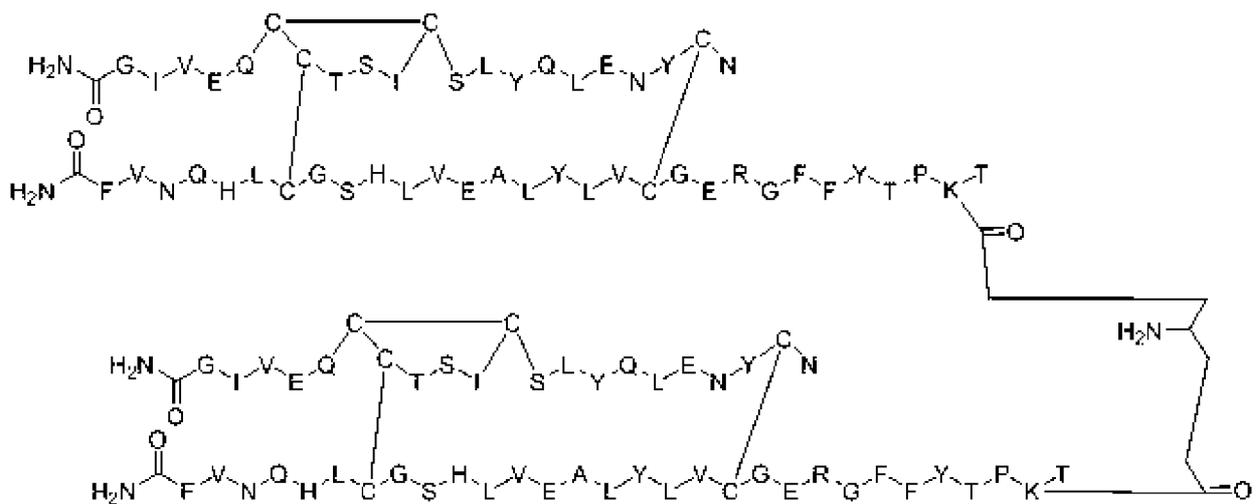
димера 89;



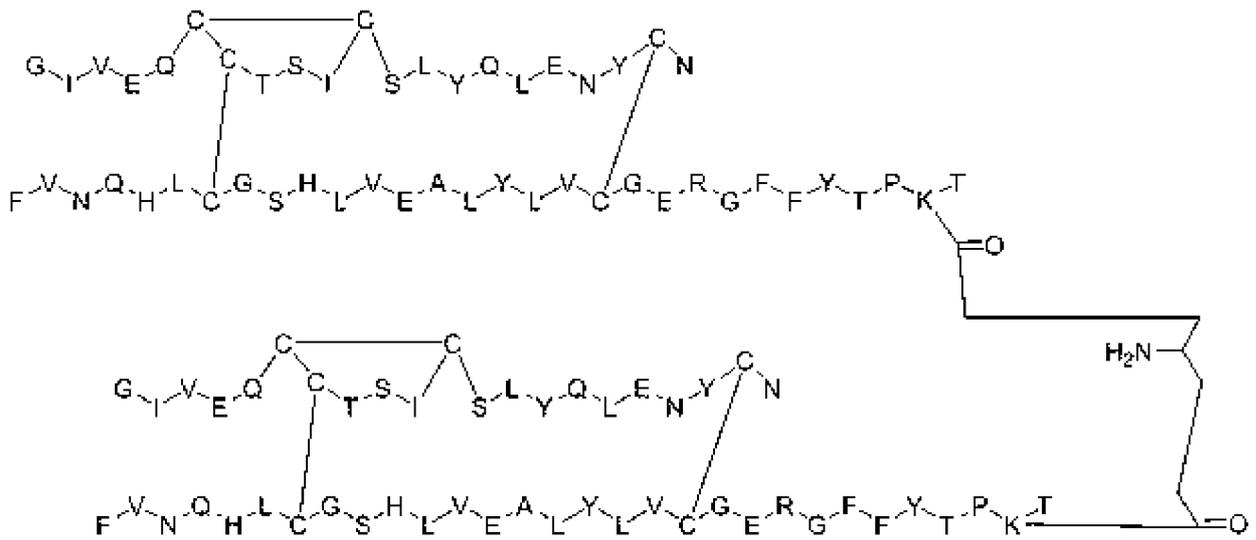
димера 90;



димера 91;



димера 93; и



димера 94

Причем дисульфидные связи между остатками Cys₆ и Cys₁₁ полипептида А-цепи и дисульфидные связи между Cys₇ и Cys₂₀ А-цепи с Cys₇ и Cys₁₉ полипептида В-цепи, соответственно, представлены с помощью сплошной линии между ними; причем связывающие фрагменты ковалентно связаны с эpsilon-аминокислотой показанного остатка лизина, причем полипептид А-цепи для димеров 1-40, 42-52, 54-86 и 88-94 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1; полипептид А-цепи для димера 56 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 11; полипептид В-цепи для димеров 1-17, 21-27, 36, 37, 39-40 и 42-52, 54-82, 84-86 и 88-94 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2; полипептид В-цепи для димеров 18 и 32-35 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 6; полипептид В-цепи для димеров 19 и 83 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 9; полипептид В-цепи для димеров 20, 28-31 и 38 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 10; и полипептид А-цепи и полипептид В-цепи для димеров 53 и 87 представляют собой SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно.

Фармацевтические композиции

В соответствии с одним вариантом осуществления предлагается фармацевтическая композиция, содержащая любой из новых инсулиновых димеров, раскрытых в настоящем документе, предпочтительно с уровнем чистоты, составляющим по меньшей мере

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество. Такие композиции могут содержать инсулиновый димер, раскрытый в настоящем документе, в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 15 мг/мл, 16 мг/мл, 17 мг/мл, 18 мг/мл, 19 мг/мл, 20 мг/мл, 21 мг/мл, 22 мг/мл, 23 мг/мл, 24 мг/мл, 25 мг/мл или больше. В одном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат водные растворы, которые стерилизуют и, необязательно, хранят, помещая в различные упаковочные контейнеры. В других вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат лиофилизированный порошок. Фармацевтические композиции могут быть также упакованы как часть набора, который включает в себя одноразовое устройство для введения композиции пациенту. Контейнеры или наборы могут быть помечены для хранения при комнатной температуре или при пониженной температуре.

Раскрытые инсулиновые димеры, как полагают, пригодны для любого применения, которое ранее было описано для инсулиновых пептидов. Соответственно, инсулиновые димеры, раскрытые в настоящем документе, можно использовать для лечения гипергликемии или лечения других метаболических заболеваний, которые являются результатом высокого уровня глюкозы в крови. Соответственно, настоящее изобретение охватывает фармацевтические композиции, содержащие инсулиновые димеры, раскрытые в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель, для применения при лечении пациента, страдающего от высоких уровней глюкозы в крови. В соответствии с одним вариантом осуществления пациент, подлежащий лечению с помощью инсулинового димера, раскрытого в настоящем документе, представляет собой одомашненное животное, а в другом варианте осуществления пациент, подлежащий лечению, представляет собой человека.

Один из способов лечения гипергликемии в соответствии с настоящим раскрытием содержит этапы введения раскрытых в

настоящем документе инсулиновых димеров пациенту с помощью любого стандартного пути введения, включая парентеральный, в том числе внутривенно, внутривнутрибрюшинно, подкожно или внутримышечно, интратекально, трансдермально, ректально, перорально, назально или с помощью ингаляции. В одном варианте осуществления композицию вводят подкожно или внутримышечно. В другом варианте осуществления композицию вводят парентерально, и инсулиновый полипептид или его производное пролекарство предварительно заправляют в шприц.

Инсулиновые димеры, раскрытые в настоящем документе, могут быть введены по-отдельности или в комбинации с другими противодиабетическими средствами. Противодиабетические средства, известные в данной области техники или находящиеся в стадии разработки, включают нативный инсулин, нативный глюкагон и их функциональные аналоги, сульфонилмочевины, такие как толбутамид (Orinase), ацетогексамид (Dymelor), толазамид (Tolinase), хлорпропамид (Diabinese), глипизид (Glucotrol), глибурид (Diabeta, Micronase, Glynase), глимепирид (Amaryl) или гликлазид (Diamicron); меглитиниды, такие как репаглинид (Prandin) или натеглинид (Starlix); бигуаниды, такие как метформин (Glucophage) или фенформин; тиазолидиндионы, такие как розиглитазон (Avandia), пиоглитазон (Actos) или троглитазон (Rezulin), или другие ингибиторы PPAR γ ; ингибиторы альфа-глюкозидазы, которые ингибируют расщепление углеводов, такие как миглитол (Glyset), акарбоза (Precose/Glucobay); экзенатид (Byetta) или прамлинтид; ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (DPP-4), такие как вилдаглиптин или ситаглиптин; ингибиторы SGLT (натрийзависимого переносчика 1 глюкозы); или ингибиторы ФБФ-азы (фруктозо-1,6-бисфосфатазы).

Фармацевтические композиции, содержащие инсулиновые димеры, раскрытые в настоящем документе, могут быть составлены и введены пациентам с использованием стандартных фармацевтически приемлемых носителей и путей введения, известных специалистам в данной области техники. Соответственно, настоящее раскрытие также охватывает фармацевтические композиции, содержащие один

или несколько из инсулиновых димеров, раскрытых в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемую соль, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Например, фармацевтические композиции, содержащие инсулиновые димеры, раскрытые в настоящем документе могут, необязательно, содержать ионы цинка, консерванты (например, фенол, крезол, парабены), изотонизирующие средства (например, маннит, сорбит, лактозу, декстрозу, трегалозу, хлорид натрия, глицерин), буферные вещества, соли, кислоты и щелочи, а также другие вспомогательные вещества. Эти вещества могут в каждом случае присутствовать по отдельности или, в качестве альтернативы, в виде смесей. Глицерин, декстроза, лактоза, сорбит и маннит обычно присутствуют в фармацевтическом препарате в концентрации, составляющей 100–250 мМ, NaCl в концентрации, составляющей вплоть до 150 мМ. Буферные вещества, такие как, например, фосфатный, ацетатный, цитратный, аргининовый, глицил-глициновый или TRIS (то есть 2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиоловый) буфер и соответствующие соли, присутствуют в концентрации, составляющей 5–250 мМ, обычно от приблизительно 10–100 мМ. Другие вспомогательные вещества могут представлять собой, кроме того, соли или аргинин.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит инсулиновый димер в концентрации 1 мг/мл при pH от приблизительно 4,0 до приблизительно 7,0 в фосфатной буферной системе. Фармацевтические композиции могут содержать инсулиновый димер в качестве единственного фармацевтически активного компонента, или инсулиновый димер может быть объединен с одним или несколькими дополнительными активными средствами.

Все терапевтические способы, фармацевтические композиции, наборы и другие аналогичные варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предусматривают, что инсулиновые димеры включают в себя все их фармацевтически приемлемые соли.

В одном варианте осуществления предлагается набор с устройством для введения композиции инсулиновых димеров пациенту. Набор может дополнительно включать в себя множество контейнеров, например, флаконов, пробирок, бутылей и тому

подобных. Предпочтительно, наборы будут также включать в себя инструкцию по применению. В соответствии с одним вариантом осуществления устройство из набора представляет собой распыляющее аэрозольное устройство, причем композиция заправлена в аэрозольное устройство. В другом варианте осуществления набор содержит шприц и иглу, и в одном варианте осуществления композицию инсулиновых димеров предварительно заправляют в шприц.

Соединения настоящего изобретения могут быть получены с помощью стандартных способов синтеза, методов рекомбинантной ДНК или любых других способов получения пептидов и белков слияния. Хотя некоторые неприродные аминокислоты не могут быть экспрессированы с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК, методы их получения известны в данной области техники. Соединения настоящего изобретения, которые включают в себя непептидные части, могут быть синтезированы посредством стандартных реакций органической химии в дополнение к стандартным реакциям пептидной химии, когда это применимо.

Следующие примеры предназначены для облегчения дальнейшего понимания настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Общие процедуры

Все химические вещества были приобретены из коммерческих источников, если не указано иное. Реакции обычно проводили при температуре окружающей среды или при комнатной температуре, если не указано иное. Реакции, чувствительные к воздействию влаги или воздуха, проводили в атмосфере азота или аргона с использованием безводных растворителей и реагентов. Ход реакций контролировали с помощью аналитической тонкослойной хроматографии (ТСХ) и сверхэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (СВЭЖХ-МС). ТСХ проводили на пластинах для ТСХ E. Merck, предварительно покрытых силикагелем 60F-254, толщина слоя 0,25 мм. Пластины визуализировали с использованием УФ 254 нм и/или подвергая воздействию молибдата церия-аммония (САМ) или окрашивающих растворов *p*-анисового альдегида с последующим обугливанием. Сверхэффективную жидкостную хроматографию (СВЭЖХ)

проводили на системе Waters Acquity™ UPLC®.

СВЭЖХ-МС, способ А: колонка Waters Acquity™ UPLC® ВЕН С18 1,7 мкм 1,0×50 мм с градиентом 10:90-95:5 об/об CH₃CN/H₂O+0,05 об.% ТФУ в течение 2,0 мин; скорость потока 0,3 мл/мин, длина волны УФ 215 нм; СВЭЖХ-МС;

способ В: колонка Waters Acquity™ UPLC® ВЕН С18 1,7 мкм 2,1×100 мм с градиентом 60:40-100:0 об/об CH₃CN/H₂O+0,05 об.% ТФУ в течение 4,0 мин и 100:0-95:5 об/об CH₃CN/H₂O+0,05 об.% ТФУ в течение 40 сек; скорость потока 0,3 мл/мин, длина волны УФ 200-300 нм; СВЭЖХ-МС;

способ С: колонка Waters Acquity™ UPLC® ВЕН С18 1,7 мкм 2,1×100 мм с градиентом 20:80-90:10 об/об CH₃CN/H₂O+0,05 об.% ТФУ в течение 4,0 мин и 90:10-95:5 об/об CH₃CN/H₂O+0,05 об.% ТФУ в течение 0,5 мин; скорость потока 0,3 мл/мин, длина волны УФ 200-300 нм; СВЭЖХ-МС;

способ D: колонка Waters Acquity™ UPLC® ВЕН С8 1,7 мкм 2,1×100 мм с градиентом 10:90-55:45 об/об CH₃CN/H₂O+0,05 об.% ТФУ в течение 4,0 мин и 55:45-95:5 об/об CH₃CN/H₂O+0,05 об.% ТФУ в течение 40 сек; скорость потока 0,3 мл/мин, длина волны УФ 200-300 нм; СВЭЖХ-МС;

способ E: колонка Waters Acquity™ UPLC® ВЕН300 С4 1,7 мкм 2,1×100 мм с градиентом 10:90-50:50 об/об CH₃CN/H₂O+0,05 об.% ТФУ в течение 4,3 мин и 50:50-70:30 об/об CH₃CN/H₂O+0,05 об.% ТФУ в течение 0,5 мин; скорость потока 0,3 мл/мин, длина волны УФ 200-300 нм; СВЭЖХ-МС;

способ F: колонка Waters Acquity™ UPLC® ВЕН С8 1,7 мкм 2,1×100 мм с градиентом 20:80-72,5:27,5 об/об CH₃CN/H₂O+0,05 об.% ТФУ в течение 4,3 мин и 72,5:27,5-95:5 об/об CH₃CN/H₂O+0,05 об.% ТФУ в течение 0,5 мин; скорость потока 0,3 мл/мин, длина волны УФ 200-300 нм и СВЭЖХ-МС;

способ G: колонка Waters Acquity™ UPLC® ВЕН С8 1,7 мкм 2,1×100 мм с градиентом 20:80-90:10 об/об CH₃CN/H₂O+0,1 об.% ТФУ в течение 4,0 мин и 90:10-95:5 об/об CH₃CN/H₂O+0,1 об.% ТФУ в течение 0,4 мин; скорость потока 0,3 мл/мин, длина волны УФ 200-

300 нм.

Масс-анализ проводили на Waters SQ Detector с ионизацией электрораспылением в режиме дектирования положительных ионов, причем диапазон сканирования отношения массы к заряду составлял 170-900, или на Waters Micromass® LCT Premier™ XE с ионизацией электрораспылением в режиме дектирования положительных ионов, причем диапазон сканирования отношения массы к заряду составлял 300-2000. Идентификацию получаемых инсулиновых конъюгатов или IRPA подтверждали посредством сравнения теоретического молекулярного веса с экспериментальным значением, которое было измерено с помощью СВЭЖХ-МС. Для определения, в частности, положений связей инсулиновые димеры подвергали обработке ДТТ (для a/b-цепи) или расщеплению Glu-C (с восстановлением и алкилированием или без них), и затем получаемые пептиды анализировали с помощью ЖХ-МС. На основании измеренных масс были определены положения связей.

Флэш-хроматографию проводили с использованием или аппарата Biotage Flash Chromatography (Dyax Corp.), или прибора CombiFlash® Rf (Teledyne Isco). Хроматографию с нормальными фазами проводили на силикагеле (20-70 мкм, размер пор 60 Å) в предварительно заправленных картриджах указанного размера. Ионообменную хроматографию проводили на материале на основе силикагеля со связанным покрытием из гидрофильного анионного поли(2-сульфоэтиласпартамида) (колонка PolySULFOETHYL A, PolyLC Inc., 250×21 мм, 5 мкм, размер пор 1000 Å). Хроматографию с обращенной фазой проводили на C18-связанном силикагеле (20-60 мкм, размер пор 60-100 Å) в предварительно заправленных картриджах указанного размера. Препаративную ВЭЖХ проводили в бинарной системе Gilson 333-334 с использованием колонки Waters DELTA PAK C4 15 мкм, 300 Å, 50×250 мм или колонки KROMASIL® C8 10 мкм, 100 Å, 50×250 мм, скорость потока 85 мл/мин, с указанным градиентом. Растворы концентрировали на роторном испарителе при пониженном давлении или сушили вымораживанием на VirTis Freezemobile Freeze Dryer (SP Scientific).

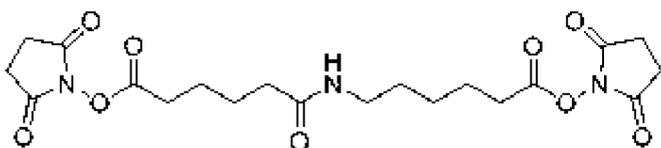
Сокращения: ацетонитрил (ACCN), водный (водн.), N,N-

диизопропилэтиламин или основание Хунига (DIPEA), *N,N*-диметилформаид (DMF), диметилсульфоксид (DMSO), этилацетат (EtOAc), гидрохлорид *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимида (EDC), грамм(ы) (г), гидрат 1-гидроксибензотриазола (HOBT), час(ы) (ч или час), масс-спектр (мс или MS), микрограмм(ы) (мкг), микролитр(ы) (мкл), микромоль (мкмоль), миллиграмм(ы) (мг), миллилитр(ы) (мл), миллимоль (ммоль), минута(ы) (мин), время удерживания (R_t), комнатная температура (rt), насыщенный (насыщ. или насыщ-й), насыщенный водн. раствор хлорида натрия (рассол), триэтиламин (ТЭА), трифторуксусная кислота (ТФУ) и тетрафторборат *N,N,N',N'*-тетраметил-*O*-(*N*-сукцинимидил)урония (TSTU).

Термин "RHI" относится к рекомбинантному человеческому инсулину и используется для того, чтобы показать, что инсулин имеет аминокислотную последовательность, характерную для нативного человеческого инсулина дикого типа. Как используется в настоящем документе в таблицах, данный термин показывает, что аминокислотная последовательность инсулина, содержащегося в димере, представляет собой последовательность нативного человеческого инсулина дикого типа.

ПРИМЕР 1

Описан синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-((6-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-6-оксигексил)амино)-6-оксогексаноата (линкер 1; C₆+NC₆).



Этап 1. Бензил-6-((6-(бензилокси)-6-оксигексил)амино)-6-оксогексаноат

К смеси монобензилового сложного эфира адипиновой кислоты (600 мг, 2,54 ммоль) и 6-(бензилокси)-6-оксогексан-1-аминия 4-метилбензолсульфоната (1,0 г, 2,54 ммоль) в DMF (12,71 мл) добавляли HOBT (584 мг, 3,81 ммоль), основание Хунига (888 мкл, 5,08 ммоль) и EDC (731 мг, 3,81 ммоль). После перемешивания в течение ночи реакционную смесь распределяли между насыщ. NaHCO₃ и

EtOAc. Органическую фазу отделяли, промывали с помощью 1,0 М HCl и рассола, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения в виде полутвердого вещества и использовали на следующем этапе без дополнительной очистки. СВЭЖХ-МС, способ А: Rt=1,26 мин, m/z=440,3 [M+1]

Этап 2. 6-((5-Карбоксипентил)амино)-6-оксогексановая кислота

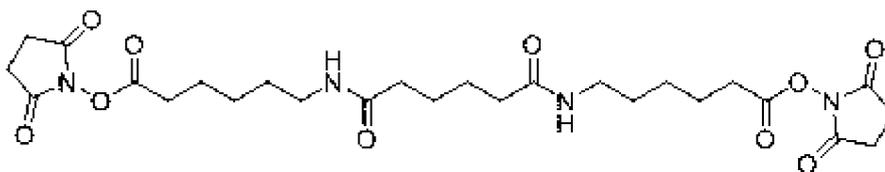
Суспензию продукта этапа 1 (1,08 г, 2,457 ммоль) и катализатора Перлмана (20 вес.% на угле, 173 мг, 0,246 ммоль) в MeOH (50 мл) перемешивали при 50 psi H₂ в течение ночи. Катализатор отфильтровывали, и фильтрат подвергали хроматографии с обращенной фазой на фазе C8 (Kromasil, C8 10 мкм 100 Å, 250×50 мм; растворитель А=вода/0,05% ТФУ, растворитель В=AcCN/0,05% ТФУ), скорость потока=85 мл/мин, градиент В в А 5-30% в 30 мин. СВЭЖХ-МС, способ А: Rt=0,40 мин, m/z=260,15 [M+1].

Этап 3. 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-((6-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-6-оксигексил)амино)-6-оксогексаноат

К раствору продукта этапа 2 (50 мг, 0,193 ммоль) в ДМФ (964 мкл) добавляли TSTU (116 мг, 0,386 ммоль). После охлаждения до 0°C к смеси добавляли триэтиламин (53,8 мкл, 0,386 ммоль). После перемешивания в течение 45 минут наблюдали образование желаемого соединения: СВЭЖХ-МС, способ А: Rt=0,71 мин, m/z=453,4 [M+1].
Получаемый 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-((6-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-6-оксигексил)амино)-6-оксогексаноат использовали в виде 0,2 М раствора в ДМФ без очистки.

ПРИМЕР 2

Описан синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-6,6'- (адипоилбис(азанедиил))дигексаноата (линкер 2; C₆N+C₆+NC₆).



Этап 1. Дибензил-6,6'- (адипоилбис(азанедиил))дигексаноат

К раствору 6-(бензилокси)-6-оксогексан-1-аминия 4-метилбензолсульфоната (2,693 г, 6,84 ммоль) и адипиновой кислоты (500 мг, 3,42 ммоль) в ДМФ (17,1 мл) добавляли основание Хунига

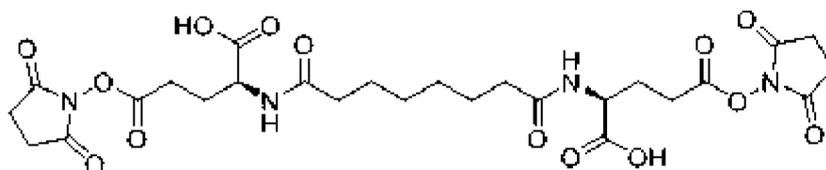
(1,793 мл, 10,26 ммоль), HOBT (1,572 г, 10,26 ммоль) и EDC (1,968 г, 10,26 ммоль). После перемешивания в течение ночи реакционную смесь выливали в воду (500 мл) и перемешивали в течение 30 минут. Указанное в заголовке соединение собирали посредством фильтрации в виде твердого вещества и сушили посредством отсасывания воздуха. СВЭЖХ-МС, способ А: Rt=1,23 мин, m/z=553,5 [M+1].

Этап 2. Бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-6,6'-(адипоилбис(азанедиил))дигексаноат

Указанное в заголовке соединение получали с помощью процедуры, аналогичной описанной в примере 1, заменяя бензил-6-((6-(бензилокси)-6-оксигексил)амино)-6-оксогексаноат на дибензил-6,6'-(адипоилбис(азанедиил))дигексаноат на этапе 2. СВЭЖХ-МС, способ А: Rt=0,74 мин, m/z=567,4 [M+1].

ПРИМЕР 3

Описан синтез (2S,2'S)-2,2'-(окстандиоилбис(азанедиил))бис(5-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-5-оксопентановой кислоты) (линкер 3; гамма-Glu-суберик-гамма-Glu).



Этап 1. (S)-5-(бензилокси)-4-(8-(((S)-1-(бензилокси)-4-карбоксо-1-оксобутан-2-ил)амино)-8-оксооктанамидо)-5-оксопентановая кислота

К раствору H-GLU-OBZL (1,00 г, 4,21 ммоль) в ДМФ (10,5 мл) добавляли триэтиламин (5,875 мл, 42,1 ммоль), а затем дисукцинимидилсуберат (776 мг, 2,107 ммоль). После перемешивания в течение 1 часа реакционную смесь концентрировали, и получаемый остаток очищали на колонке C18 (ISCO, 44 г), поток=37 мл/мин; градиент AcCN в воде с 0,05% ТФУ: 2%-20% за 20 мин с последующим удерживанием. После лиофилизации получали промежуточную бис-карбоновую кислоту. СВЭЖХ-МС, способ В: Rt=2,66 мин, m/z=613,3 [M+1].

Этап 2. Бис-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (S)-5-

(бензилокси)-4-(8-((S)-1-(бензилокси)-4-карбокси-1-оксобутан-2-ил)амино)-8-оксооктанамидо)-5-оксопентановой кислоты

К суспензии продукта этапа 1 (455 мг, 0,743 ммоль) в ацетонитриле (7,4 мл) добавляли TSTU (492 мг, 1,634 ммоль) в виде твердого вещества, а затем триэтиламин (228 мкл, 1,634 ммоль), в этот момент суспензия растворялась. Реакционную смесь перемешивали в течение 1,5 час. и концентрировали на роторном испарителе при комнатной температуре. Продукт очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой на фазе C-8 (колонка Kromasil, C8 10 мкм, 100 А, размер 250×50 мм; растворитель А=вода/0,05% ТФУ, растворитель В=AcCN/0,05% ТФУ), поток=85 мл/мин, градиент В в А 10-80% за 30 мин. После лиофилизации фракций получали сложный эфир с бис-NHS. СВЭЖХ-МС, способ В: Rt=2,77 мин, m/z=807 [M+1].

Этап 3. (2S,2'S)-2,2'-(окстандиоилбис(азанедиил))бис(5-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-5-оксопентановая кислота

Продукт этапа 2 (250 мг, 0,310 ммоль) гидрировали с использованием палладия на угле (66,0 мг, 0,031 ммоль) в качестве катализатора и ацетона, содержащего 0,1% ТФУ, в качестве растворителя (6,2 мл) при 1 атм водорода в течение ночи. Катализатор отфильтровывали, и фильтрат концентрировали с получением указанного в заголовке соединения. Откачивали до высокого вакуума в течение ночи. СВЭЖХ-МС, способ С: Rt=3,61 мин, m/z=627,3 [M+1].

ПРИМЕР 4

Общий способ А: Синтез №, В29-инсулиновых конъюгатов (аналогов)

В контейнере соответствующего размера растворяли инсулин или аналог инсулина при слабом перемешивании при комнатной температуре в смешанном растворителе: 2:3 об/об 0,1 М Na₂CO₃:AcCN. После того, как смесь становилась прозрачной, pH доводили до значения 10,5-10,8 с использованием щелочного раствора, например 0,1 н NaOH. В отдельном флаконе растворяли активированный сложноэфирный интермедиат (связывающий фрагмент) в органическом растворителе, например ДМСО, при комнатной

температуре. Аликвоты раствора активированного сложного эфира (линкера) в течение некоторого периода времени добавляли к раствору, содержащему инсулин, до тех пор, пока хроматограмма СВЭЖХ не показывала, что большая часть немодифицированного инсулина прореагировала, и что существенная часть реакционной смеси превратилась в В29-конъюгированный инсулин. Реакцию останавливали посредством добавления аминного нуклеофила, например 2-аминоэтанола. Реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Получаемый раствор аккуратно разбавляли холодным H_2O (20х) при $0^\circ C$, и доводили его рН до конечного рН 2,5 с использованием 1 н HCl (и 0,1 н NaOH при необходимости). Раствор сначала концентрировали с помощью ультрафильтрации или с помощью системы фильтрации в тангенциальном потоке (TFF), или с использованием Amicon Ultra-15 Centrifugal Units с мембраной 1К, 3К или 10К MWCO. Концентрированный раствор обычно сначала подвергали ионообменной хроматографии (колонка PolySULFOETHYL A, PolyLC Inc., 250×21 мм, 5 мкм, 1000 Å; буфер А: 0,1% (об/об) H_3PO_4 /25% AcCN; буфер В: 0,1% (об/об) H_3PO_4 /25% AcCN/0,5 М NaCl). Фракции, содержащие В29-конъюгат с желаемой чистотой, объединяли и концентрировали с использованием системы TFF или Amicon Ultra-15. Затем получаемый раствор дополнительно очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка Waters C4 250×50 мм, 10 мкм, 1000 Å, или колонка Kromasil C8 250×50 мм, 10 мкм, 100 Å; буфер А: 0,05–0,1% ТФУ в воде; буфер В: 0,05–0,1% ТФУ в AcCN). Фракции, содержащие указанный в заголовке конъюгат, объединяли и сушили вымораживанием или заменяли буфер с использованием системы TFF и/или Amicon Ultra-15 с получением указанного в заголовке продукта.

ПРИМЕР 5

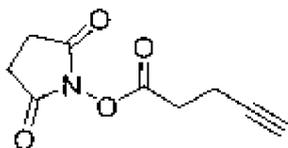
Описан синтез №^{6,29В}-5-азидопентаноил-desB30-инсулина (А:Y19А) (аналог 1).

В скнтилляцияционном флаконе объемом 20 мл растворяли desB30 А:Y19А инсулин (112 мг, 0,020 ммоль) при слабом перемешивании при комнатной температуре в смешанном растворителе (2 мл, 2:3

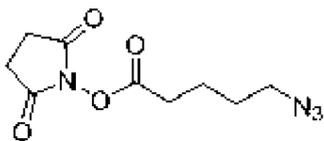
об/об 0,1 М Na₂CO₃:AcCN). После того, как смесь становилась прозрачной, pH доводили до значения 10,5-10,8 с использованием щелочного раствора, например 0,1 н NaOH. В отдельном скнтилляционном флаконе объемом 8 мл растворяли 2,5-диоксопирролидин-1-ил 5-азидопентаноат (линкер 5; смотри пример 6) (4,79 мг, 0,020 ммоль) в ДМСО (500 мкл) при комнатной температуре. Аликвоты раствора активированного сложного эфира в течение некоторого периода времени добавляли к раствору, содержащему инсулин, до тех пор, пока хроматограмма СВЭЖХ не показывала, что большая часть немодифицированного инсулина прореагировала, и что существенная часть реакционной смеси превратилась в В29-конъюгированный инсулин. Реакцию останавливали посредством добавления аминного нуклеофила, например 2-аминоэтанола. Реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Получаемый раствор аккуратно разбавляли холодной H₂O (20x) при 0°C и доводили его pH до конечного pH 2,5 с использованием 1,0 н HCl (и 0,1 н NaOH при необходимости). Раствор сначала концентрировали с помощью ультрафильтрации с использованием Amicon Ultra-15 Centrifugal Units с мембраной 3K или 10K MWCO. Концентрированный раствор подвергали ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка KROMASIL C8 250x50 мм, 10 мкм, 100 Å, 25-35% буфер В в буфере А в течение 20 мин; буфер А: 0,05% ТФУ в воде; буфер В: 0,05% ТФУ в AcCN). Фракции, содержащие аналог 1, объединяли и затем сушили вымораживанием. СВЭЖХ-МС, способ D: Rt=3,91 мин, m/z=1435,86 [(M+4)/4].

ПРИМЕР 6

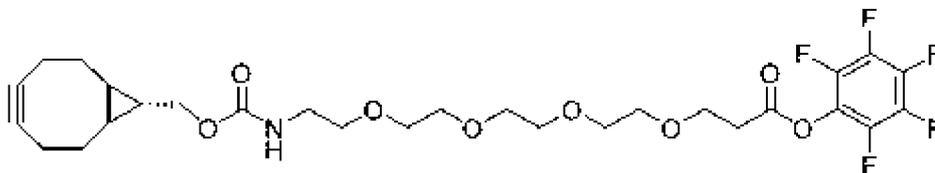
№^{6,29В}-ацилированные аналог 2, аналог 3 и аналог 4 RHI были получены для использования при конструировании димеров с использованием "клик"-химии, и они были получены с использованием общего способа А или процедуры, аналогичной описанной в примере 4, но с заменой на рекомбинантный человеческий инсулин и



(2,5-диоксопирролидин-1-илпент-4-иноат; линкер 4);



(2,5-диоксопирролидин-1-ил-азидопентаноат; линкер 5); или



(перфторфенил-1-(бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)-3-оксо-2,7,10,13,16-пентаокса-4-азанонадекан-19-оат) (линкер 6) для создания аналога 2, аналога 3 или аналога 4, соответственно. Аналоги были охарактеризованы с использованием СВЭЖХ-МС, способ D, за исключением аналога 5, который был охарактеризован с использованием СВЭЖХ-МС, способ F.

Аналог	Связывающий фрагмент	Rt (мин)	(M+4)/4
2		4,08	1472,56
3		4,10	1483,89
4		3,94	1558,58

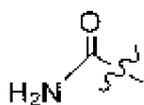
Волнистая линия обозначает связь с эпсилон-аминогруппой B29 Lys инсулиновой молекулы.

ПРИМЕР 7

Описан синтез $N^{2,1A}, N^{2,1B}$ -бис(карбамоил)-человеческого инсулина (аналог 5).

К суспензии RHI (1 г, 0,172 ммоль) в воде (50 мл) добавляли раствор двухосновного фосфата калия, (0,249 г, 1,429 ммоль) в воде (5,0 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 30 минут к полученной смеси добавляли цианат калия (0,279 г, 3,44 ммоль). Реакционную смесь оставляли

перемешиваться в течение 16 часов. Для того, чтобы остановить реакцию, непрореагировавший цианат калия удаляли с помощью TFF с использованием устройства для диафильтрации MWC0 3K, и продукт выделяли в виде твердого вещества посредством лиофилизации. Продукт содержал приблизительно 10-35% A1/B1/B29-трис-мочевина-RH1, который, необязательно, мог быть удален с помощью хроматографии с обращенной фазой на фазе C8 (колонка KROMASIL, C8 10 мкм 100 Å, 250×50 мм; растворитель A=вода/0,05% ТФУ, растворитель B=AcCN/0,05% ТФУ), скорость потока=85 мл/мин, градиент B в A 26-34% в течение 30 мин). СВЭЖХ-МС, способ D: Rt=4,29 мин, m/z=1474,6 (z=4). N-концевой заместитель имеет структуру

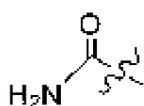


(карбамоил), причем волнистая линия обозначает связь между заместителем и азотом N2 N-концевой аминокислоты.

ПРИМЕР 8

Описан синтез N^{2,1A},N^{2,1B}-бис(карбамоил)-desB30-человеческого инсулина (аналог 6).

Указанное в заголовке соединение получали с помощью процедуры, аналогичной описанной в примере 7, заменяя RH1 на desB30 инсулин. СВЭЖХ-МС, способ D: Rt=4,10 мин, m/z=1448,9 (z=4). N-концевой заместитель имеет структуру

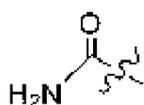


(карбамоил), причем волнистая линия обозначает связь между заместителем и азотом N2 N-концевой аминокислотой.

ПРИМЕР 9

Описан синтез N^{2,1A},N^{2,1B}-бис(карбамоил)-инсулина лизпро (аналог 7).

Указанное в заголовке соединение получали с помощью процедуры, аналогичной описанной в примере 7, заменяя RH1 на инсулин лизпро. СВЭЖХ-МС, способ D: Rt=4,07 мин, m/z=1473,6 (z=4). N-концевой заместитель имеет структуру



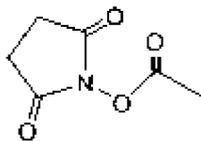
(карбамоил), причем волнистая линия обозначает

связь между заместителем и азотом N^2 N -концевой аминокислоты.

ПРИМЕР 10

Описан синтез $N^{2,1A}$ -ацетил-человеческий инсулин (аналог 8).

К раствору RHI (400 мг, 0,069 ммоль) в ДМСО (4,6 мл) добавляли по каплям раствор 2,5-диоксопирролидин-1-илацетата



(10,82 мг, 0,069 ммоль) в 100 мкл ДМСО. После перемешивания в течение 3 часов реакционную смесь разбавляли водой (95 мл), подкисляли до тех пор, пока pH не становился равен приблизительно 3, и затем диафильтровали через Amicon Ultra-15 Centrifugal Units с мембраной 3 или 10K MWCO для удаления большей части ДМСО. Получаемый раствор вначале подвергали ионообменной хроматографии (колонка PolySULFOETHYL A, PolyLC Inc., 250×21 мм, 5 мкм, 1000 Å, скорость потока 15 мл/мин; буфер А: 0,1% (об/об) H_3PO_4 /25% АсСN; буфер В: 0,1% (об/об) H_3PO_4 /25% АсСN/0,5М NaCl) с использованием градиента 10-40% буфера В в буфере А в течение 24 минут. Фракции, содержащие желаемый $N^{2,1A}$ -ацетил-RHI объединяли и концентрировали, а затем подвергали хроматографии с обращенной фазой на (KROMASIL, C8 10 мкм 100 Å, 250×50 мм; растворитель А=вода/0,05% ТФУ, растворитель В=АсСN/0,05% ТФУ, градиент 26-30% В в А). Положение модификации подтверждали с использованием анализа с помощью ДТТ. СВЭЖХ-МС, способ D: $R_t=3,5$ мин и $m/z=1463,5$ ($z=4$). N -концевой заместитель имеет структуру



(ацетил), причем волнистая линия обозначает связь между заместителем и азотом N^2 N -концевой аминокислоты.

ПРИМЕР 11

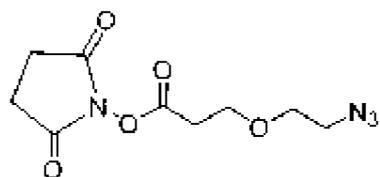
Описан синтез $N^{2,1A}, N^{2,1B}$ -бис(карбамоил)- $N^{6,29B}$ -ацилированного RHI.

Аналог 5, конъюгированный или с 2,5-диоксопирролидин-1-ил-азидопентаноатом (линкер 5) для создания аналога 9, или с 2,5-диоксопирролидин-1-илпент-4-иноатом (линкер 4) для создания аналога 10, получали с использованием общего способа А или

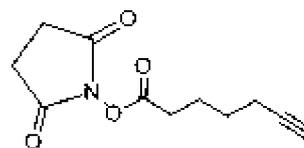
процедуры, аналогичной описанной в примере 4.

ПРИМЕР 12

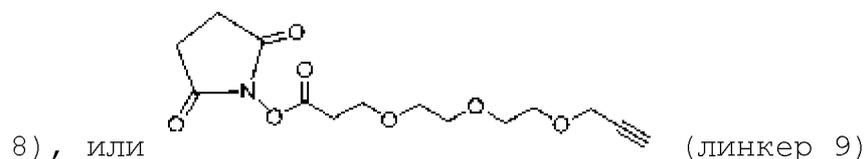
Следующие №^{6,29В}-ацилированные аналоги RHI (аналог 11, аналог 12 и аналог 13) были получены для использования при конструировании димеров с использованием "клик"-химии. Аналоги были получены с использованием общего способа А или процедуры, аналогичной описанной в примере 4, но с заменой на рекомбинантный человеческий инсулин (RHI) и соответствующий связывающий фрагмент, выбранный из



(линкер 7),



(линкер 8),



8), или (линкер 9)

для создания аналога 11, аналога 12 или аналога 13, соответственно. Аналоги были охарактеризованы с использованием СВЭЖХ-МС, способ D, за исключением аналога 12, который был охарактеризован с использованием СВЭЖХ-МС, способ F.

Таблица 2

Анало г	Связывающий фрагмент	Rt (мин)	(M+4) / 4
11		3,26	1488,11
12		3,97	1479,30
13		3,27	1502,26

Волнистая линия обозначает связь с эпсилон-аминогруппой B29 Lys инсулиновой молекулы.

ПРИМЕР 13

Общий способ В: Синтез димеров №^{6,29В}, №^{6,29В'}-инсулинов в

условиях органического основания

В контейнере соответствующего размера инсулин или аналог инсулина суспендируют при комнатной температуре в органическом растворителе или смешанном водном (водн.)/органическом растворителях, например ДМСО, в присутствии основания, например ТЭА. Смесь оставляют осторожно перемешиваться до тех пор, пока инсулин полностью не растворится. К полученному раствору добавляют активированный сложноэфирный интермедиат (линкер) в растворе органических растворителей, таких как ДМСО или ДМФ. После этого хроматограмма СВЭЖХ показывает, что существенная часть реакционной смеси превратилась в димер №^{6,29В}, №^{6,В29В'}-инсулинов (или в димер №^{6,28В}, №^{6,28В'}-инсулина лизпро). Реакционная смесь может быть подвергнута непосредственно очистке с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка Waters С4 250×50 мм, 10 мкм, 1000 Å, или колонка KROMASIL С8 250×50 мм, 10 мкм, 100 Å; буфер А: 0,05–0,1% ТФУ в деионизированной воде; буфер В: 0,05–0,1% ТФУ в АсСN), или реакция может быть остановлена аккуратным разбавлением холодной кислой Н₂О (20х, рН приблизительно 3,0) при 0°С, и ее рН доводят до конечного рН 2,5 с использованием 1 н НСl (и 0,1 н NaOH при необходимости). Раствор может вначале быть сконцентрирован с помощью ультрафильтрации или с помощью системы фильтрации в тангенциальном потоке (ТFF), или с использованием Amicon Ultra-15 Centrifugal Units с мембраной 1К, 3К или 10К МWCO. Концентрированный раствор обычно вначале подвергают ионообменной хроматографии (колонка PolySULFOETHYL А, PolyLC Inc., 250×21 мм, 5 мкм, 1000 Å; буфер А: 0,1% (об/об) НЗРО4/25% АсСN; буфер В: 0,1% (об/об) НЗРО4/25% АсСN/0,5 М NaCl). Фракции, содержащие В29-конъюгат с желаемой чистотой, объединяют и концентрируют с использованием системы ТFF или Amicon Ultra-15. Концентрированный раствор затем подвергают очистке с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка Waters С4 250×50 мм, 10 мкм, 1000 Å, или колонка KROMASIL С8 250×50 мм, 10 мкм, 100 Å; буфер А: 0,05–0,1% ТФУ в деионизированной воде; буфер В: 0,05–0,1% ТФУ в АсСN). Фракции, содержащие желаемый инсулиновый димер, объединяют и сушат вымораживанием или заменяют буфер с

использованием системы TFF и/или Amicon Ultra-15 с получением димеров №,29В, №,29В'-инсулинов.

ПРИМЕР 14

Общий способ С: Синтез димеров №,29В, №,29В'-инсулинов в условиях водного основания.

В контейнере соответствующего размера растворяют инсулин или аналог инсулина при слабом перемешивании при комнатной температуре в смешанном растворителе: 2:3 об/об 0,1 М Na₂CO₃:AcCN. После того, как смесь становится прозрачной, pH доводят до значения 10,5-10,8 с использованием щелочного раствора, например 0,1 н NaOH. В отдельном флаконе активированный сложноэфирный интермедиат (линкер) растворяют в органическом растворителе, например ДМСО, при комнатной температуре. Аликвоты раствора активированного сложного эфира добавляют в течение некоторого периода времени к раствору, содержащему инсулин, до тех пор, пока хроматограмма СВЭЖХ не покажет, что большая часть немодифицированного инсулина прореагировала, и что существенная часть реакционной смеси превратилась в димер №,В29, №,В29'-инсулинов (или димер №,28В, №,28В - инсулина лизпро). Реакцию останавливают добавлением аминного нуклеофила, например 2-аминоэтанола. Реакционный раствор перемешивают при rt в течение 30 минут. Получаемый раствор аккуратно разбавляют холодной H₂O (20x) при 0°C, и его pH доводят до конечного pH 2,5 с использованием 1 н HCl (и 0,1 н NaOH при необходимости). Раствор вначале концентрируют с помощью ультрафильтрации или с помощью системы фильтрации в тангенциальном потоке (TFF), или с использованием Amicon Ultra-15 Centrifugal Units с мембраной 1K, 3K или 10K MWCO. Концентрированный раствор обычно вначале подвергают ионообменной хроматографии (колонка PolySULFOETHYL A, PolyLC Inc., 250×21 мм, 5 мкм, 1000 Å; буфер А: 0,1% (об/об) H₃PO₄/25% AcCN; буфер В: 0,1% (об/об) H₃PO₄/25% AcCN/0,5 М NaCl). Фракции, содержащие В29-конъюгат с желаемой чистотой, объединяют и концентрируют с использованием системы TFF или Amicon Ultra-15. Получаемый раствор затем дополнительно очищают с помощью ВЭЖХ с обращенной

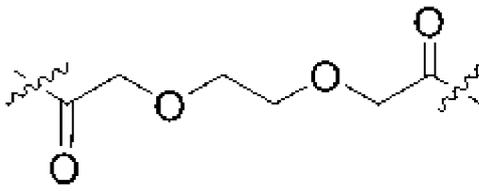
фазой (колонка Waters C4 250×50 мм, 10 мкм, 1000 Å, или колонка KROMASIL C8 250×50 мм, 10 мкм, 100 Å; буфер А: 0,05–0,1% ТФУ в воде; буфер В: 0,05–0,1% ТФУ в АсСN). Фракции, содержащие указанный в заголовке инсулиновый димер, объединяют и сушат вымораживанием или заменяют буфер с использованием системы TFF и/или Amicon Ultra-15 с получением димеров №^{6,29В}, №^{6,29В'}-инсулинов.

ПРИМЕР 15

Данный пример иллюстрирует синтез №^{6,В29}, №^{6,В29'}-(2,2'-(этан-1,2-диилбис(окси))диацетил)бис[человеческого инсулина] (димер 1).

Растворяли RHI (2,6 г, 0,448 ммоль) в смеси Na₂CO₃ (0,1 М) (15,8 мл) и АсСN (10,5 мл) и добавляли 0,895 мл (0,179 ммоль) 0,2М раствора бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-2,2'-(этан-1,2-диилбис(окси))диацетата (линкер 8) в ДМФ. Перемешивали реакционную смесь в течение 30 мин, добавляли дополнительную порцию 0,895 мл (0,179 ммоль) 0,2М раствора бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-2,2'-(этан-1,2-диилбис(окси))диацетата в ДМФ и перемешивали реакционную смесь еще в течение 30 мин. Выливали реакционную смесь в 60 мл 20% АсСN/0,1% ТФУ/вода, доводили рН до 2,5 и диафильтровали с использованием Amicon Ultra-15 с мембраной 10K MWCO для концентрирования до тех пор, пока получаемый объем не составлял приблизительно 10 мл. Получаемый раствор подвергали ионообменной хроматографии (колонка PolySULFOETHYL A, 250×21 мм, 5 мкм, 1000 Å, градиент 10–80% буфера В в буфере А в течение 30 мин; буфер А: 0,1% (об/об) Н₃РО₄/25% АсСN; буфер В: 0,1% (об/об) Н₃РО₄/25% АсСN/0,5М NaCl). Фракции, содержащие указанное в заголовке соединение, объединяли и концентрировали. Получаемый раствор затем подвергали хроматографии с обращенной фазой (колонка KROMASIL C8 250×50 мм, 10 мкм, 100 Å; градиент 27–35% of АсСN с 0,05% ТФУ в воде с 0,05% ТФУ). СВЭЖХ-МС, способ Е: Rt=2,75 мин, m/z=1960,4 (z=6), 1680,4 (z=7).

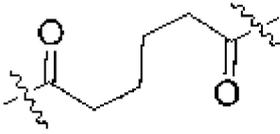
№ димер а	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина В29 и В29'	Тип инсулина; N-концы	Rt (мин)	(M+6)/6 или (M+7)/7

		инсулина		
1		RHI; A1, A1', B1, B1' = H	2,75	1960,4
Волнистая линия обозначает связь с эpsilon-аминогруппой B29 Lys и B29' Lys, соответственно.				

ПРИМЕР 16

Данный пример иллюстрирует синтез $N^{2,1A}, N^{2,1A'}, N^{2,1B}, N^{2,1B'}$ -тетраakis (карбамоил) - $N^{6, B29}, N^{6, B29'}$ - (гександиоил) бис [человеческого инсулина] (димер 2).

Растворяли $N^{2,1A}, N^{2,1B}$ -бис (карбамоил) -RHI (150 мг, 0,025 ммоль) в ДМСО (1 мл), и добавляли триэтиламин (0,106 мл, 0,764 ммоль), а затем по каплям добавляли ди(*N*-сукцинимидил)адипат (линкер 12) (4,33 мг, 0,013 ммоль), растворенный в 100 мкл ДМСО. Перемешивали 1 час, и выливали реакцию смесь в 20 мл воды. Подкисляли до pH=2 и диафильтровали с использованием 10K Amicon Ultra 15. Продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии с использованием градиента 10-40% растворителя В в растворителе А в течение 24 минут и повторно очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой на фазе С-8, градиент В в А 26-36% в течение 30 минут. СВЭЖХ-МС, способ Е: $R_t=3,75$ мин, $m/z=1983,9$, ($z=6$).

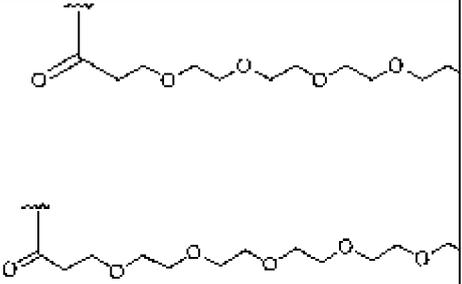
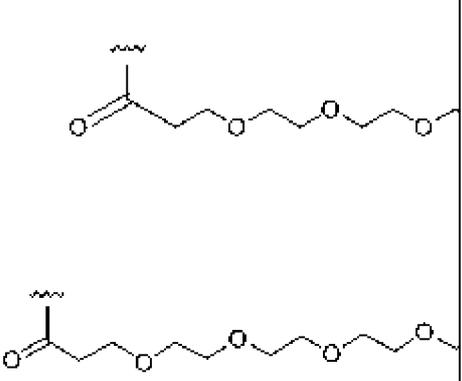
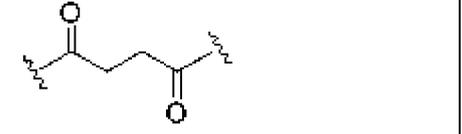
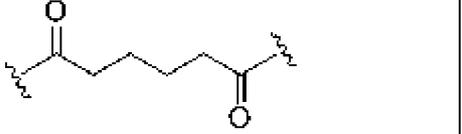
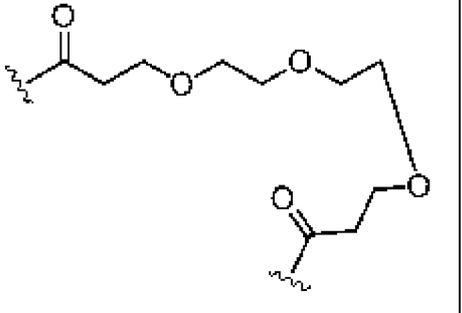
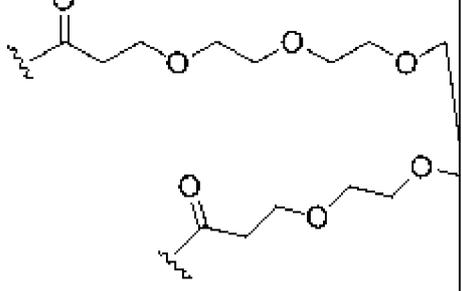
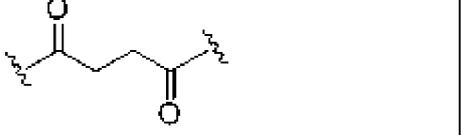
№ димера	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина B29 и B29'	Тип инсулина; N-концы инсулина	Rt (мин)	(M+6)/6 или (M+7)/7
2		RHI; A1, A1', B1, B1' = карбамоил	3,75	1983,9
Волнистая линия обозначает связь с эpsilon-аминогруппой B29 Lys и B29' Lys, соответственно.				

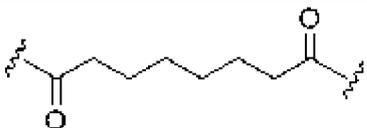
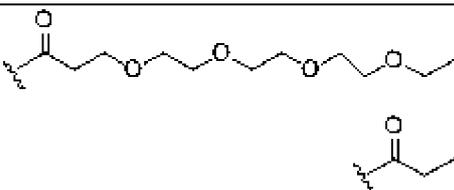
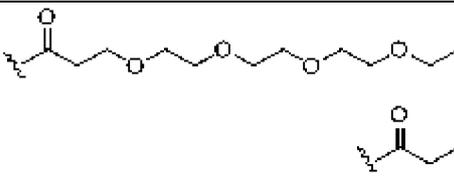
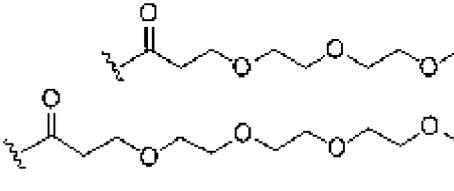
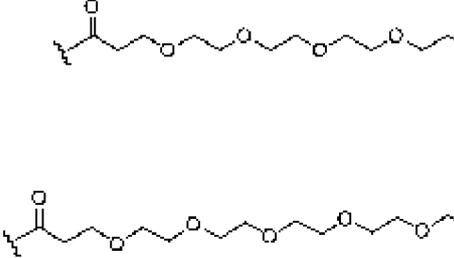
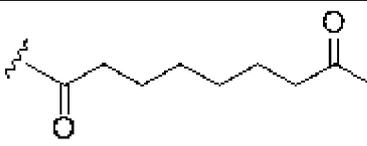
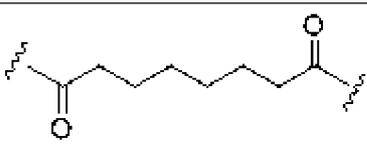
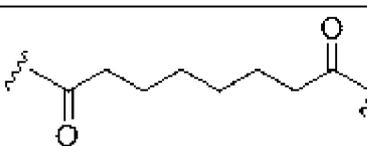
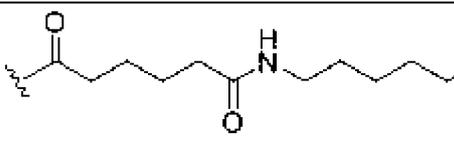
ПРИМЕРЫ 17

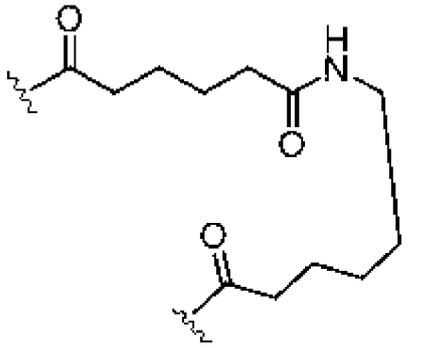
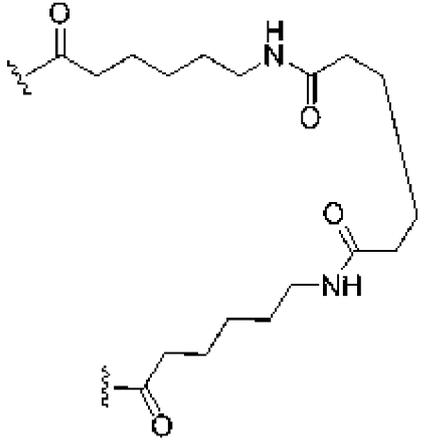
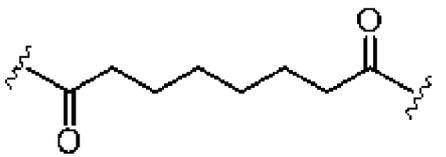
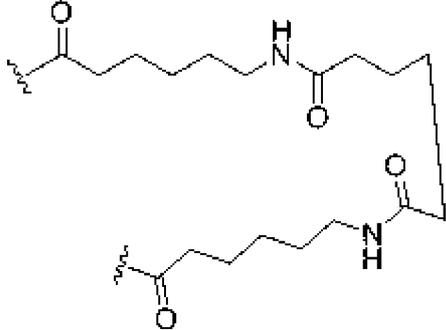
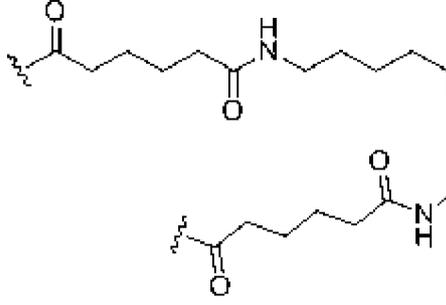
Таблица 3 показывает димеры, которые были получены с

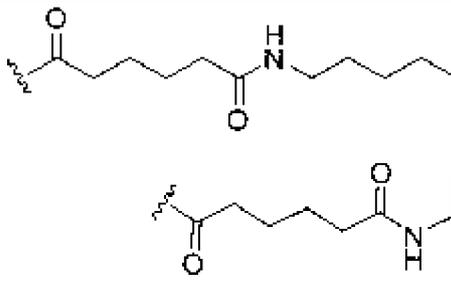
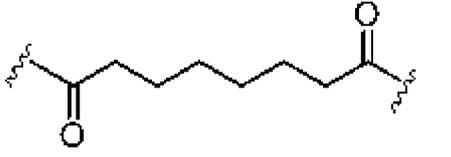
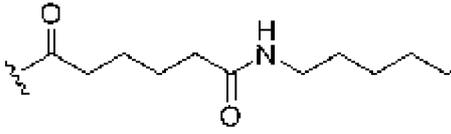
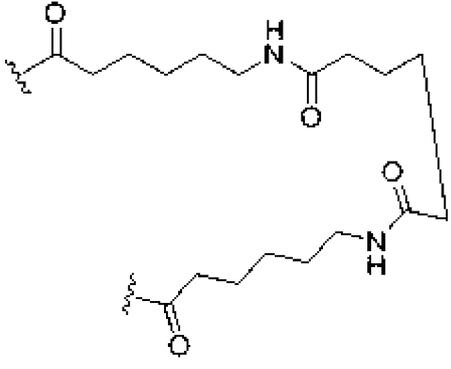
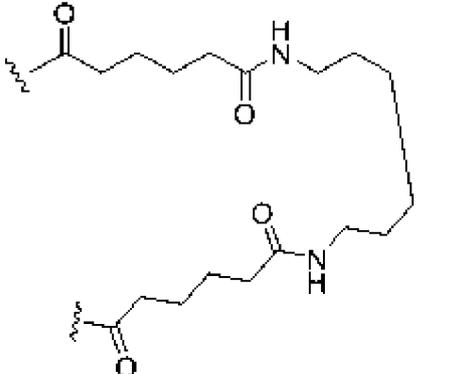
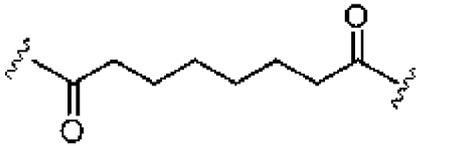
использованием соответствующих интермедиатов (линкеров) в соответствии или с общим способом В, или с общим способом С, как указано, с использованием RHI, DesB30 RHI, инсулина лизпро, инсулина аспарта, инсулина гларгина или соответствующего аналога. Например, для димеров с карбамоилированными N-концами использовали аналог 5 или аналог 6 (DesB30); для димеров с ацетилированным по A1 N-концами использовали аналог 8. Димеры были охарактеризованы с использованием СВЭЖХ-МС, способ D, или СВЭЖХ-МС, способ E, причем они продемонстрировали шестизарядные, то есть $[(M+6)/6]$, (или семизарядные, то есть $[(M+7)/7]$) частицы родительского соединения при определенном времени удерживания (R_t). Инсулин и молекулы инсулина, связанные вместе с помощью связывающего фрагмента, являются одинаковыми для каждого из димеров, приведенных в таблице 3.

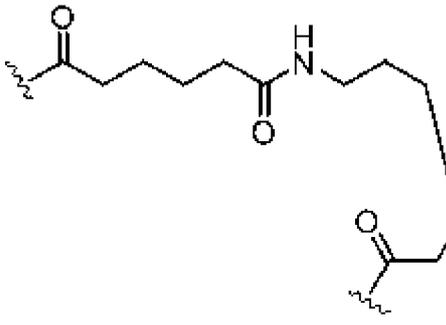
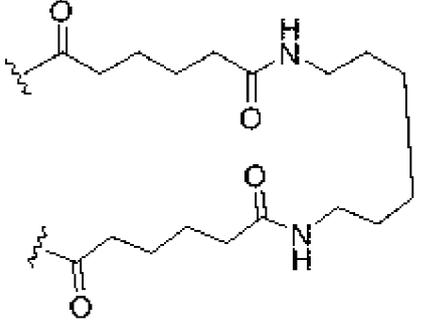
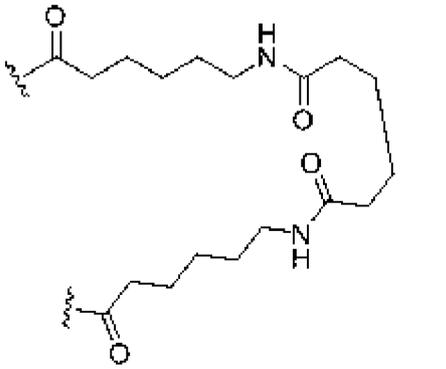
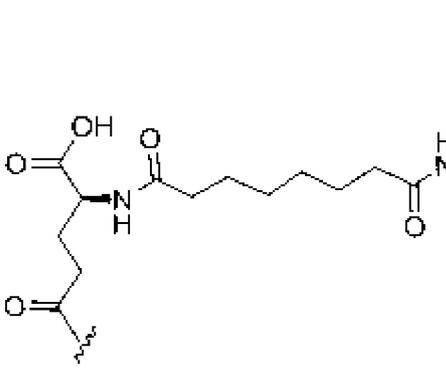
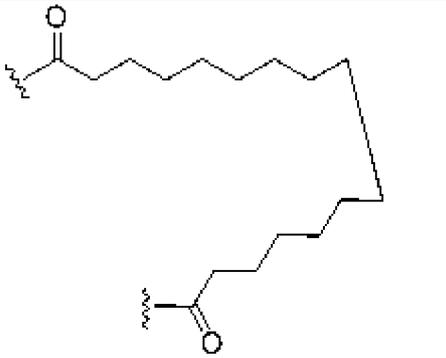
Таблица 3					
№ димера	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина B29 и B29'	Тип инсулина; N-концы инсулина	Способ	R_t (мин)	$(M+6)/6$ или $(M+7)/7$
3		RHI; A1, B1, A1', B1' '=карбамоил	В	4,41	1988,745
4		RHI; A1, B1, A1', B1' '=H	С	3,76	1986,88
5		RHI; A1, B1, A1', B1' '=H	С	3,74	1972,6
6		RHI; A1, B1, A1', B1' '=H	С	3,80	1754,2

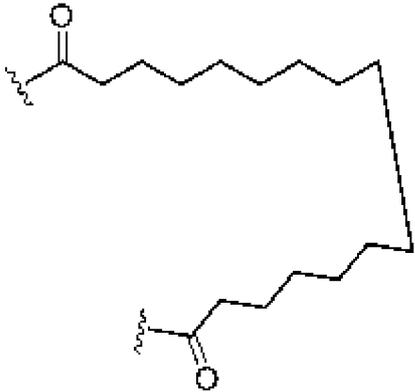
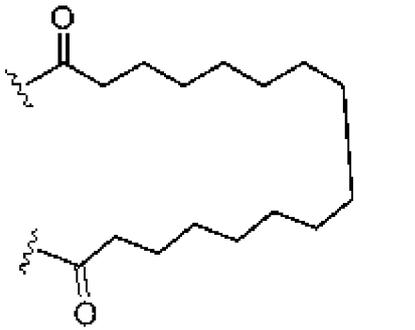
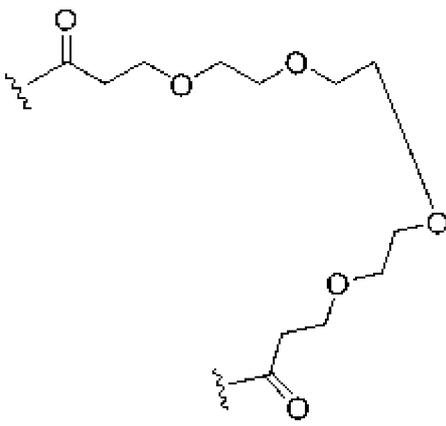
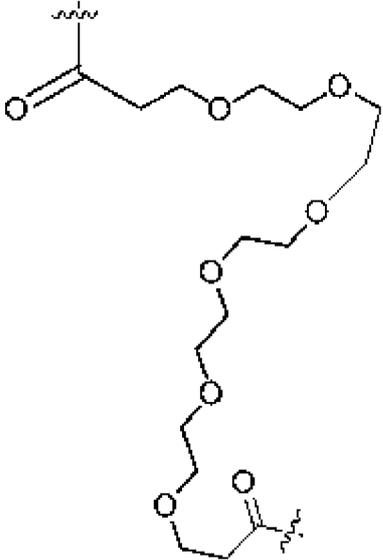
					
7		RHI; A1, B1, A1', B1 '=H	C	3,87	1728,8
8		RHI; A1, B1, A1', B1 '=H	C	3,70	1950,65
9		RHI; A1, B1, A1', B1 '=H	C	3,70	1954,9
10		RHI; A1, B1, A1', B1 '=карбамоил	B	3,97	1715,3
11		RHI; A1, B1, A1', B1 '=карбамоил	B	3,98	1727,9
12		RHI; A1, B1, A1', B1 '=карбамоил	B	3,73	1978,8

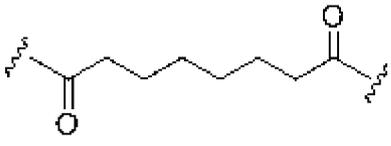
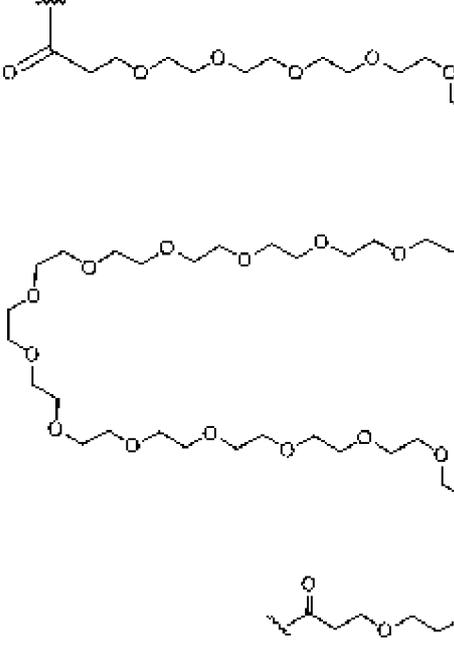
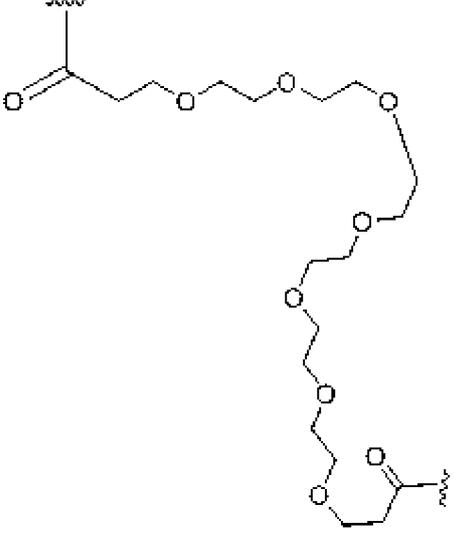
13		RHI; A1, A1'=ацетил , B1, B1'=H	B	3,83	1973,8
14		RHI; A1, B1, A1', B1' '=карбамоил	B	4,10	1740,5
15		RHI; A1, B1, A1', B1' '=H	C	3,97	1716,0
16		RHI; A1, B1, A1', B1' '=карбамоил	B	3,80	1752,4
17		RHI; A1, B1, A1', B1' '=карбамоил	B	4,13	1778,7
18		Инсулин лизпро; A1, B1, A1', B1' '=H	C	3,74	1960,54
19		Инсулин аспарт; A1, B1, A1', B1' '=H	C	3,74	1966,13
20		RHI desB30; A1, B1, A1', B1' '=H	C	4,57	1926,04
21		RHI; A1, B1, A1', B1' '=карбамоил	B	4,48	1716,7

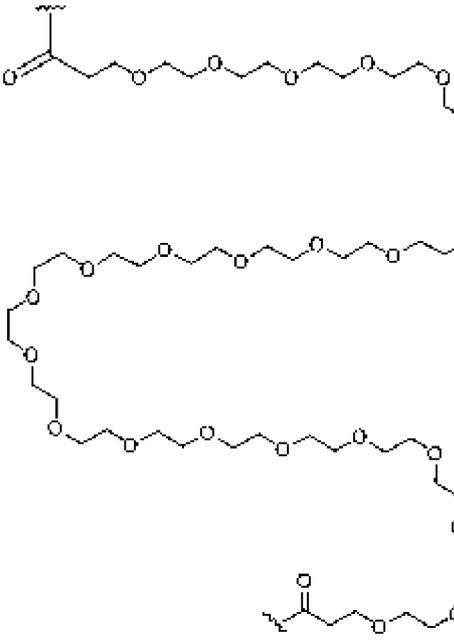
22		RHI; A1, B1, A1', B1 '=H	C	4, 32	1974, 06
23		RHI; A1, B1, A1', B1 '=карбамоил	B	3, 38	1733, 11
24		RHI; A1, B1, A1', B1 '=карбамоил	B	3, 59	1988, 4
25		RHI; A1, B1, A1', B1 '=H	C	4, 31	1708, 35
26		RHI; A1, B1, A1', B1 '=H	C	4, 08	1993, 02

27		RHI; A1, B1, A1', B1 '=карбамоил	B	4,18	1732,48
28		RHI desB30; A1, B1, A1', B1 '=карбамоил	B	3,86	1954,9
29		RHI desB30; A1, B1, A1', B1 '=H	C	3,75	1940,76
30		RHI desB30; A1, B1, A1', B1 '=H	C	3,77	1959,02
31		RHI desB30; A1, B1, A1', B1 '=H	C	4,00	1959,4
32		Инсулин лизпро; A1, B1, A1', B1 '=карбамоил	B	3,81	1988,42

33		Инсулин лизпро; A1, B1, A1', B1 '=H	C	3,70	1974,04
34		Инсулин лизпро; A1, B1, A1', B1 '=H	C	3,80	1992,89
35		Инсулин лизпро; A1, B1, A1', B1 '=H	C	3,76	1992,86
36		RHI; A1, B1, A1', B1 '=H	C	4,29	1717,28
37		RHI; A1, B1, A1', B1 '=карбамоил	B	4,01	1720,6

38		RHI desB30; A1, B1, A1', B1 '=H	C	3, 88	1944, 96
39		RHI; A1, B1, A1', B1 '=H	C	3, 87	1978, 88
88		RHI; A1, B1, A1', B1 '=H	D	3, 39	1697, 36
76		RHI; A1, B1, A1', B1 '=H	D	3, 50	1709, 73

83		Инсулин аспарт; A1, B1, A1', B1 '=карбамоил	B	3, 50	1994, 39
85		RHI; A1, B1, A1', B1 '=H	D	3, 46	1829, 31
53		Инсулин гларгин; A1, B1, A1', B1 '=H	D	3, 37	1788, 87

87		Инсулин гларгин; A1, B1, A1', B1 '=H	D	3, 43	1902, 16
Волнистая линия обозначает связь с эpsilon-аминогруппой B29 Lys и B29' Lys, соответственно.					

ПРИМЕР 18

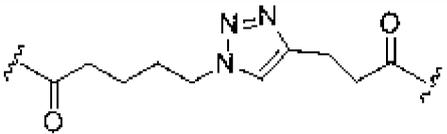
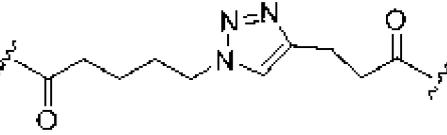
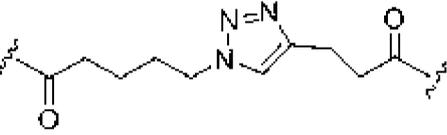
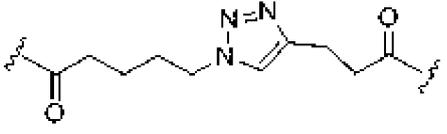
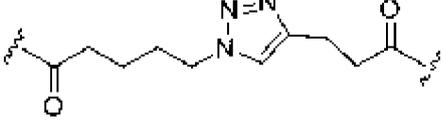
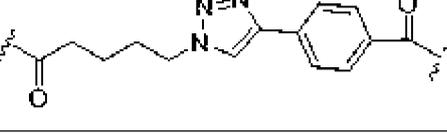
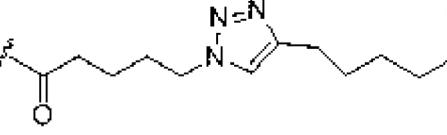
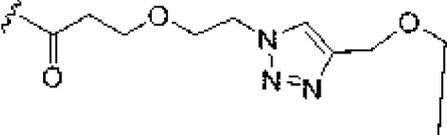
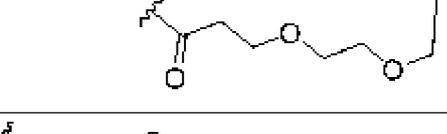
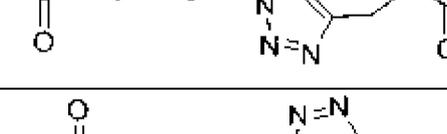
Общий способ D: Синтез димеров №^{6,29B}, №^{6,29B'}-инсулинов с использованием Cu²⁺-катализируемой клик-химии.

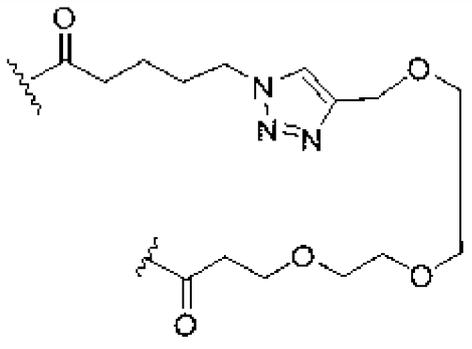
В контейнере соответствующего размера растворяли соответствующий содержащий ацетилен инсулиновый интермедиат (аналог) при слабом перемешивании при комнатной температуре в смешанном растворителе из ДМСО и водн. триэтиламмоний-ацетатного буфера (pH 7,0, конечная концентрация 0,2 мМ). В другом контейнере соответствующего размера растворяли соответствующий азидо-содержащий инсулиновый интермедиат (аналог) при слабом перемешивании при rt в смешанном растворителе из ДМСО и воды. Оба раствора объединяли, тщательно смешивали, дегазировали посредством осторожного барботирования с помощью N₂. К полученному раствору добавляли свежеприготовленный аскорбат натрия или раствор аскорбиновой кислоты (конечная концентрация составляет 0,5 мМ) и, после тщательного смешивания, раствор 10 мМ CuSO₄ и трис[(1-бензил-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил]амин (то есть, лиганда ТВТА) в 55% ДМСО. После дегазирования посредством осторожного барботирования с помощью N₂ и тщательного смешивания смесь хранили при rt с периодическим перемешиванием в течение ночи. Реакционную смесь аккуратно разбавляли смешанным

растворителем (об/об 7:3 AcCN/вода с 0,05% ТФУ) при 0°C, и pH доводили до 2,50 с использованием 0,1, 1,0 н HCl (и 0,1 н NaOH при необходимости). Раствор сначала концентрировали с помощью ультрафильтрации или с помощью системы фильтрации в тангенциальном потоке (TFF), или с использованием Amicon Ultra-15 Centrifugal Units с мембраной 1K, 3K или 10K MWCO. Концентрированный раствор обычно сначала подвергали ионообменной хроматографии (колонка PolySULFOETHYL A, PolyLC Inc., 250×21 мм, 5 мкм, 1000 Å; буфер А: 0,1% (об/об) H₃PO₄/25% AcCN; буфер В: 0,1% (об/об) H₃PO₄/25% AcCN/0,5 М NaCl). Фракции, содержащие желаемый продукт с желаемой чистотой, объединяли и концентрировали с использованием системы TFF или Amicon Ultra-15. Затем получаемый раствор дополнительно очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка Waters C4 250×50 мм, 10 мкм, 1000 Å, или колонка KROMASIL C8 250×50 мм, 10 мкм, 100 Å; буфер А: 0,05–0,1% ТФУ в воде; буфер В: 0,05–0,1% ТФУ в AcCN). Фракции, содержащие желаемый продукт с желаемой чистотой, объединяли и сушили вымораживанием или заменяли буфер с использованием системы TFF и/или Amicon Ultra-15 с получением инсулиновых димеров.

Таблица 4 перечисляет димеры 40, 41, 45, 46, 47, 59, 57, 79, 80, 82 и 84, которые были получены с использованием соответствующих интермедиатов в соответствии с общим способом D. Эти димеры были охарактеризованы с использованием СВЭЖХ-МС, способ D, или СВЭЖХ-МС, способ E, или СВЭЖХ-МС, способ G, причем они продемонстрировали шестизарядные, то есть [(M+6)/6], (или семизарядные, то есть [(M+7)/7]) частицы родительского соединения при определенном времени удерживания (Rt).

Таблица 4					
№ димера	Остов первого инсулина	Остов второго инсулина (')	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина В29 и В29'	Rt (мин)	(M+6)/6 или (M+7)/7

40	Аналог 3	Аналог 2		3,83	1970,38
41	Аналог 1	Аналог 2		3,88	1938,84
45	Аналог 9	Аналог 2		4,28	1985,30
46	Аналог 3	Аналог 10		4,50	1985,43
47	Аналог 9	Аналог 10		4,59	1714,34
75	Аналог 3	Аналог 2		3,40	1696,35
57	Аналог 3	Аналог 12		3,57	1975,90
79	Аналог 11	Аналог 13		3,38	1993,39
80	Аналог 11	Аналог 2		3,37	1973,83
82	Аналог 11	Аналог 12		3,34	1978,33

84	Аналог 3	Аналог 13		3,40	1990,54
Волнистая линия обозначает связь с эпсилон-аминогруппой B29 Lys и B29' Lys, соответственно.					

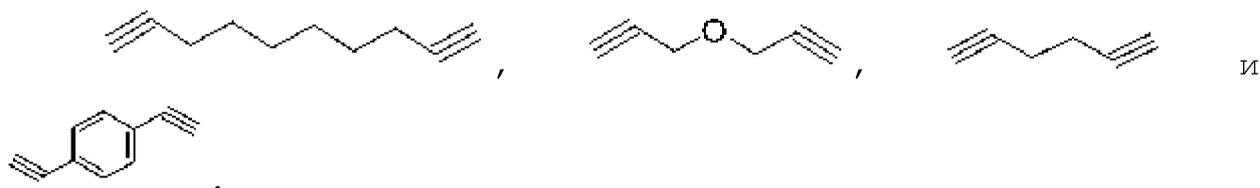
ПРИМЕР 19

Общий способ E: Синтез димеров N^{6,29B}, N^{6,29B'}-инсулинов с использованием Cu²⁺-катализируемой двойной клик-химии.

В контейнере соответствующего размера растворяли соответствующий азидо-содержащий инсулиновый интермедиат (аналог) при слабом перемешивании при комнатной температуре в смешанном растворителе из ДМСО и водн. триэтиламмоний-ацетатного буфера (рН 7,0, конечная концентрация 0,2 мМ). В другом контейнере соответствующего размера растворяли соответствующий бис-ацетилен-содержащий мостиковый или промежуточный линкер при слабом перемешивании при комнатной температуре в смешанном растворителе из ДМСО и воды. Оба раствора объединяли, тщательно смешивали, дегазировали посредством осторожного барботирования с помощью N₂. К полученному раствору добавляли свежеприготовленный аскорбат натрия или раствор аскорбиновой кислоты (конечная концентрация составляет 0,5 мМ) и, после тщательного смешивания, раствор 10 мМ CuSO₄ и трис[(1-бензил-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил]амин (то есть, лиганда ТВТА) в 55% ДМСО. После дегазирования посредством осторожного барботирования с помощью N₂ и тщательного смешивания смесь хранили при комнатной температуре с периодическим перемешиванием в течение ночи. Реакционную смесь аккуратно разбавляли смешанным растворителем (об/об 7:3 АсCN/вода с 0,05% ТФУ) при 0°C, и рН доводили до 2,50 с использованием 0,1, 1,0 н HCl (и 0,1 н NaOH при необходимости). Раствор сначала концентрировали с помощью ультрафильтрации или с помощью системы фильтрации в тангенциальном потоке (TFF), или с

использованием Amicon Ultra-15 Centrifugal Units с мембраной 1K, 3K или 10K MWCO. Концентрированный раствор обычно сначала подвергали ионообменной хроматографии (колонка PolySULFOETHYL A, PolyLC Inc., 250×21 мм, 5 мкм, 1000 Å; буфер А: 0,1% (об/об) H_3PO_4 /25% AcCN ; буфер В: 0,1% (об/об) H_3PO_4 /25% AcCN /0,5 М NaCl). Фракции, содержащие желаемый продукт с желаемой чистотой, объединяли и концентрировали с использованием системы TFF или Amicon Ultra-15. Затем получаемый раствор дополнительно очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка Waters C4 250×50 мм, 10 мкм, 1000 Å, или колонка KROMASIL C8 250×50 мм, 10 мкм, 100 Å; буфер А: 0,05–0,1% ТФУ в воде; буфер В: 0,05–0,1% ТФУ в AcCN). Фракции, содержащие желаемый продукт с желаемой чистотой, объединяли и сушили вымораживанием или заменяли буфер с использованием системы TFF и/или Amicon Ultra-15 с получением инсулиновых димеров.

Таблица 5 перечисляет димеры 42–44 и 54, которые были получены с использованием соответствующих интермедиатов в соответствии с общим способом Е. Бис-ацетиленовые мостиковые или промежуточные линкеры представляли собой



Эти димеры были охарактеризованы с использованием СВЭЖХ-МС, способ D, или СВЭЖХ-МС, способ Е, причем они продемонстрировали шестизарядные, то есть $[(M+6)/6]$, (или семизарядные, то есть $[(M+7)/7]$) частицы родительского соединения при определенном времени удерживания (R_t).

Таблица 5					
№ димера	Остов первого инсулина а	Остов второго инсулина а (')	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина В29 и В29'	R_t (мин)	$(M+6)/6$ или $(M+7)/7$

42	Аналог 3	Аналог 3		4,07	1501,00
43	Аналог 3	Аналог 3		4,47	1993,95
44	Аналог 3	Аналог 3		4,22	1494,14
59	Аналог 3	Аналог 3		3,78	1714,17
Волнистая линия обозначает связь с эпсилон-аминогруппой B29 Lys и B29' Lys, соответственно.					

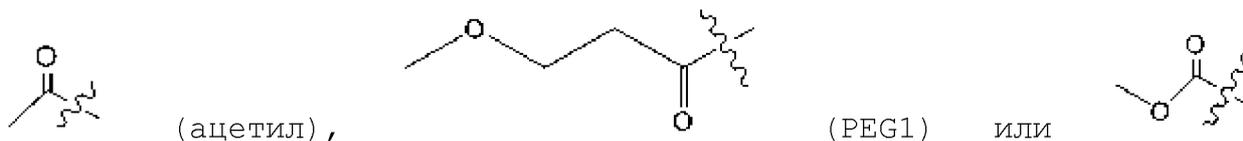
ПРИМЕР 20

Данный пример иллюстрирует синтез $N^{2,1A}, N^{2,1A'}, N^{2,1B}, N^{2,1B'}$ -тетракис(ацетил, или PEG1, или метоксиацетил)-димеров (димер 48, 55, 56, 69 и 70).

К раствору димера 40, 19 или 4 (21 мг, 1,777 мкмоль) в ДМСО (2 мл) при комнатной температуре добавляли ТЭА (3,96 мкл, 0,028 ммоль), а затем раствор 2,5-диоксопирролидин-1-илацетата (2,23 мг, 0,014 ммоль) в ДМСО (100 мкл) или другой соответствующий *N*-гидроксисукцинимидный активированный эфир (2,5-диоксопирролидин-1-илметоксиацетат или 2,5-диоксопирролидин-1-ил-PEG1-ацетат) в

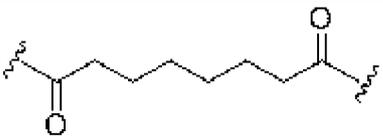
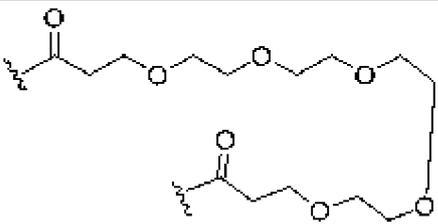
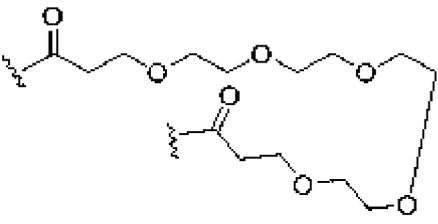
ДМСО (100 мкл). Через 3 часа реакционную смесь разбавляли с помощью 12 мл смеси вода/АсСN=7/3 с 0,1% ТФУ, и регулировали рН до тех пор, пока он не становился равен 2,5. Получаемый прозрачный раствор концентрировали с помощью Amicon Ultra 15 Centrifuge Filters с мембраной 10K MWCО. Получаемый раствор вначале подвергали ионообменной хроматографии (PolySULFOETHYL А, 250×21 мм, 5 мкм, 1000 Å, 15 мл/мин, градиент от 5% до 45% в течение 30 мин; буфер А: 0,1% (об/об) Н₃РO₄/25% ацетонитрил в воде; буфер В: 0,1% (об/об) Н₃РO₄/25% ацетонитрил/0,5 М NaCl в воде). Фракции, содержащие желаемый продукт с желаемой чистотой, объединяли и концентрировали с использованием Amicon Ultra-15 с мембраной 10K MWCО. Получаемый раствор затем подвергали ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка KROMASIL C8 250×50 мм, 10 мкм, 100 Å; буфер А: 0,05% ТФУ в АсСN/Н₂O; буфер В: 0,05% АсСN; скорость потока 85 мл/мин). Желаемые фракции объединяли и сушили вымораживанием с получением димера 48, 55, 56, 69 или 70, как показано в таблице 6. Использовали СВЭЖХ-МС, способ F или G.

N-концевые заместители имеют структуру



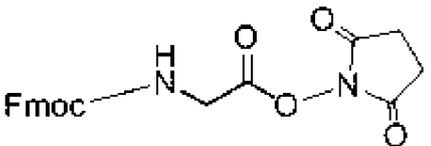
причем волнистая линия обозначает связь между заместителем и азотом N2 N-концевой аминокислоты.

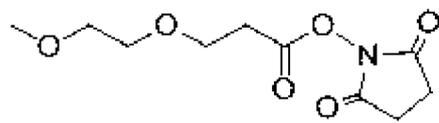
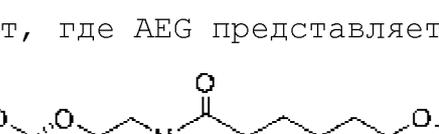
Таблица 6				
№ димера	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина В29 и В29'	Тип инсулина; N-концы инсулина	Rt (мин)	(M+6)/6 или (M+7)/7
48		RHI; A1, B1, A1', B'=ацетил	4,71	1998,93
55		RHI; A1, B1, A1', B'=ацетил	3,61	1987,97

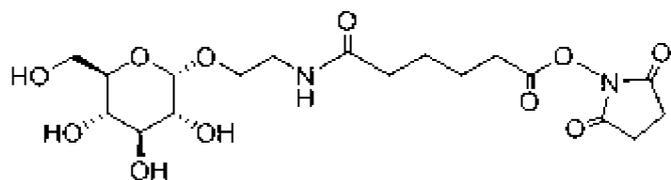
56		RHI; A1, B1, A1', B' = PEG1	3, 53	1729, 22
69		RHI; A1, B1, A1', B' = ацети л	3, 55	1727, 31
70		RHI; A1, B1, A1', B' = меток сиацетил	3, 67	1744, 71
Волнистая линия обозначает связь с эпсилон-аминогруппой B29 Lys и B29' Lys, соответственно.				

ПРИМЕР 21

Таблица 7 показывает димеры 49, 50 и 51 и показывает ацильные группы, связанные с аминогруппами $N^2, A1$, $N^2, B1$, $N^2, A1'$ и $N^2, B1'$. Эти димеры были получены из димера 40 с использованием процедур, аналогичных описанной для создания димера 48, но с заменой 2,5-диоксопирролидин-1-илацетата на соответствующие *N*-гидроксисукцинимидные активированные эфиры для получения димеров 49, 50 и 51. Активированные сложные эфиры представляли собой 2,5-диоксопирролидин-1-ил-Fmoc-

 , 2,5-диоксопирролидин-1-ил-глицинацетат

 и 2,5-диоксопирролидин-1-ил-PEG2-ацетат
 , где AEG представляет собой аминоэтилглюкозу



Эти димеры были охарактеризованы с использованием или СВЭЖ-МС, способ F (димеры

50 и 51), или СВЭЖХ-МС, способ G (димер 49), причем они продемонстрировали шестизарядные, то есть $[(M+6)/6]$, (или семизарядные, то есть $[(M+7)/7]$) частицы родительского соединения при определенном времени удерживания (R_t). Димеры приведены в таблице 7.

N-концевые заместители имеют структуру

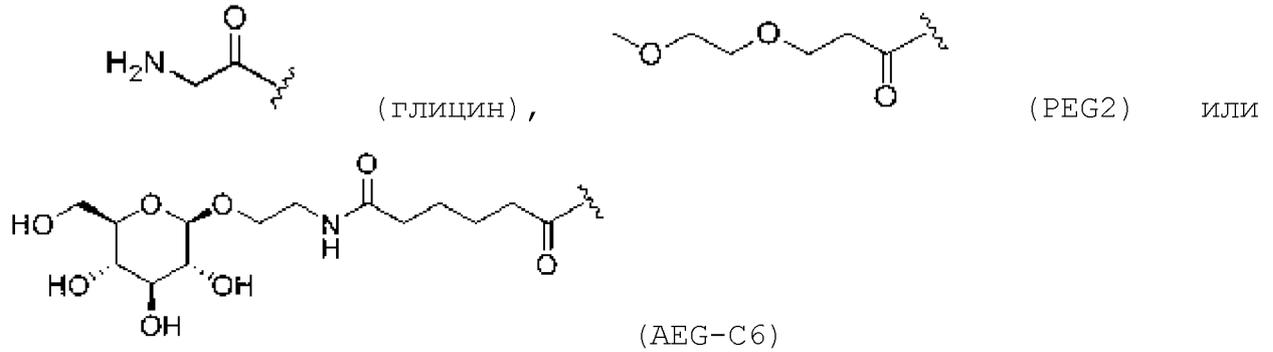
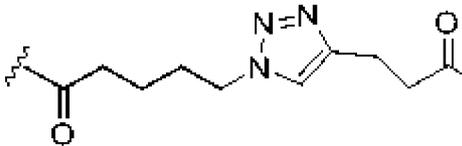
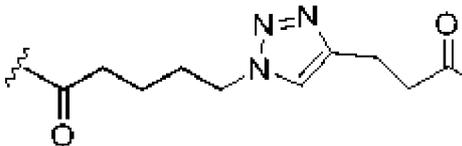
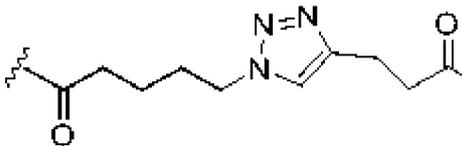


Таблица 7

№ димера	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина В29 и В29'	Тип инсулина; N-концы инсулина	R_t (мин)	$(M+6)/6$ или $(M+7)/7$
49		RHI; A1, A1', B1, B1' = глицин	3,62	1722,06
50		RHI; A1, A1', B1, B1' = PEG2	4,85	1764,16
51		RHI; A1, A1', B1, B1' = АЕМ-С6	4,06	1880,19

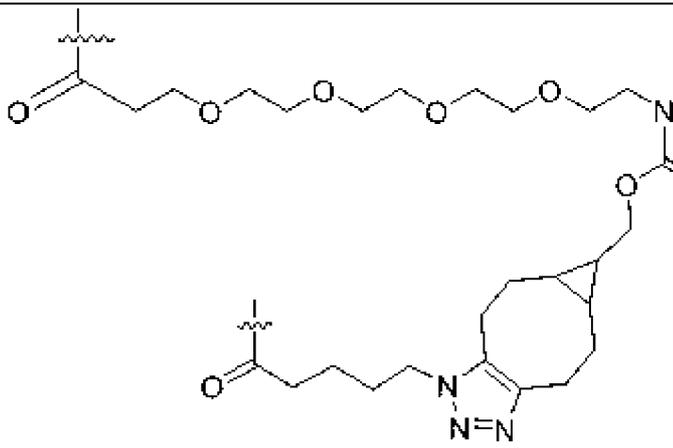
Волнистая линия обозначает связь с эпсилон-аминогруппой В29 Lys и В29' Lys, соответственно.

ПРИМЕР 22

Данный пример иллюстрирует синтез димера 52 с

использованием клик-химии без меди.

К раствору аналога 3 (10 мг, 1,686 мкмоль) в 1,0 мл 3:2 об/об H₂O/AsCN при комнатной температуре добавляли раствор аналога 4 (10,5 мг, 1,686 мкмоль) в 1,0 мл 3:2 об/об H₂O/AsCN. После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 часов реакционную смесь вначале подвергали ионообменной хроматографии (PolySULFOETHYL A, 250×21 мм, 5 мкм, 1000 Å, 15 мл/мин, градиент от 5% до 45% в 30 мин; буфер А: 0,1% (об/об) H₃PO₄/25% ацетонитрил в воде; буфер В: 0,1% (об/об) H₃PO₄/25% ацетонитрил/0,5 М NaCl в воде). Фракции, содержащие желаемый продукт с желаемой чистотой, объединяли и концентрировали с использованием Amicon Ultra-15 с мембраной 3К или 10К MWCO. Получаемый раствор затем подвергали ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка KROMASIL C8 250×50 мм, 10 мкм, 100 Å; буфер А: 0,05% ТФУ в AsCN/H₂O; буфер В: 0,05% AsCN; скорость потока 85 мл/мин). Желаемые фракции объединяли и сушили вымораживанием с получением димера 52. СВЭЖХ-МС, способ F: Rt=3,73 мин, m/z=1738,59 [(M+7)/7 +1]. Результаты приведены в таблице 8.

Таблица 8				
№ димера	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина B29 и B29'	Тип инсулина; N-концы инсулина	Rt (мин)	(M+6)/6 или (M+7)/7
52		RH1; A1, A1'=H, B1, B1'=карбамоил	3,73	1738,59
Волнистая линия обозначает связь с эpsilon-аминогруппой B29 Lys и B29' Lys, соответственно.				

ПРИМЕР 23

Данный пример иллюстрирует синтез N^{2,1A}, N^{2,1A'}, N^{2,1B}, N^{2,1B'}-

тетраakis (диметил или изобутил)-димеров (димеры 60, 58, 65 и 67).

Димер 40, 19 или 4 (100 мг, 8,46 мкмоль) растворяли (суспендировали) в воде (10 мл) и доводили pH до 4,0 с помощью раствора уксусной кислоты, затем добавляли формальдегид (0,013 мл, 0,169 ммоль) или изобутиральдегид (0,025 мл, 0,272 ммоль), за чем следовало добавление свежеприготовленного раствора цианоборгидрида натрия (10,63 мг, 0,169 ммоль) в воде (500 мкл). Образовывался преципитат. Смесь осторожно перемешивали. Через приблизительно 1 час после завершения реакции смесь аккуратно подкисляли посредством добавления 1 н HCl по каплям до pH 2,9. Суспензия становилась прозрачным раствором. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка C-8, 50×250 см, 85 мл/мин, градиент от 29% до 36% в течение 25 мин). (Вода с 0,1% ТФУ и MeCN с 0,05% ТФУ). Желаемые фракции лиофилизировали с получением димеров (19,9 мг, 1,506 мкмоль, выход 17,80%). СВЭЖХ-МС, способ D: Rt=3,31 мин, m/z=1989,44 [(M+6)/6 +1].

N-концевые заместители имеют структуру



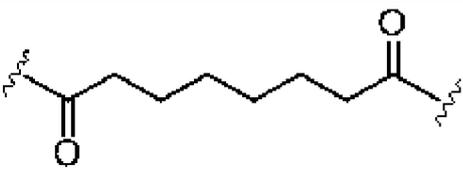
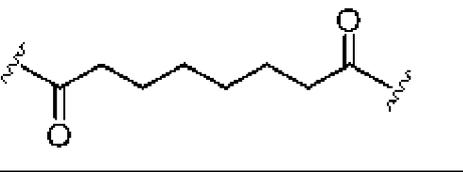
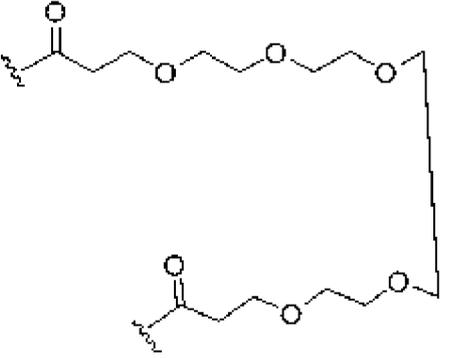
(изобутил), причем волнистая линия обозначает связь между заместителем и азотом N2 N-концевой аминокислоты,



или (N-диметил; Me₂), причем волнистая линия обозначает связь между азотом N2 и углеродом C2 N-концевой аминокислоты.

Димеры приведены в таблице 9.

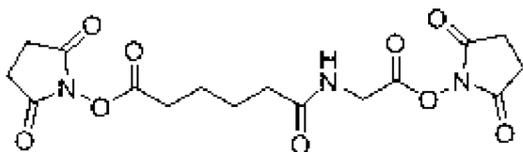
Таблица 9				
№ димера	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина B29 и B29'	Тип инсулина; N-концы инсулина	Rt (мин)	(M+6)/6 или (M+7)/7
60		RH1; A1, B1, A1', B'=Me2	3,31	1989,44

58		RH1; A1, B1, A1', B'=Me2	3, 42	1978, 48
65		RH1; A1, B1, A1', B'=изобутил	4, 13	1997, 04
67		RH1; A1, B1, A1', B'=Me2	3, 42	1719, 39
Волнистая линия обозначает связь с эпсилон-аминогруппой B29 Lys и B29' Lys, соответственно.				

ПРИМЕР 24

Синтез димеров 61, 62, 63, 64, и 66 проводили следующим образом.

Описан синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-((2-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-2-оксоэтил)амино)-6-оксогексаноата (C6-глициновый линкер; линкер 24).



Этап 1. Бензил (2,5-диоксопирролидин-1-ил) адипат

К раствору 6-(бензилокси)-6-оксогексановой кислоты (5 г, 21,16 ммоль) в ДМФ (10 мл) при 0°C добавляли *N*-этил-*N*-изопропилпропан-2-амин (4,44 мл, 25,4 ммоль), а затем TSTU (7,01 г, 23,28 ммоль). Реакцию перемешивали при 0°C в течение 1 часа и при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь выливали в смесь вода со льдом/этиловый эфир (1/1, 100 мл). Смесь экстрагировали с помощью этилового эфира (3×50 мл), промывали с помощью воды (2×10 мл) и рассола (10 мл). Органический слой сушили над MgSO₄, фильтровали через слой целита и концентрировали

с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного сиропа (5,2 г, 15,6 ммоль, 74%). ЖХ-МС 2 мин: Rt=1,05 мин, m/z=334,1 [M+1].

Этап 2- ((Карбоксиметил)амино)-6-оксогексановая кислота

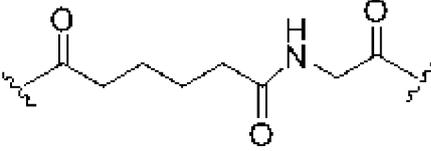
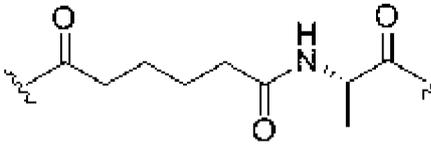
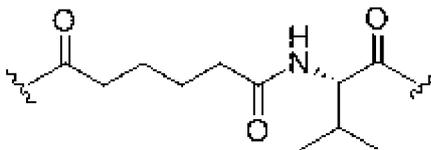
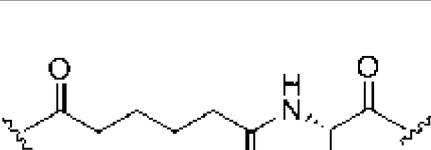
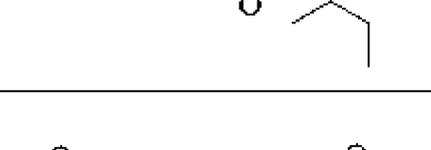
К раствору глицина (225 мг, 3,0 ммоль) в ДМФ (2,5 мл) добавляли по каплям продукт этапа 1 (1,0 г, 3,0 ммоль) в ДМФ (2,5 мл), а затем ТЭА (418 мкл, 3,0 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение 18 час. ДМФ удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством С18 хроматографии с обращенной фазой (элюировали 0-40% АсСN/вода в 16 объемах колонки (CV)). Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли, концентрировали и лиофилизировали с получением интермедиата (6-(бензилокси)-6-оксогексаноил) глицина. К вышеуказанному интермедиату в воде (3 мл) добавляли Pd/C (10%, 160 мг, 0,15 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода из баллона в течение 18 час. Смесь фильтровали через слой целита, промывали с помощью MeOH/вода (1/1, 10 мл). Фильтрат концентрировали и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения (400 мг, 2,2 ммоль, 66%). ЖХ-МС 2 мин: Rt=0,28 мин, m/z=204,03 [M+1].

Этап 3. 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-((2-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-2-оксоэтил)амино)-6-оксогексаноат

К продукту этапа 2 (10 мг, 0,049 ммоль) в ДМФ (0,5 мл) при 0°C добавляли ТЭА (0,015 мл, 0,108 ммоль), а затем TSTU (31,1 мг, 0,103 ммоль). Реакцию нагревали до комнатной температуры и перемешивали при этой температуре в течение 1 часа. ТСХ (EtOAc/MeOH/вода/АсСN: 2:1:1:1 (об:об:об:об)) демонстрировала образование желаемого продукта (Rf: 0,25), причем не оставалось исходного материала. Неочищенный материал использовали для конструирования димеров без очистки.

Линкер 25 (С6-аланин), линкер 26 (С6-изолейцин), линкер 27 (С6-лейцин) и линкер 28 (С6-валин), в которых аминокислота, содержащая С6-аминокислотный линкер, представляет собой аланин, изолейцин, лейцин и валин, соответственно, синтезировали аналогично показанному выше способу. Димеры конструировали с

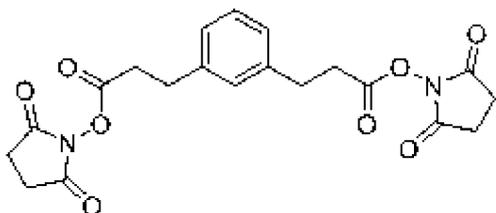
использованием вышеуказанных линкеров с использованием препаративного способа D. Результаты приведены в таблице 10.

Таблица 10				
№ димера	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина В29 и В29'	Тип инсулина; N-концы инсулина	Rt (мин)	(M+6)/6 или (M+7)/7
61		RHI; A1, B1, A1', B1'=карбамоил	3,90	1993,24
62		RHI; A1, B1, A1', B1'=карбамоил	3,91	1995,62
63		RHI; A1, B1, A1', B1'=карбамоил	4,02	1714,70
64		RHI; A1, B1, A1', B1'=карбамоил	3,80	1716,61
66		RHI; A1, B1, A1', B1'=карбамоил	3,73	1716,93
Волнистая линия обозначает связь с эпсилон-аминогруппой В29 Lys и В29' Lys, соответственно.				

ПРИМЕР 25

Синтез димеров 73, 89, 90, 91, 92 и 93 проводили следующим образом.

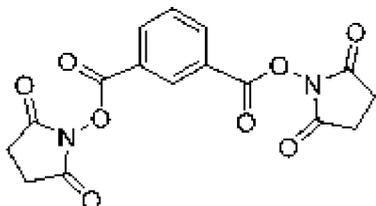
Описан синтез бис-2,5-диоксопирролидин-1-ил-3,3'-(1,3-фенилен) дипропионата (дипропилфенил; линкер 29).



Этап 1. Бис-2,5-диоксопирролидин-1-ил-3,3'-(1,3-фенилен)дипропионат

К раствору 3,3'-(1,3-фенилен)дипропионовой кислоты (21,8 мг, 0,098 ммоль) в ДМФ (0,6 мл) при 0°C добавляли ТЭА (29 мл, 0,206 ммоль), а затем TSTU (62,0 мг, 0,206 ммоль). Реакцию нагревали до комнатной температуры и перемешивали при этой температуре в течение 1 часа. ТСХ (EtOAc/MeOH/вода/AcCN: 2/1/1/1) демонстрировала образование желаемого продукта (R_f : 0,25), причем не оставалось исходного материала. СВЭЖХ-МС, способ В: $R_t=3,47$ мин, $m/z=417,19$ [M+1]. Продукт использовали без дополнительной очистки для конструирования димера 73 с использованием аналога 5 с использованием способа D.

Описан синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-бензол-1,3-дикарбоксилата (терефталат; линкер 34).

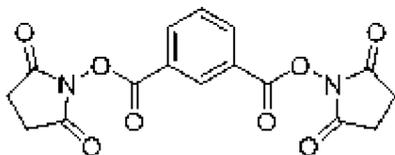


Этап 1. Бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-бензол-1,3-дикарбоксилат

При 0°C к раствору терефталевой кислоты (100 мг, 0,602 ммоль) в ТГФ (2 мл) добавляли 2-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилизоурония тетрафторборат (371 мг, 1,234 ммоль), а затем *N*-этил-*N*-изопропилпропан-2-амин (0,222 мл, 1,234 ммоль)). Через 30 минут удаляли ледяную баню. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Дополнительно добавляли 25 мл ТГФ, и оставляли реакцию в течение ночи при комнатной температуре. Продукт концентрировали вплоть до приблизительно 5 мл, и часть использовали как есть без дополнительной очистки для конструирования димера 89 с использованием RNI с использованием способа D. Оставшийся

материал разбавляли этилацетатом (200 мл) и промывали с помощью рассола (10 мл), органический слой сушили с помощью Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали.

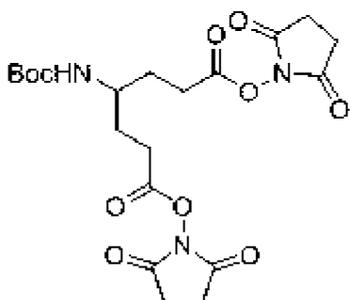
Описан синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)изофталата (изофталат; линкер 35).



Этап 1. Бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)изофталат

К изофталевой кислоте (54 мг, 0,325 ммоль) в ДМСО (1 мл) добавляли TSTU (215 мг, 0,715 ммоль), а затем ТЭА (0,137 мл, 0,975 ммоль). ЖХ-МС 2 мин: Rt=0,79 мин, m/z=721,28 [2M+1]. Продукт использовали без очистки для конструирования димера 90 с использованием аналога 5 и димера 91 с использованием RНI в способе E.

Описан синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)гептандиоата (гептандиоат; линкер 36).

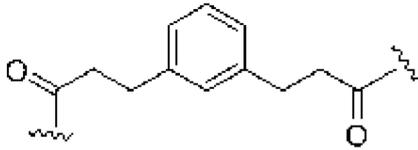
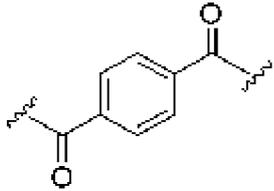
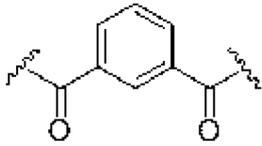
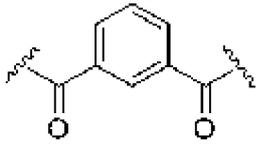
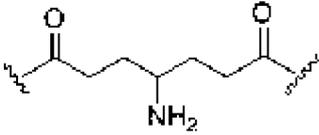
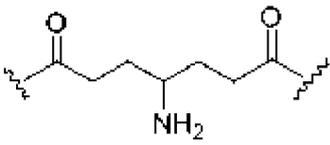


Этап 1. Бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)гептандиоат

К 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)гептандиоевой кислоте (16,5 мг, 0,06 ммоль) в ДМСО (0,5 мл) добавляли TSTU (39,7 мг, 0,132 ммоль), а затем ТЭА (0,025 мл, 0,180 ммоль). ЖХ-МС 2 мин: Rt=0,90 мин, m/z=470,34 [M+1]. Продукт использовали без очистки для конструирования димера 92 с использованием аналога 5 и димера 93 с использованием RНI в способе E.

Результаты приведены в таблице 11.

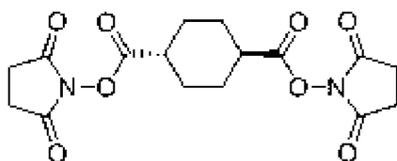
Таблица 11

№ димера	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина B29 и B29'	Тип инсулина; N-концы инсулина	Rt (мин)	(M+6)/6 или (M+7)/7
73		RHI; A1, B1, A1', B1'=карбамоил	3,55	1711,57
89		RHI; A1, B1, A1', B1'=H	3,43	1678,64
90		RHI; A1, B1, A1', B1'=карбамоил	3,67	1703,20
91		RHI; A1, B1, A1', B1'=H	3,52	1678,69
92		RHI; A1, B1, A1', B1'=карбамоил	3,56	1704,64
93		RHI; A1, B1, A1', B1'=H	3,33	1680,18

Волнистая линия обозначает связь с эпсилон-аминогруппой B29 Lys и B29' Lys, соответственно.

ПРИМЕР 26

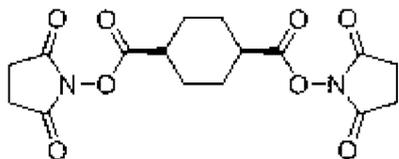
Синтез димеров 71, 72, 77, 78, 81, и 87 проводили следующим образом. Описан синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-(1*S*,4*S*)-циклогексан-1,4-дикарбоксилата (линкер 30; транс-циклогексан-1,4-дикислоты).



К раствору (1*S*,4*S*)-циклогексан-1,4-дикарбоновой кислоты

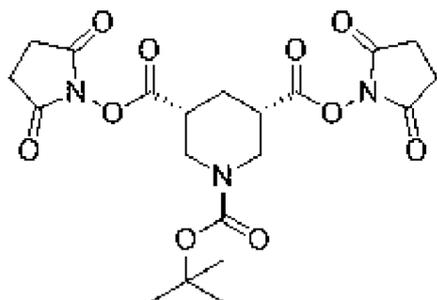
(200 мг, 1,162 ммоль) в DCM (11 мл) при 0°C добавляли TSTU (734 мг, 2,439 ммоль) и DIPEA (0,5 мл, 2,86 ммоль). Получаемую реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Продукт был измельчен в реакционном растворе в виде белого твердого вещества; его отфильтровывали и промывали с помощью DCM (2×5 мл); и сушили под вакуумом для получения указанного в заголовке соединения. СВЭЖХ-МС, вычислено для C₁₆H₁₈N₂O₈, 366,11, наблюдали m/e: 367,16 (M+N)⁺, (Rt: 3,20/5,00 мин). СВЭЖХ-МС, способ А. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО): δ 2,81-2,89 (м; 2 H); 2,80 (с; 8 H); 2,02-2,10 (м; 4 H); 1,57-1,63 (м; 4 H).

Описан синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-(1R,4R)-циклогексан-1,4-дикарбоксилата (линкер 31; цис-циклогексан-1,4-дикислота).



К раствору (1R,4R)-циклогексан-1,4-дикарбоновой кислоты (200 мг, 1,162 ммоль) в DCM (11 мл) при 0°C добавляли TSTU (734 мг, 2,439 ммоль) и DIPEA (0,5 мл, 2,86 ммоль). Получаемую реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле (0-100% EtOAc/гексаны) для получения указанного в заголовке соединения. СВЭЖХ-МС, вычислено для C₁₆H₁₈N₂O₈, 366,11, наблюдали m/z: 367,17 (M+N)⁺, (Rt: 3,17/5,00 мин). СВЭЖХ-МС, способ А. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО): δ 3,02-3,08 (м; 2 H); 2,80 (с; 8 H); 1,80-1,90 (м; 8 H).

Описан синтез 1-(трет-бутил)-3,5-бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-(3R,5S)-пиперидин-1,3,5-трикарбоксилата (линкер 32).



К раствору (3R,5S)-1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-3,5-дикарбоновой кислоты (200 мг, 0,734 ммоль) в ДМФ (7 мл) при 0°C добавляли TSTU (485 мг, 1,611 ммоль) и DIPEA (0,3 мл, 1,718 ммоль). Получаемую реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле (0-100% EtOAc/гексаны) для получения указанного в заголовке соединения. СВЭЖХ-МС, вычислено для $C_{20}H_{25}N_3O_{10}$, 467,15, наблюдали m/e: 468,30 (M+H)⁺, (Rt: 0,98/2,00 мин). СВЭЖХ-МС, способ А.

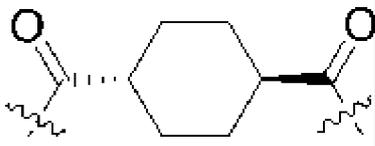
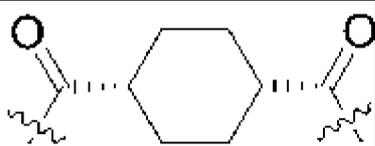
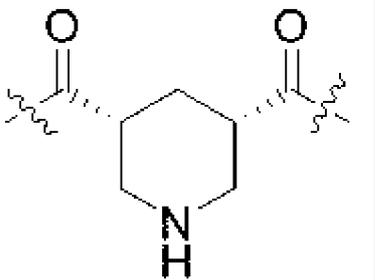
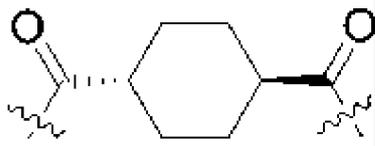
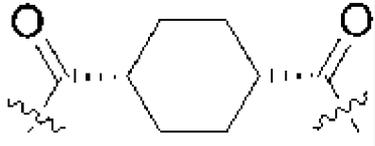
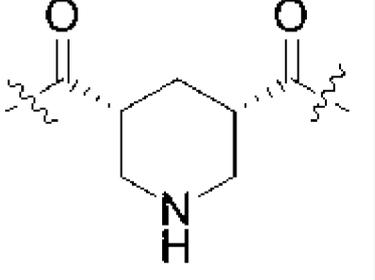
Общий способ F: Синтез димеров N^{6,29}B, N^{6,29}B'-инсулинов в условиях органического основания

В контейнере соответствующего размера суспендируют инсулин или аналог инсулина при комнатной температуре в органическом растворителе или смешанных водн./органическом растворителях, например ДМСО, в присутствии основания, например ТЭА или 1,1,3,3-тетраметилгуанидина (TMG). Смесь оставляют осторожно перемешиваться до тех пор, пока инсулин полностью не растворится. К полученному раствору добавляют активированный сложноэфирный интермедиат в растворе органических растворителей, таких как ДМСО или ДМФ. После СВЭЖХ хроматограмма показывает, что существенная часть реакционной смеси превратилась в димер N^{6,29}B, N^{6,29}B'-инсулинов (или димер N^{6,28}B, N^{6,28}B'-инсулина лизпро), реакционный раствор переносили с помощью автоматической пипетки в центрифужную пробирку объемом 50 мл, содержащую IPAc/MTBE (об/об 4:1) (45 мл). Добавление осуществляли по каплям. Получаемую белую суспензию центрифугировали (3000 об/мин, 15 минут при 4°C) для получения прозрачного супернатанта и белого осадка. Супернатант сливали, и белый осадок сушили под вакуумом. Белый осадок, содержащий неочищенный интермедиат, затем растворяли в 2 мл ТФУ при 0°C и перемешивали в течение 10 минут при той же температуре. После завершения реакции снятия вос реакционный раствор переносили с помощью автоматической пипетки в центрифужную пробирку объемом 50 мл, содержащую MTBE (45 мл). Добавление осуществляли по каплям. Получаемую белую суспензию центрифугировали (3000 об/мин, 15 минут при 4°C) для получения

прозрачного супернатанта и белого осадка. Супернатант сливали, и белый осадок сушили под вакуумом и повторно растворяли в растворе $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (об/об 1:4). Реакционная смесь может быть непосредственно подвергнута очистке с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка Waters C4 250×50 мм, 10 мкм, 1000 Å, или колонка KROMASIL C8 250×50 мм, 10 мкм, 100 Å; буфер А: 0,05–0,1% ТФУ в деионизированной воде; буфер В: 0,05–0,1% ТФУ в AcCN), или реакция может быть остановлена аккуратным разбавлением холодной кислотой H_2O (20х, рН ~ 3,0) при 0°C, и ее рН доводят до конечного рН 2,5 с использованием 1 н HCl (и 0,1 н NaOH при необходимости). Раствор может вначале быть сконцентрирован с помощью ультрафильтрации или с помощью системы фильтрации в тангенциальном потоке (TFF), или с использованием Amicon Ultra-15 Centrifugal Units с мембраной 1К, 3К или 10К MWCO. Концентрированный раствор обычно вначале подвергают ионообменной хроматографии (колонка PolySULFOETHYL A, PolyLC Inc., 250×21 мм, 5 мкм, 1000 Å; буфер А: 0,1% (об/об) $\text{H}_3\text{PO}_4/25\%$ AcCN ; буфер В: 0,1% (об/об) $\text{H}_3\text{PO}_4/25\%$ $\text{AcCN}/0,5$ М NaCl). Фракции, содержащие В29-конъюгат с желаемой чистотой, объединяют и концентрируют с использованием системы TFF или Amicon Ultra-15. Концентрированный раствор затем подвергают очистке с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка Waters C4 250×50 мм, 10 мкм, 1000 Å, или колонка KROMASIL C8 250×50 мм, 10 мкм, 100 Å; буфер А: 0,05–0,1% ТФУ в деионизированной воде; буфер В: 0,05–0,1% ТФУ в AcCN). Фракции, содержащие желаемый инсулиновый димер объединяют и сушат вымораживанием или заменяют буфер с использованием системы TFF и/или Amicon Ultra-15 с получением димеров №,29В, №,29В'–инсулинов.

Таблица 12 перечисляет димеры 71, 72, 77, 78, 81 и 87, которые были получены с использованием соответствующего линкера в соответствии с общим способом В (димеры 77 и 78), общим способом С (димеры 71 и 72) или общим способом F (димеры 81 и 87). Эти димеры были охарактеризованы с использованием СВЭЖХ-МС, способ D, или СВЭЖХ-МС, способ E, причем они продемонстрировали шестизарядные, то есть $[(M+6)/6]$, (или семизарядные, то есть

[(M+7)/7]) частицы родительского соединения при определенном времени удерживания (Rt).

Таблица 12				
№ димера	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина В29 и В29'	Тип инсулина; N-концы инсулина	Rt (мин)	(M+6)/6 или (M+7)/7
71		RHI; A1, B1, A1', B1'=H	3,05	1959,33 1679,86
72		RHI; A1, B1, A1', B1'=H	3,07	1959,33 1679,86
81		RHI; A1, B1, A1', B1'=H	3,37	1959,48 1679,74
77		RHI; A1, B1, A1', B1'= карбамоил	3,50	1988,07 1704,29
78		RHI; A1, B1, A1', B1'= карбамоил	3,52	1988,08 1704,35
86		RHI: A1, B1, A1', B1'= карбамоил	3,48	1988,18 1704,24

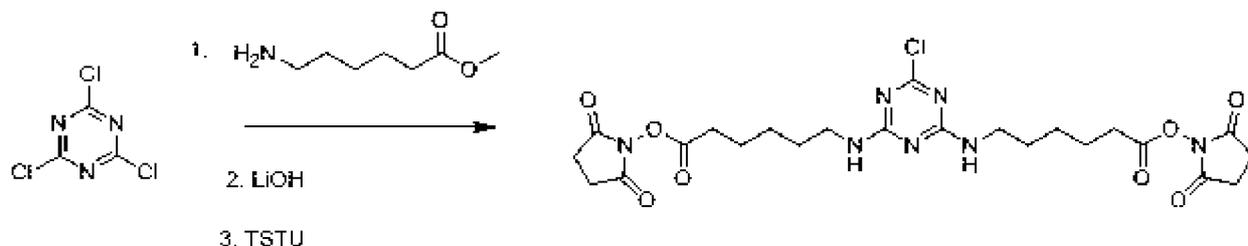
Волнистая линия обозначает связь с эpsilon-аминогруппой

B29 Lys и B29' Lys, соответственно.

ПРИМЕР 26

Синтез димера 68 и димера 74 проводили следующим образом.

Описан синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-6,6'-((6-хлор-1,3,5-триазин-2,4-диил) бис(азанедиил)) дигексаноата (линкер 33; C6N-хлор-1,3,5-триазин-NC6).



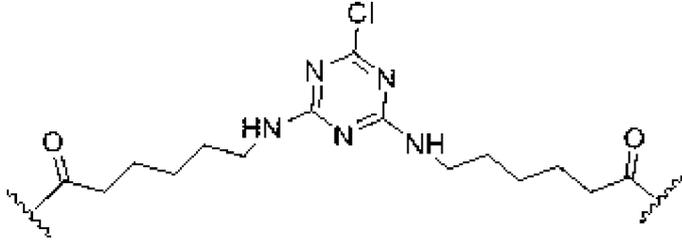
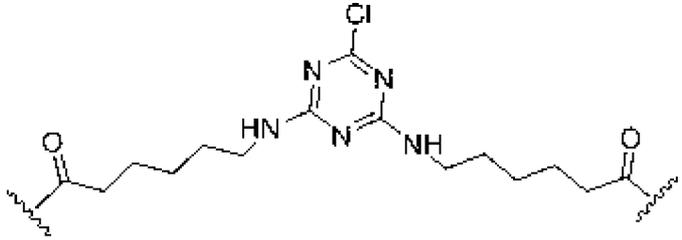
Раствор 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазина (80 мг, 0,434 ммоль) и метил-6-аминогексаноата (129 мг, 0,889 ммоль), соль HCl, в CH₂Cl₂ (1 мл) охлаждали до -30 °С. Добавляли по каплям раствор DIPEA (0,379 мл, 2,169 ммоль) в CH₂Cl₂ (1 мл). Смесь перемешивали при -30°С-комнатной температуре в течение 5 часов. Затем добавляли CH₂Cl₂ (20 мл) и промывали с помощью водной HCl (1M) (2×10 мл), водного NaHCO₃ (10 мл) и рассола (10 мл). Органический слой сушили над сульфатом натрия и фильтровали, концентрировали с помощью вакуума для получения диметил-6,6'-((6-хлор-1,3,5-триазин-2,4-диил) бис(азанедиил)) дигексаноата (135 мг, 0,336 ммоль).

К раствору диметил-6,6'-((6-хлор-1,3,5-триазин-2,4-диил) бис(азанедиил)) дигексаноата (135 мг, 0,336 ммоль) в ТГФ (0,5 мл) и метанола (0,5 мл) добавляли водный (2M) LiOH (504 мкл, 1,008 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и затем концентрировали под вакуумом для получения сухого остатка. Растворяли остаток в воде и нейтрализовали с помощью водн. HCl. Собирали преципитат с помощью фильтрации и промывали его с помощью воды. Сушили твердое вещество под вакуумом для получения 6,6'-((6-хлор-1,3,5-триазин-2,4-диил) бис(азанедиил)) дигексановой кислоты.

К раствору 6,6'-((6-хлор-1,3,5-триазин-2,4-диил) бис(азанедиил)) дигексановой кислоты (108 мг, 0,289 ммоль) в ДМФ (2889 мкл) добавляли TSTU (174 мг, 0,578 ммоль), а затем

триэтиламин (81 мкл, 0,578 ммоль). Перемешивали реакцию 1 час. СВЭЖХ показывает образование желаемого материала, СВЭЖХ-МС, способ С: $R_t=0,99$ мин, $m/z=568,2$ $[M+1]$. Данный реагент (0,1М/ДФ) использовали без дополнительной очистки.

Димеры были получены с использованием или общего способа В (димер 74), или общего способа С (димер 68). Эти димеры были охарактеризованы с использованием СВЭЖХ-МС, способ D, или СВЭЖХ-МС, способ E, причем они продемонстрировали шестизарядные, то есть $[(M+6)/6]$, (или семизарядные, то есть $[(M+7)/7]$) частицы родительского соединения при определенном времени удерживания (R_t). Димер 68 был сконструирован с использованием линкера 33 и RHI. Димер 74 был сконструирован с использованием линкера 33 и аналога 5. Результаты приведены в таблице 13.

Таблица 13				
№ димера	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина B29 и B29'	Тип инсулина; N-концы инсулина	R_t (мин)	$(M+6)/6$ или $(M+7)/7$
68		A1, B1, A1', B1 '=H	3,48	1993,09
74		A1, B1, A1', B1 '=карбамоил	3,56	1733,20
Волнистая линия обозначает связь с эпсилон-аминогруппой B29 Lys и B29' Lys, соответственно.				

ПРИМЕР 27

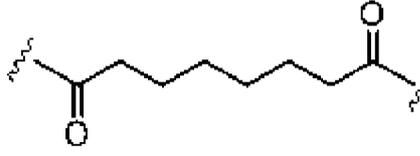
Синтез димера 54 проводили следующим образом.

Растворяли A1-ТФУ-RHI (D. Liu et. al., Journal of Peptide Sci., 2012, 18, 336-341) (100 мг, 0,017 ммоль) в предварительной

смеси, содержащей воду (5 мл) и двухосновный фосфат калия (24,49 мг, 0,141 ммоль) (рН получаемого раствора составляет приблизительно 4). Добавляли цианат калия (27,5 мг, 0,339 ммоль) и перемешивали в течение ночи. Продукт очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой на фазе С-8 (колонка KROMASIL, С8 10 мкм, 100 Å, размер 250×50 мм; растворитель А=вода/0,05% ТФУ, растворитель В=АсСN/0,05% ТФУ), поток=85 мл/мин, градиент В в А 26-34% в течение 30 мин. СВЭЖХ-МС, способ F: Rt=4,48 мин, m/z=1486,9 [(M+4)/4 +1].

Растворяли вышеуказанный продукт (60 мг, 10,09 мкмоль) в ДМСО (594 мкл) и добавляли триэтиламин (28,1 мкл, 0,202 ммоль), а затем раствор линкера дисукцинимидилсуберата (1,858 мг, 5,04 мкмоль), растворенного в 100 мкл ДМСО. Перемешивали в течение 3 часов. СВЭЖХ показывает завершение реакции. Добавляли всю реакционную смесь в гидроксид аммония (2105 мкл, 15,13 ммоль) (по каплям, ожидали экзотермию). Перемешивали осторожно в течение 2 часов и подтверждали снятие защиты группы ТФУ. Разбавляли смесь с помощью 20 мл воды и удаляли большую часть гидроксида аммония посредством диафильтрации с использованием пробирок 10K Amicon. Доводили рН до приблизительно 3 и удаляли соли посредством диафильтрации. Продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии (колонка PolySULFOETHYL A, PolyLC Inc., 250×21 мм, 5 мкм, 1000 Å; буфер А: 0,1% (об/об) Н₃РO₄/25% АсСN; буфер В: 0,1% (об/об) Н₃РO₄/25% АсСN/0,5 М NaCl). Продукт повторно очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой на фазе С-8 (колонка KROMASIL, С8 10 мкм, 100 Å, размер 250×50 мм; растворитель А=вода/0,05% ТФУ, растворитель В=АсСN/0,05% ТФУ). Результат показан ниже. Результаты приведены в таблице 14.

Таблица 14				
№ димера	Структура димера, демонстрирующая связывающий фрагмент между остатками лизина В29 и В29'	Тип инсулина; N-концы инсулина	Rt (мин)	(M+6)/6 или (M+7)/7

54		RHI; A1, A1' = H, B1, B1' = карбамоил Л	4, 57	1974, 45
Волнистая линия обозначает связь с эпсилон-аминогруппой B29 Lys и B29' Lys, соответственно.				

ПРИМЕР 28

Анализы связывания с инсулиновым рецептором осуществляли следующим образом.

Анализ связывания с IR проводили в сцинтилляционном анализе сближения (SPA) в 384-луночном формате с использованием клеточных мембран, полученных от клеток CHO, сверхэкспрессирующих человеческий IR(B), выращенных в среде F12, содержащей 10% ФБС и антибиотики (G418, пенициллин/стрептавидин). Клеточные мембраны были получены в 50 мМ Tris-буфере, pH 7,8 содержащем 5 мМ MgCl₂. Буфер для анализа содержал 50 мМ Tris-буфер, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, 5 мМ MgCl₂, 0,1% БСА и ингибиторы протеаз (Complete-Mini-Roche). Клеточные мембраны добавляли к гранулам WGA PVT PEI SPA (конечная концентрация 5 мг/мл) с последующим добавлением молекул инсулинового димера в соответствующих концентрациях. После 5-15 мин инкубации при комнатной температуре добавляли ¹²⁵[I]-инсулин в конечной концентрации 0,015 нМ для конечного общего объема 50 мкл. Смесь инкубировали при встряхивании при комнатной температуре в течение от 1 до 12 часов с последующим сцинтилляционным подсчетом для определения связывания ¹²⁵[I]-инсулина с IR и воздействия титрования молекул инсулинового димера на данное взаимодействие.

ПРИМЕР 29

Анализы АКТ-фосфорилирования инсулинового рецептора (IR) осуществляли следующим образом.

Анализ АКТ-фосфорилирования IR: Активация инсулинового рецептора может быть оценена посредством измерения фосфорилирования белка Akt, ключевого этапа сигнального каскада инсулинового рецептора. Линии клеток CHO, сверхэкспрессирующих

человеческий IR, использовали в наборе для анализа HTRF-сэндвич-ELISA (Cisbio, "Phospho-AKT(Ser473) and Phospho-AKT(Thr308) Cellular Assay Kits"). Клетки выращивали в среде F12, дополненной 10% ФБС, 400 мкг/мл G418 и 10 мМ HEPES. До анализа клетки инкубировали в бессывороточной среде в течение от 2 до 4 часов. В качестве альтернативы, клетки могут быть заранее заморожены и разделены на аликвоты в среде, содержащий 20% ДМСО, и использованы в анализе после оттаивания, осаждения и повторного суспензирования. Клетки высевали по 10000 клеток на лунку в 20 мкл бессывороточной среды F12 в 384-луночных планшетах. На каждом планшете исследуемых соединений проводили контроль с помощью хумулина и инсулина гларгина. Титруемые соединения добавляли к клеткам (2 мкл на лунку, конечные концентрации=1000 нМ, титровали вплоть до 0,512 пМ в разведениях 1:5) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Клетки лизировали с помощью 8 мкл приготовленного буфера для лизиса, предлагаемого в наборе CisBio, и инкубировали при 25°C в течение 1 часа. Разбавленные реагенты-антитела (анти-AKT-d2 и анти-pAKT-Eu3/криптан) были получены в соответствии с инструкциями набора, и затем по 10 мкл добавляли в каждую лунку клеточного лизата с последующей инкубацией при 25°C в течение от 3,5 до 5 час. Планшет считывали с помощью планшетного ридера Envision (возбуждение=320 нм; излучение=665 нм) для определения агонистической активности IR pAkt в отношении как активности, так и максимального отклика для каждого соединения. В качестве альтернативы, соединения тестировали таким же образом в присутствии 1,6 нМ хумулина, для того чтобы определить, насколько каждое соединение было в состоянии конкурировать с полной агонистической активностью инсулина.

ПРИМЕР 30

Таблица 15 показывает биологическую активность инсулиновых димеров *in vitro* по отношению к инсулиновому рецептору (IR). Активность измеряли или посредством конкурентных анализов лигандов, как описано в примере 28, или посредством функциональных анализов Akt-фосфорилирования, как описано в

примере 29.

Таблица 15					
№ димера	Связывание с IR IC ₅₀ (нМ)	IR pAkt %Max	№ димера	Связывание с IR IC ₅₀ (нМ)	IR pAkt %Max
1	1,50	50,5	43	2,02	35
2	3,77	33	44	1,18	33
3	1,38	59,5	45	4,00	38
4	1,62	47,5	46	0,38	25
5	2,42	43	47	4,56	30
6	1,00	83	48	5,09	35
7	3,19	60	49	5,16	58
8	7,15	47,5	50	3,61	39
9	3,29	42	51	0,59	27
10	3,59	34	52	3,93	67
11	1,37	32	54	0,49	26
12	13,1	41	55	2,02	28
13	2,51	36	56	2,94	33
14	4,42	38	57	2,02	26
15	2,53	49	58	0,61	34
16	4,76		59	0,97	53
17	5,27	62	60	1,81	60
18	5,23	36	61	20,3	33
19	1,40	25	62	5,01	32
20	0,62	36	63	26,7	41
21	1,88	41	64	15,7	34
22	1,85	41,5	65	3,05	42
23	2,48	39	66	34,5	33
24	4,29	29,3	67	0,54	24
25	1,82	46	68	4,81	34
26	3,74	44	69	4,99	18
27	3,98	31	70	14,8	21
28	1,96	25	71	2,28	45
29	1,18	30	72	2,35	42
30	1,79	30	73	37,8	35
31	1,36	31	74	73,8	33
32	21,6	33	75	1,85	52
33	2,41	38	76	1,87	35
34	0,57	67	77	42,1	23
35	1,17	66	78	167	22
36	0,53	28	79	1,47	42
37	3,52	42	80	5,48	39
38	2,18	45	81	0,3	40
39	3,17	45	82	1,73	50
40	2,03	41	83	558	21
41	0,64	35	84	2,19	50
42	2,97	49			

ПРИМЕР 31

В данном примере сравнивали эффекты *in vivo* нескольких частичных агонистов инсулинового рецептора настоящего изобретения с соединением А (инсулиновый димер MIU-90, раскрытый в опубликованной заявке РСТ № W02014052451) и соединением В (B29, B29'-субероил-(инсулин)₂), раскрытым в документе Derpe et al., *Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 350: 213-217 (1994), но с использованием RHI вместо бычьего инсулина в интраперитонеальном тесте на переносимость инсулина (IP-ITT), выполняемом на взрослых самцах тощих мышей C57BL/6NTac.

Группы из N=6-8 животных на группу рандомизировали по весу (в среднем приблизительно 30 грамм). За два дня до исследования мышей подготавливали к дозированию с помощью интраперитонеальной инъекции 0,9% раствора хлорида натрия при объеме дозирования 5 мл/кг. На утро исследования пищу удаляли за два или четыре часа до исследования. Концентрацию глюкозы в крови определяли при T=0 мин (исходный уровень) с использованием глюкометра. Затем мышам дозировали носитель, димер 24, димер 55, димер 58, димер 60, димер 67, соединение А, соединение В или хумулин (RHI) в количестве 5 мл/кг посредством интраперитонеальной инъекции (для используемых доз смотри таблицу 16). Уровни глюкозы в крови определяли из хвостовых кровопусканий от 30 до 360 минут после дозирования.

Таблица 16	
Соединение	Дозы
А	72 нмоль/кг
	300 нмоль/кг
В	72 нмоль/кг
	300 нмоль/кг
Димер 24	72 нмоль/кг
	300 нмоль/кг
Димер 55	120 нмоль/кг
	300 нмоль/кг
Димер 58	60 нмоль/кг
	300 нмоль/кг
Димер 60	120 нмоль/кг
	300 нмоль/кг
Димер 67	60 нмоль/кг
	300 нмоль/кг

Хумулин	18 нмоль/кг 72 нмоль/кг
---------	----------------------------

Результаты показаны на фигурах 2А, 2В, 2С, 2D, 2Е, 2F и 2G. Результаты демонстрируют, что профиль глюкозы для димера 24, димера 55, димера 58, димера 60 и димера 67 оказался по существу одинаковым при обеих протестированных дозах, тогда как повышение дозировки соединений А и В вызывало повышение снижающей глюкозу активности, что указывает на меньший потенциальный риск гипергликемии для димеров по сравнению с RHI или соединениями А и В.

ПРИМЕР 32

Эффект снижения уровня глюкозы димеров 24, 18 и 40 сравнивали с RHI у миниатюрных юкатанских свиней с диабетом (минипиги D) следующим образом.

Юкатанских минипигов делали диабетиками типа 1 с помощью аллоксановых инъекций в соответствии с проприетарным протоколом, разработанным Sinclair Research Center (Auxvasse, MO). Индуцирование считали успешным, если базальные уровни глюкозы превышали 150 мг/дл. В этих экспериментах были использованы минипиги D с уровнями глюкозы в плазме, составляющими приблизительно 300 мг/дл.

В этих исследованиях были использованы самцы юкатанских минипигов, снабженные двумя портами сосудистого доступа (VAP) в яремной вене. В день исследования после голодания в течение ночи минипигов помещали в подвески, и получали доступ к VAP для инфузии и забора образцов. При $t=0$ мин и после сбора двух базовых образцов крови для измерения глюкозы в плазме ($t=-30$ минут и $t=0$ минут) минипигам вводили хумулин (рекомбинантный человеческий инсулин, RHI) или IRPA в виде одного в/в болюса в количестве 0,69 нмоль/кг. Хумулин и IRPA составляли в количестве 69 нмоль/мл в буфере, содержащем глицерин, 16 мг/мл; метакрезол, 1,6 мг/мл; фенол, 0,65 мг/мл; безводный фосфат натрия, двухосновный, 3,8 мг/мл; pH доводили до 7,4 с помощью HCl. После дозирования отбор проб продолжали в течение 480 минут; временные точки для сбора образцов составляли -30 мин, 0 мин, 8 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 60 мин, 90 мин, 120 мин, 150 мин, 180 мин,

210 мин, 240 мин, 270 мин, 300 мин, 330 мин, 360 мин, 420 мин, 480 мин. Кровь собирали в пробирки с КЗ-ЭДТА с добавлением 10 мкг/мл аprotинина и хранили на льду до обработки, которую проводили в пределах 30 минут от сбора. После центрифугирования при 3000 об/мин, 4°C, в течение 8 мин, плазму собирали и разделяли на алиquotы для измерения глюкозы с использованием химического анализатора Beckman Coulter AU480 и для измерения уровней соединения.

Фигура 1 показывает, что при концентрации 0,69 нмоль/кг RHI снижал уровни глюкозы в сыворотке ниже 50 мг/дл, тогда как инсулиновые димеры этого не делали. Этот результат показывает, что инсулиновые димеры представляют меньший риск развития гипогликемии, чем RHI.

ПРИМЕР 33

Эффект снижения уровня глюкозы димеров 4, 5, 7, 8, 9, 18-29, 32, 37-41, 43, 44, 48, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 64, 67, 69, 71, 72, 77 и 78 сравнивали с RHI у миниатюрных юкатанских свиней с диабетом (минипиги D) следующим образом.

Юкатанских минипигов делали диабетиками типа 1 с помощью аллоксановых инъекций в соответствии с проприетарным протоколом, разработанным Sinclair Research Center (Auxvasse, MO). Индуцирование считали успешным, если базальные уровни глюкозы превышали 150 мг/дл. В этих исследованиях были использованы минипиги D с уровнями глюкозы в плазме, составляющими приблизительно 300-400 мг/дл, и снабженные двумя портами сосудистого доступа (VAP) в яремной вене.

В день исследования после голодания в течение ночи минипигов помещали в подвески, и получали доступ к VAP для инфузии и забора образцов. При $t=0$ мин и после сбора двух базовых образцов крови для измерения глюкозы в плазме ($t=-30$ минут и $t=0$ минут) минипигам вводили хумулин (рекомбинантный человеческий инсулин, RHI) или другой димер в виде одного в/в болюса в количестве 0,69 нмоль/кг (0,35 нмоль/кг для соединения #78). Хумулин и димеры составляли в количестве 69 нмоль/мл в буфере, содержащем глицерин, 16 мг/мл; метакрезол, 1,6 мг/мл;

фенол, 0,65 мг/мл; безводный фосфат натрия, двухосновный, 3,8 мг/мл, рН доводили до 7,4 с помощью HCl. После дозирования отбор проб продолжали в течение 480 минут; временные точки для сбора образцов составляли -30 минут, 0 минут, 8 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 150 минут, 180 минут, 210 минут, 240 минут, 270 минут, 300 минут, 330 минут, 360 минут, 420 минут и 480 минут. Кровь собирали в пробирки с K3-ЭДТА с добавлением 10 мкг/мл аprotинина и хранили на льду до обработки, которую проводили в пределах 30 минут от сбора. После центрифугирования при 3000 об/мин, 4 °С, в течение 8 минут плазму собирали и разделяли на аликвоты для измерения глюкозы с использованием химического анализатора Beckman Coulter AU480. Результаты показаны на фигурах 7А-7Н. Эти фигуры показывают, что при концентрации 0,69 нмоль/кг RNI снижал уровни глюкозы в сыворотке ниже 50 мг/дл, тогда как инсулиновые димеры этого не делали. Этот результат показывает, что инсулиновые димеры представляют меньший риск развития гипогликемии, чем RNI.

ПРИМЕР 34

Этот эксперимент сравнивал стабильность дисульфидного связывающего фрагмента соединения А с субериловым (С8) связывающим фрагментом димера 24.

1 мкМ соединения А и димера 24 по-отдельности инкубировали в мембранах клеток почек крысы (RКСМ) с 5 мМ глутатиона (GSH) или без него. Получали образцы в момент времени 0 и в момент времени 2 часа, и реакцию останавливали с помощью 1 объема 10% MeOH в AcCN с 0,1% муравьиной кислоты. Затем образцы с остановленной реакцией центрифугировали и замораживали до анализа. Затем образцы оттаивали и анализировали с использованием системы Thermo Orbi Velos. Целевой анализ MetID проводили на экстрагированных ионных хроматограммах (XIC) с использованием 3 изотопов от 2 зарядовых состояний при окне 10 м.д.

Метаболиты соединения А были детектированы в RКСМ как без GSH, так и с GSH. Как показано на фигуре 3, мономер составлял приблизительно 1% от родительского соединения (исходного раствора соединения А) к 2 часам инкубации. Как показано на

фигуре 4, мономер составлял приблизительно 6,5% от родительского соединения (исходного раствора соединения А) к 2 часам инкубации. Эти результаты показывают, что дисульфидная связь разрушается со временем. Метаболиты не наблюдались в контроле при 0 часов для соединения А или в исходных растворах.

Димер 24 производил метаболиты, которые были детектированы в РКСМ, однако, хотя наблюдали утрату полипептида А-цепи из-за разрыва дисульфидных связей между полипептидом А-цепи и полипептидом В-цепи, момеры не были детектированы. Фигура 5 показывает, что без GSH утрата полипептида А-цепи составляла менее чем 1% от родительского соединения (исходного раствора димера 24). Фигура 6 показывает, что с GSH утрата полипептида А-цепи составляла менее чем 1% от родительского соединения (исходного раствора димера 24). Метаболиты не наблюдались в контроле при 0 часов для димера 24 или в исходных растворах. Новая процедура с кислыми условиями хорошо останавливала дисульфидный обмен.

Таблица последовательностей		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Инсулин Homo sapiens, А-цепь	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
2	Инсулин Homo sapiens, В-цепь	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
3	Искусственная последовательность, А-цепь инсулина X ₂ представляет собой изолейцин или треонин; X ₃ представляет собой валин, глицин или лейцин; X ₈ представляет собой треонин или гистидин; X ₁₇ представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин; X ₁₉ представляет собой тирозин, 4-метоксифенилаланин, аланин или 4-аминофенилаланин; X ₂₃ представляет собой аспарагин или глицин;	GX ₂ X ₃ EQCCX ₈ SICSLYQLX ₁₇ NX ₁₉ CX ₂₃
4	Искусственная последовательность,	GX ₂ X ₃ EQCCX ₈ SICSLYQLX ₁₇ NX ₁₉ CX ₂₃

	<p>В-цепь инсулина</p> <p>X₂₅ представляет собой гистидин или треонин;</p> <p>X₂₉ представляет собой аланин, глицин или серин;</p> <p>X₃₀ представляет собой гистидин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоцистеиновую кислоту или цистеиновую кислоту;</p> <p>X₃₁ представляет собой пролин или лизин; и</p> <p>X₃₂ представляет собой пролин или лизин, при условии, что по меньшей мере один из X₃₁ или X₃₂ представляет собой лизин</p>	
5	<p>X₂₂ представляет собой фенилаланин или дезаминофенилаланин;</p> <p>X₂₅ представляет собой гистидин или треонин;</p> <p>X₂₆ представляет собой глицин или лейцин;</p> <p>X₂₇ представляет собой фенилаланин или аспарагиновую кислоту;</p> <p>X₂₉ представляет собой аланин, глицин или серин;</p> <p>X₃₀ представляет собой гистидин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоцистеиновую кислоту или цистеиновую кислоту;</p> <p>X₃₁ представляет собой аспарагиновую кислоту, пролин или лизин;</p> <p>X₃₂ представляет собой лизин или пролин;</p> <p>X₃₃ представляет собой треонин, аланин или отсутствует;</p> <p>X₃₄ представляет собой аргинин или отсутствует; и</p> <p>X₃₅ представляет собой аргинин или отсутствует;</p> <p>при условии, что по меньшей мере один из X₃₁ или X₃₂ представляет собой лизин</p>	<p>X₂₂VNQX₂₅X₂₆CGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERG FX₂₇YTX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅</p>

6	Искусственная последовательность, В-цепь инсулина лизпро	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT
7	Искусственная последовательность, А-цепь инсулина гларгина	GIVEQCCTSICSLYQLENYCG
8	Искусственная последовательность, В-цепь инсулина гларгина	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT RR
9	Искусственная последовательность, В-цепь инсулина аспарта	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT
10	Искусственная последовательность, В:des30	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK
11	Искусственная последовательность, А: Y19A	GIVEQCCTSICSLYQLENACN

При том, что настоящее изобретение описано в настоящем документе со ссылкой на проиллюстрированные варианты осуществления, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено ими. Специалистам со средней квалификацией в данной области техники и имеющим доступ к идеям настоящего документа будут ясны дополнительные модификации и варианты осуществления в пределах объема настоящего изобретения. Таким образом, настоящее изобретение ограничено только прилагаемой к настоящему документу формулой изобретения.

Список последовательностей

<110> Lin, Songnian
Yan, Lin
Huo, Pei
Pissarnitski, Dmitri
Feng, Danqing
Nargund, Ravi
Zhu, Yuping
Kekec, Ahmet
Madsen-Duggan, Christina B
Shi, Zhi-Cai
Wu, Zhicai
Mu, Yingjun

<120> Частичные агонисты инсулинового рецептора

<130> 23876

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> Протеин

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 2

<211> 30

<212> Протеин

<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

<210> 3

<211> 21

<212> Протеин

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутантные варианты цепи А инсулина

<220>

<221> MISC_FEATURE

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Хаа представляет собой аланин, глицин или серин

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Хаа представляет собой гистидин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоцистеиновую кислоту или цистеиновую кислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> Хаа представляет собой пролин или лизин

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Хаа представляет собой пролин или лизин

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> Хаа представляет собой пролин или лизин

<400> 4

Xaa Leu Cys Gly Xaa Xaa Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
1 5 10 15

Glu Arg Gly Phe Xaa Tyr Thr Xaa Xaa
20 25

<210> 5
<211> 32
<212> Протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Варианты В цепи инсулина

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Хаа представляет собой фенилаланин или дезамино-фенилаланин

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> При условии, что по меньшей мере один из 28 или 29 представляет собой лизин

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Хаа представляет собой гистидин или треонин

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)
 <223> Хаа представляет собой глицин или лейцин

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа представляет собой аланин, глицин или серин

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Хаа представляет собой гистидин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоцистеиновую кислоту, или цистеиновую кислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 <223> Хаа представляет собой фенилаланин или аспарагиновую кислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Хаа представляет собой аспарагиновую кислоту, пролин или лизин

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Хаа представляет собой лизин или пролин

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Хаа представляет собой треонин, аланин или отсутствует

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Хаа представляет собой аргинин или отсутствует

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Хаа представляет собой аргинин или отсутствует

<400> 5
 Хаа Val Asn Gln Хаа Хаа Cys Gly Хаа Хаа Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Хаа Tyr Thr Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа
 20 25 30

<210> 6
 <211> 30
 <212> Протеин
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Цепь В инсулина лизпро

<400> 6

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr
20 25 30

<210> 7
<211> 21
<212> Протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Цепь А инсулина лизпро

<400> 7

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly
20

<210> 8
<211> 32
<212> Протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Цепь В инсулина гларгина

<400> 8

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30

<210> 9
<211> 30
<212> Протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Цепь В инсулина аспарта

<400> 9

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr
20 25 30

<210> 10
<211> 29

<212> Протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Цепь В Des30

<400> 10

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 11
<211> 21
<212> Протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Y19A цепи А

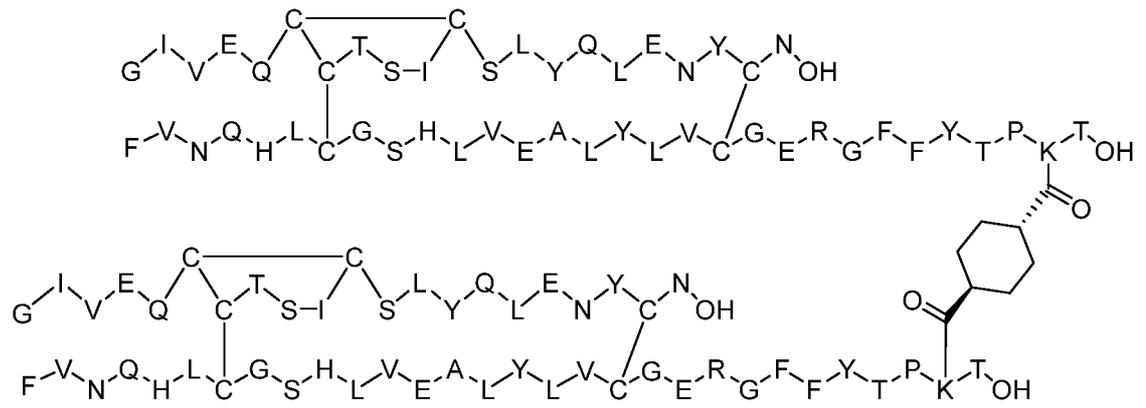
<400> 11

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

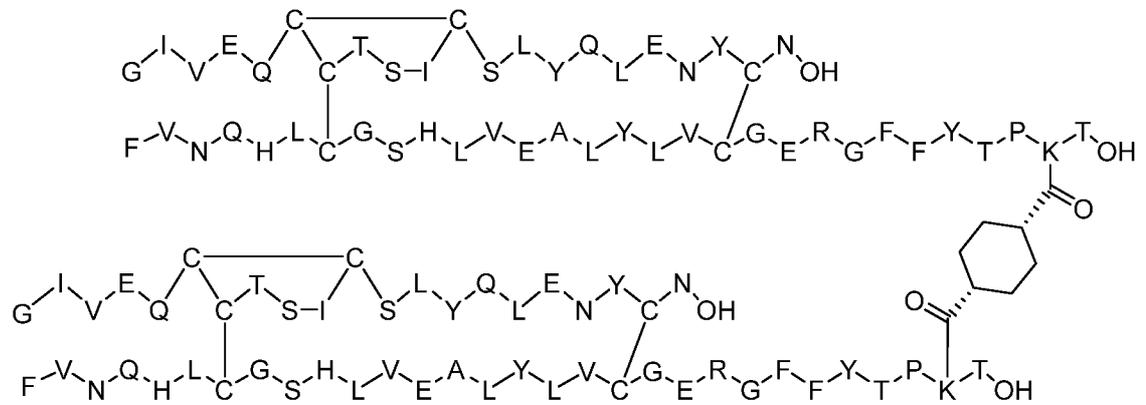
Glu Asn Ala Cys Asn
20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

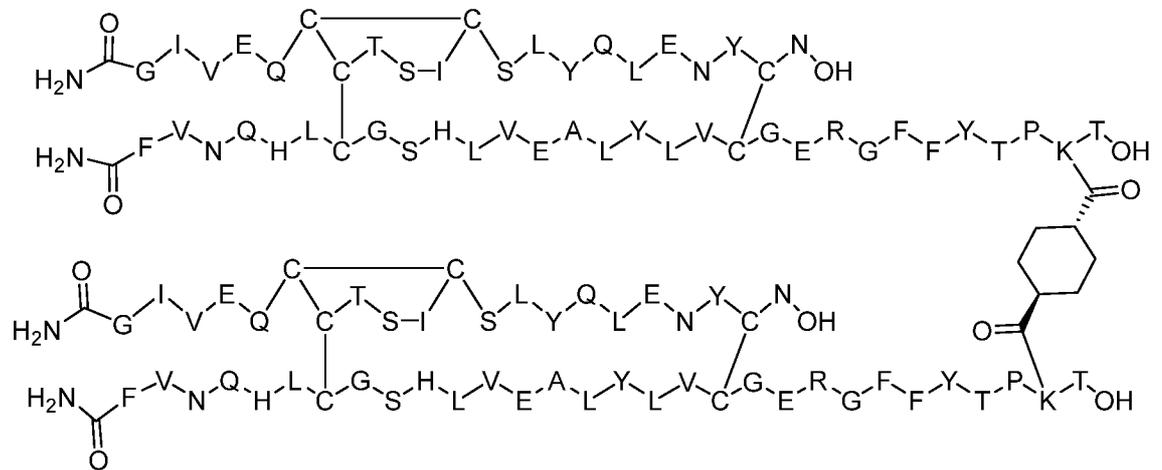
1. Соединение, выбранное из группы, состоящей из:



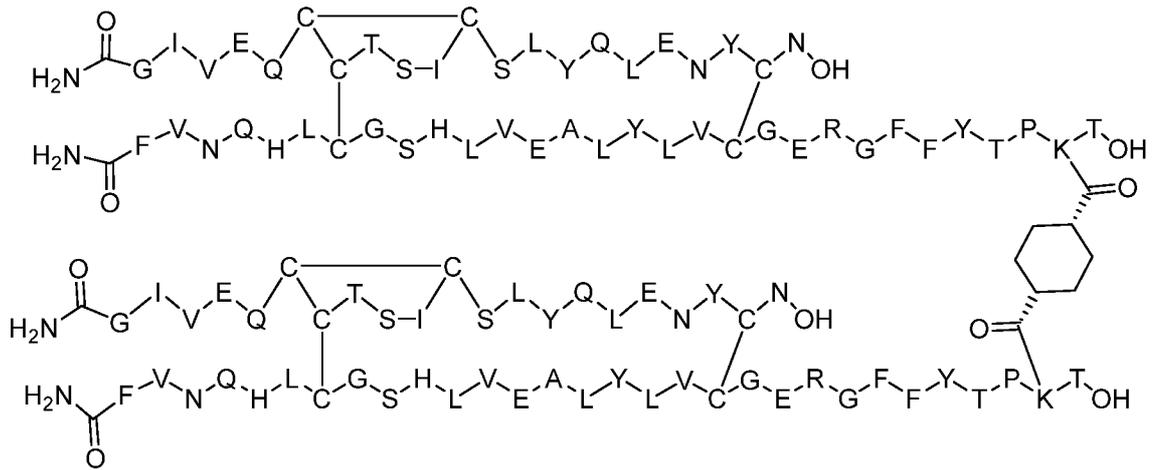
Димер 71;



Димер 72;



Димер 77;



Димер 78;

где дисульфидные связи между остатками Cys 6 и Cys 11 полипептида А-цепи и дисульфидные связи между Cys 7 и Cys 20 А-цепи с Cys 7 и Cys 19 полипептида В-цепи, соответственно, представлены с помощью сплошной линии между ними; где связывающие фрагменты ковалентно связаны с эпсилон-аминокислотой указанного остатка лизина,

где полипептид А-цепи для димеров 71, 72, 77 и 78 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1; и полипептид В-цепи для димеров 71, 72, 77 и 78 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, соответственно.

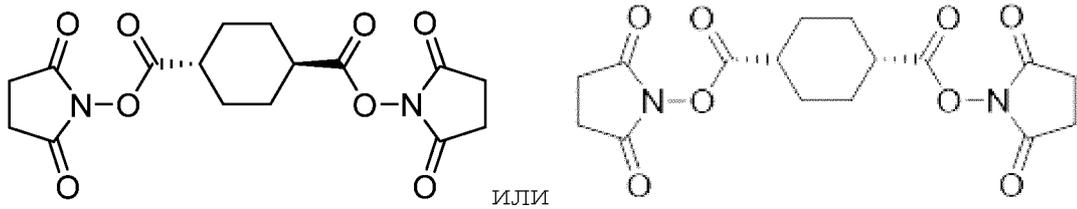
2. Композиция, содержащая одно или несколько соединений по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.

3. Способ лечения диабета, включающий введение индивидууму с диабетом, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей частичный агонист рецептора инсулина по п.2.

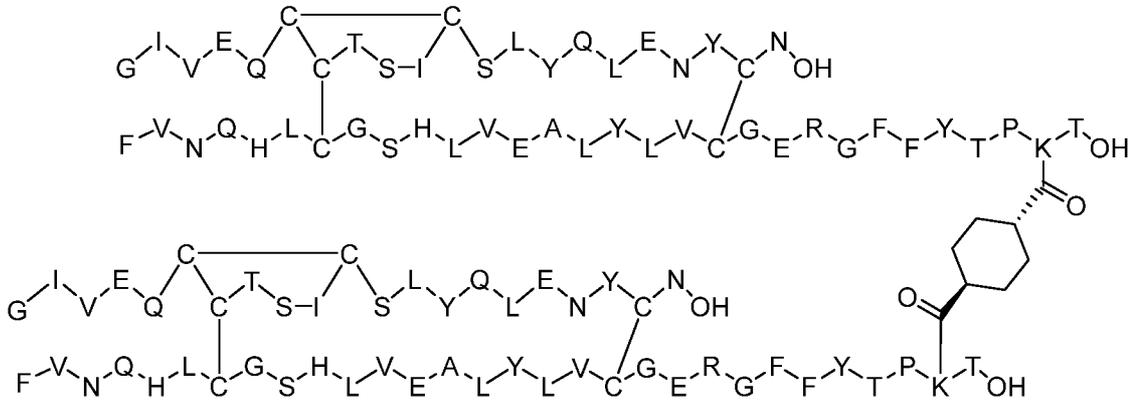
4. Способ по п.3, в котором диабет представляет собой диабет типа 1, диабет типа 2 или гестационный диабет.

5. Димер инсулина, содержащий:

первый B29 или B28 Lys первой молекулы гетеродимера инсулина, имеющей первый полипептид А-цепи и первый полипептид В-цепи, и второй B29 или B28 Lys второго гетеродимера инсулина, имеющего второй полипептид А-цепи и второй полипептид В-цепи конъюгированные вместе бифункциональным линкером, выбранным из группы, состоящей из:



6. Соединение, имеющее следующую формулу



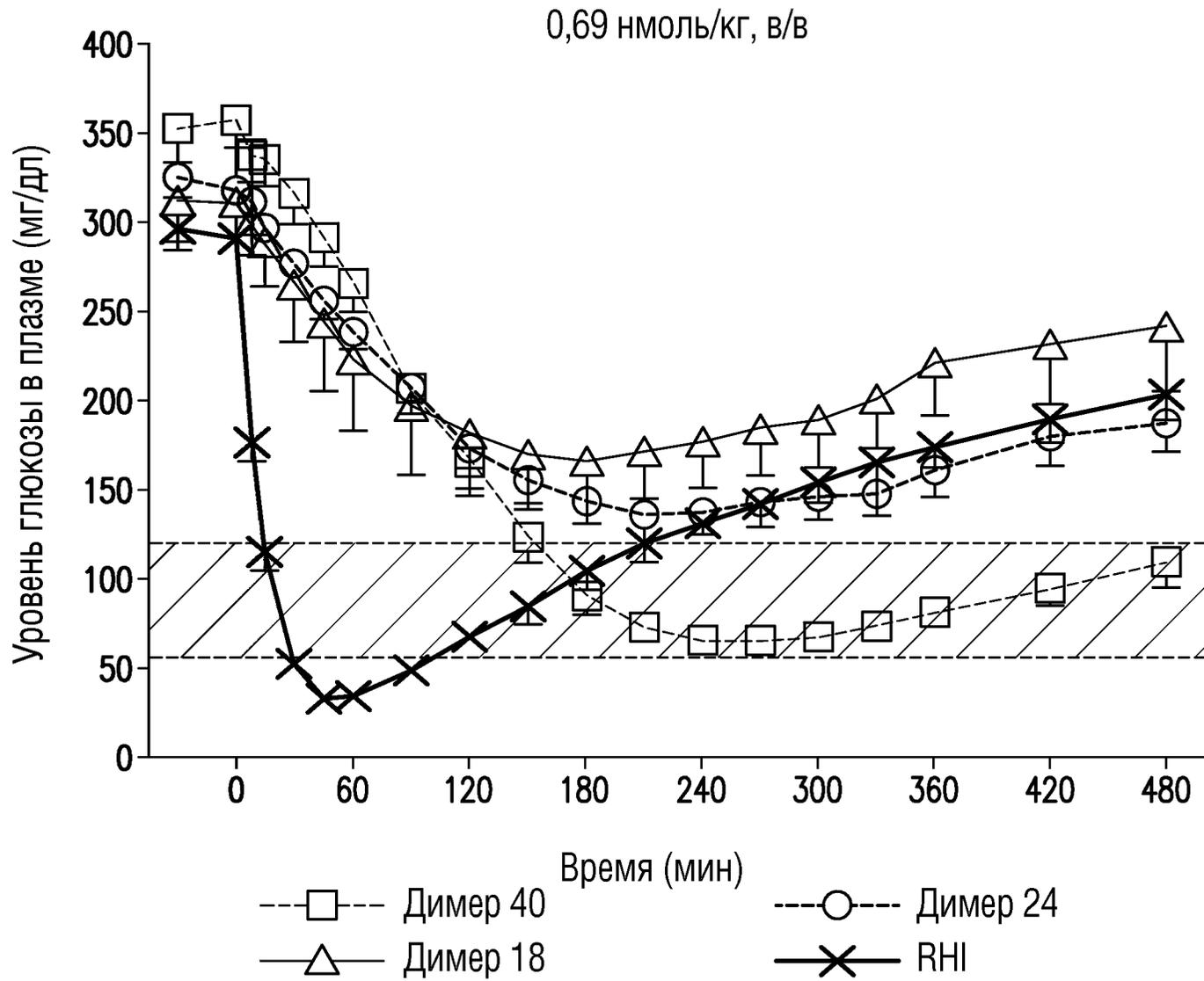
Димер 71.

7. Композиция, содержащая одно или несколько соединений по п.6 и фармацевтически приемлемый носитель.

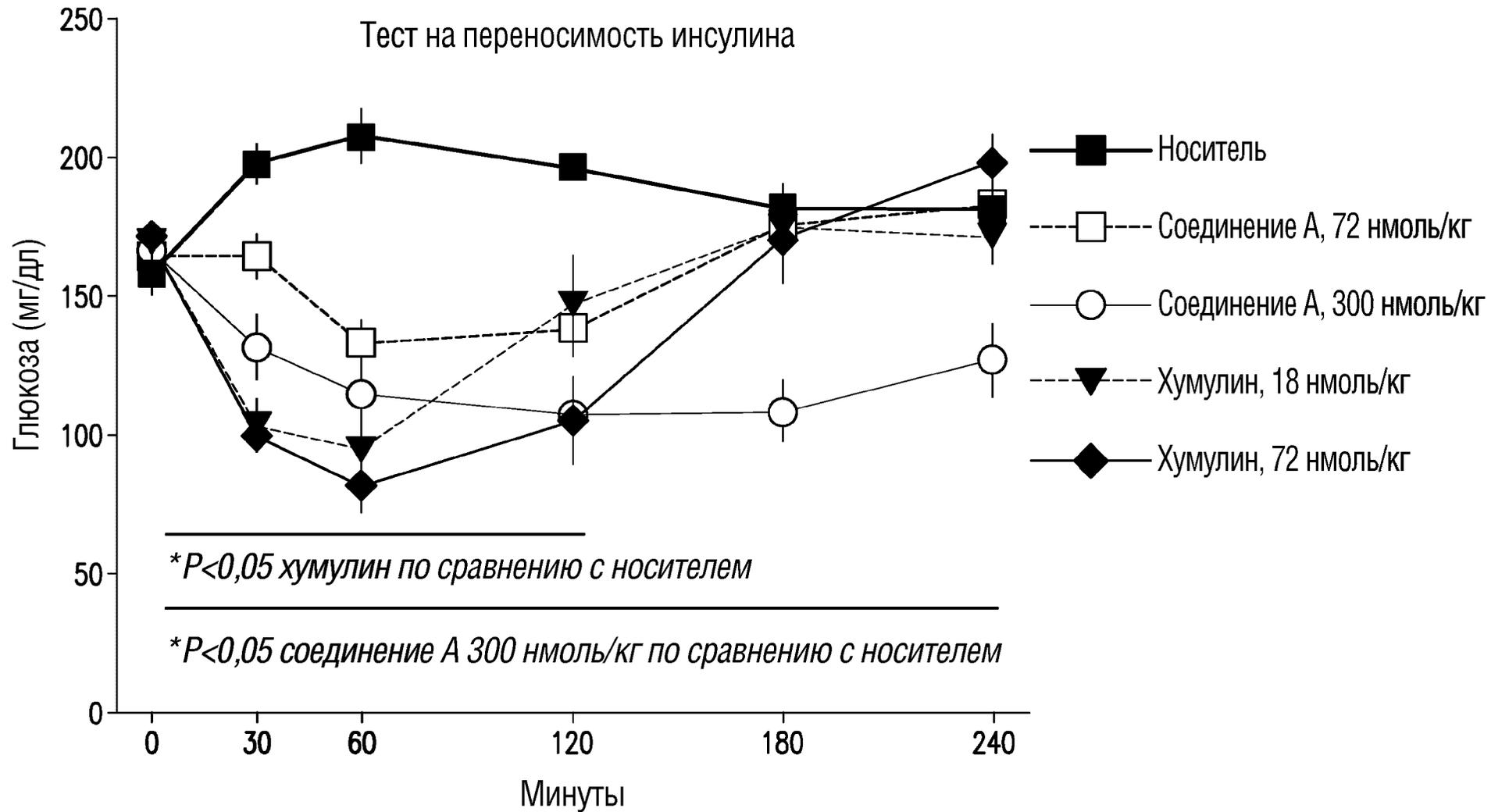
8. Способ лечения диабета, включающий введение индивидууму с диабетом, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей частичный агонист рецептора инсулина по п.7.

9. Способ по п.8, где диабет представляет собой диабет типа 1, диабет типа 2 или гестационный диабет.

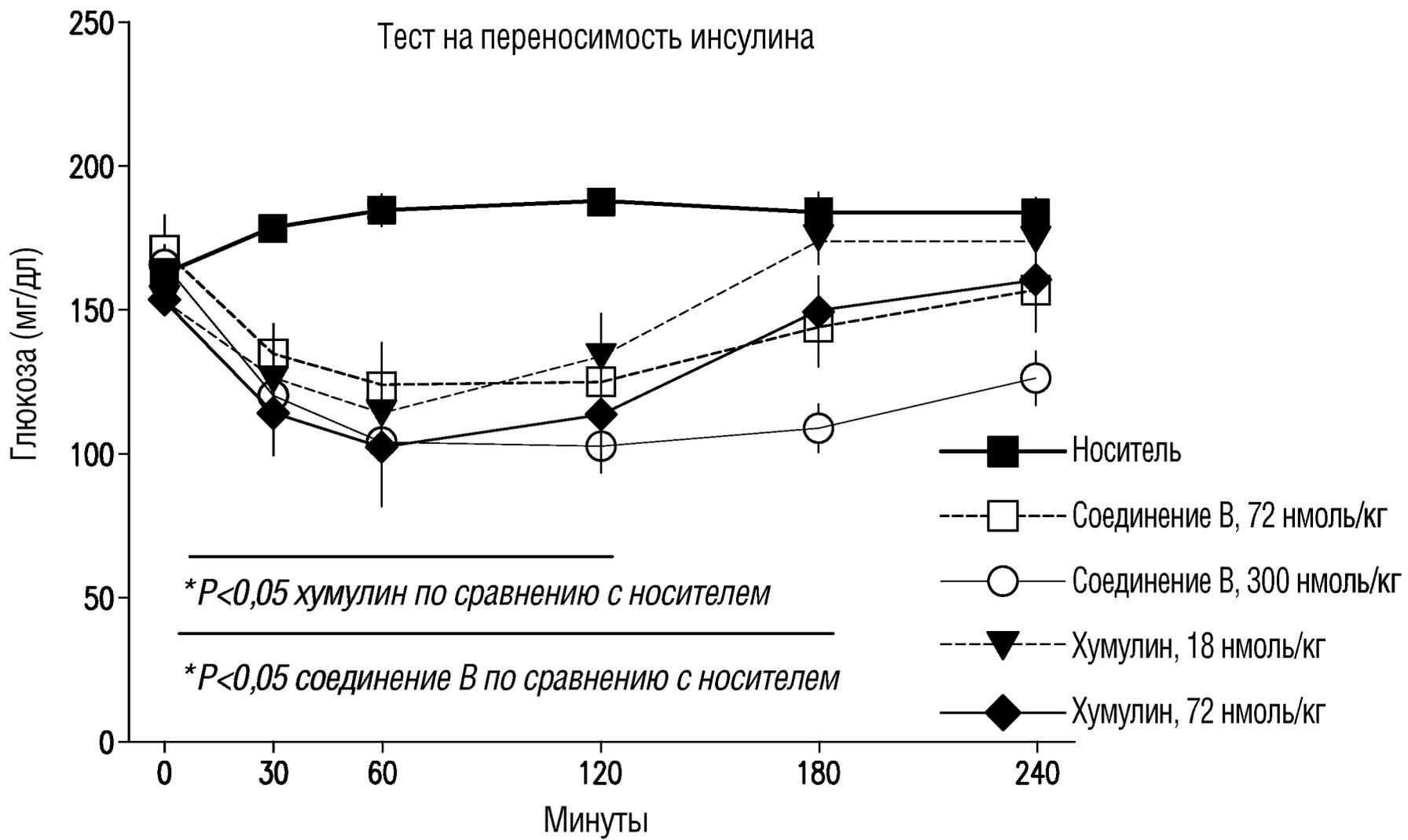
По доверенности



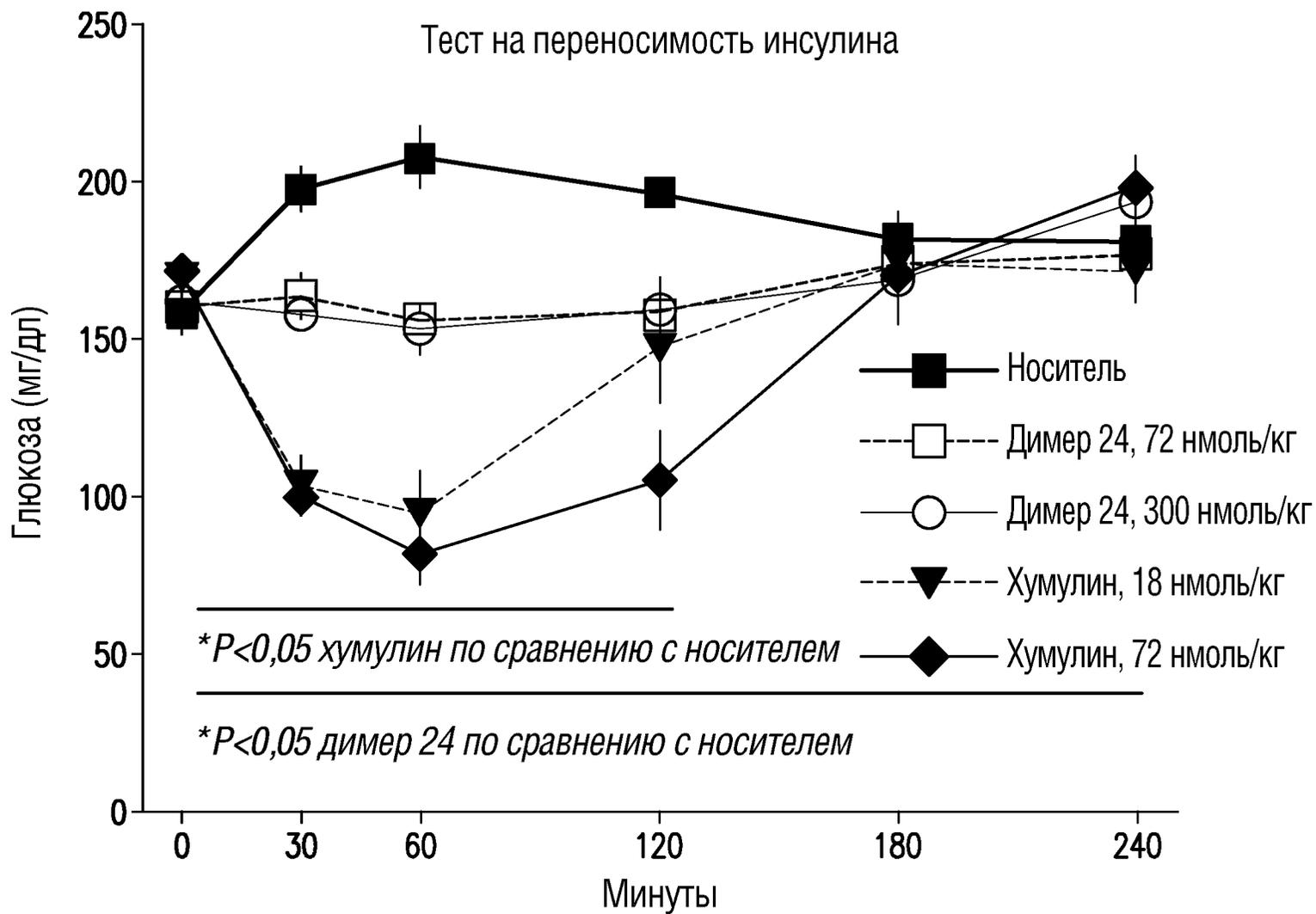
ФИГ. 1



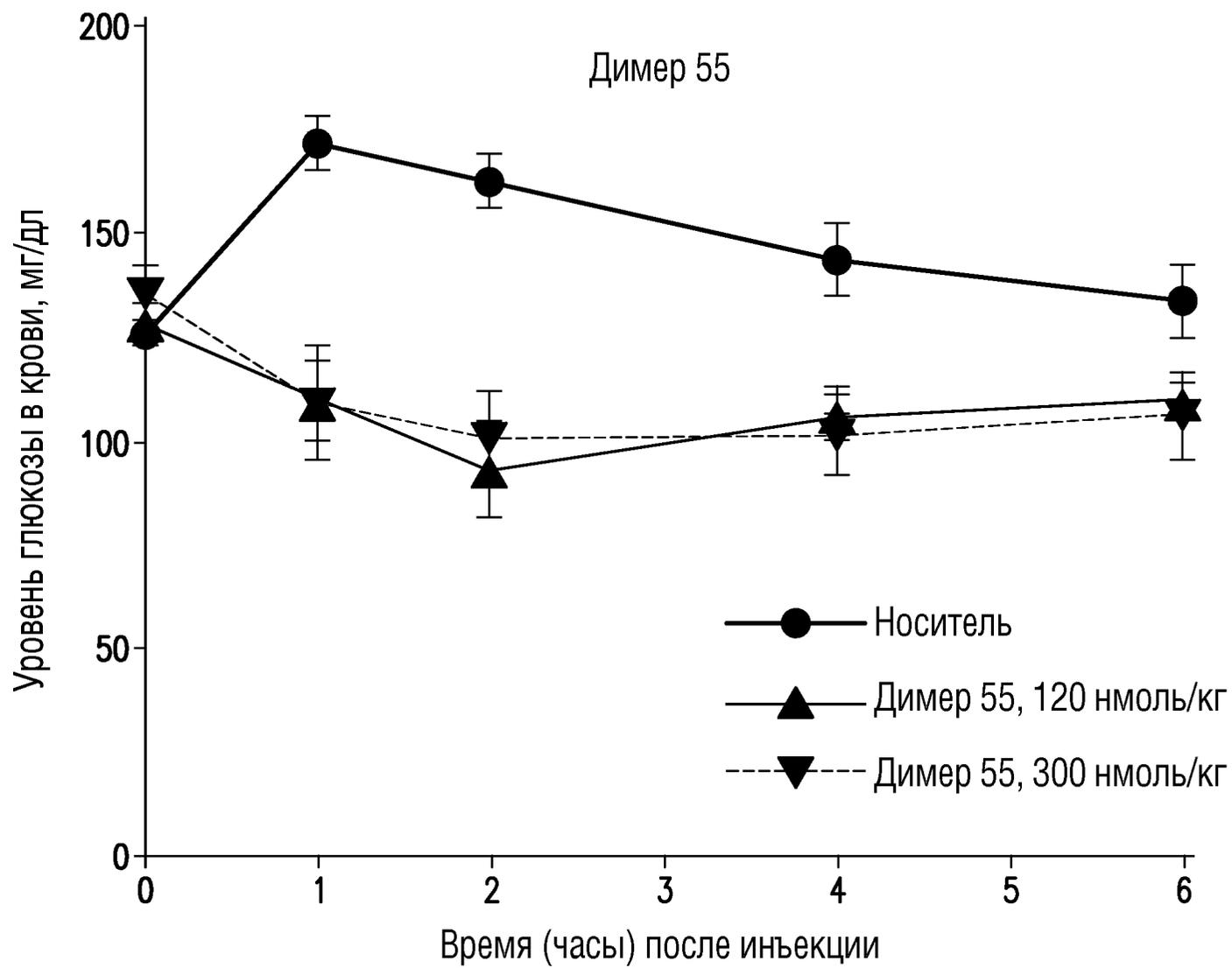
ФИГ. 2А



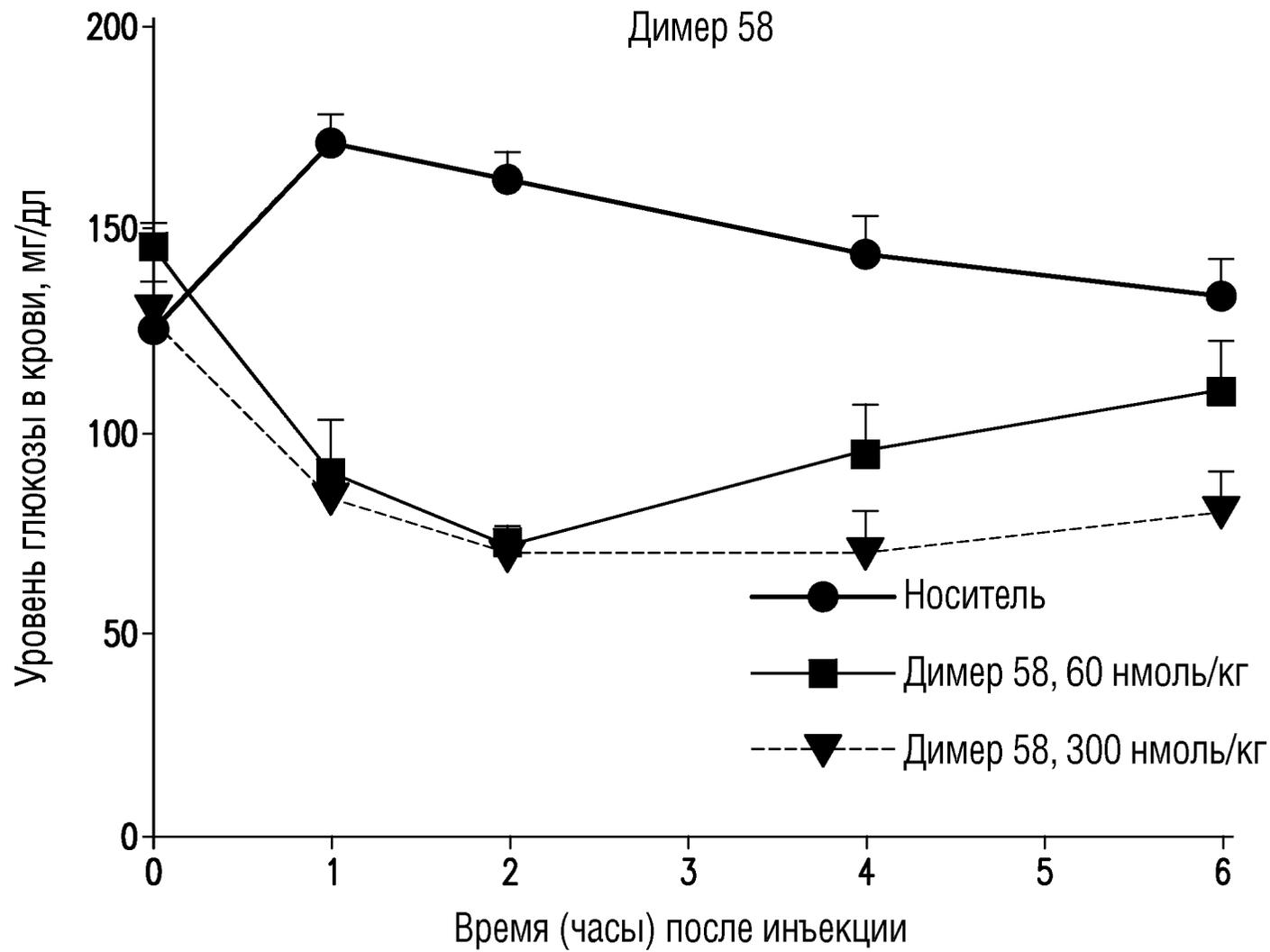
ФИГ. 2В



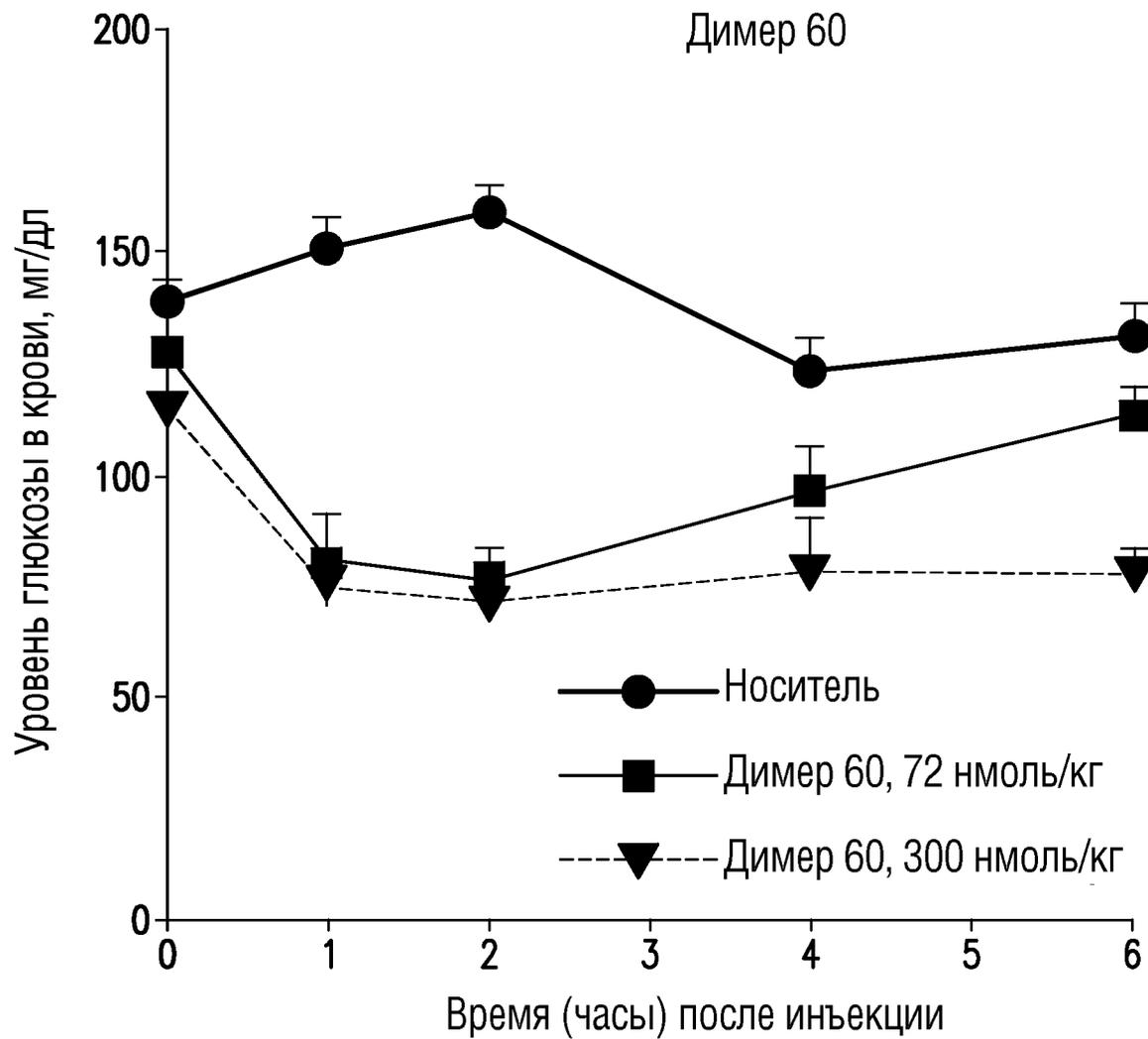
ФИГ. 2С



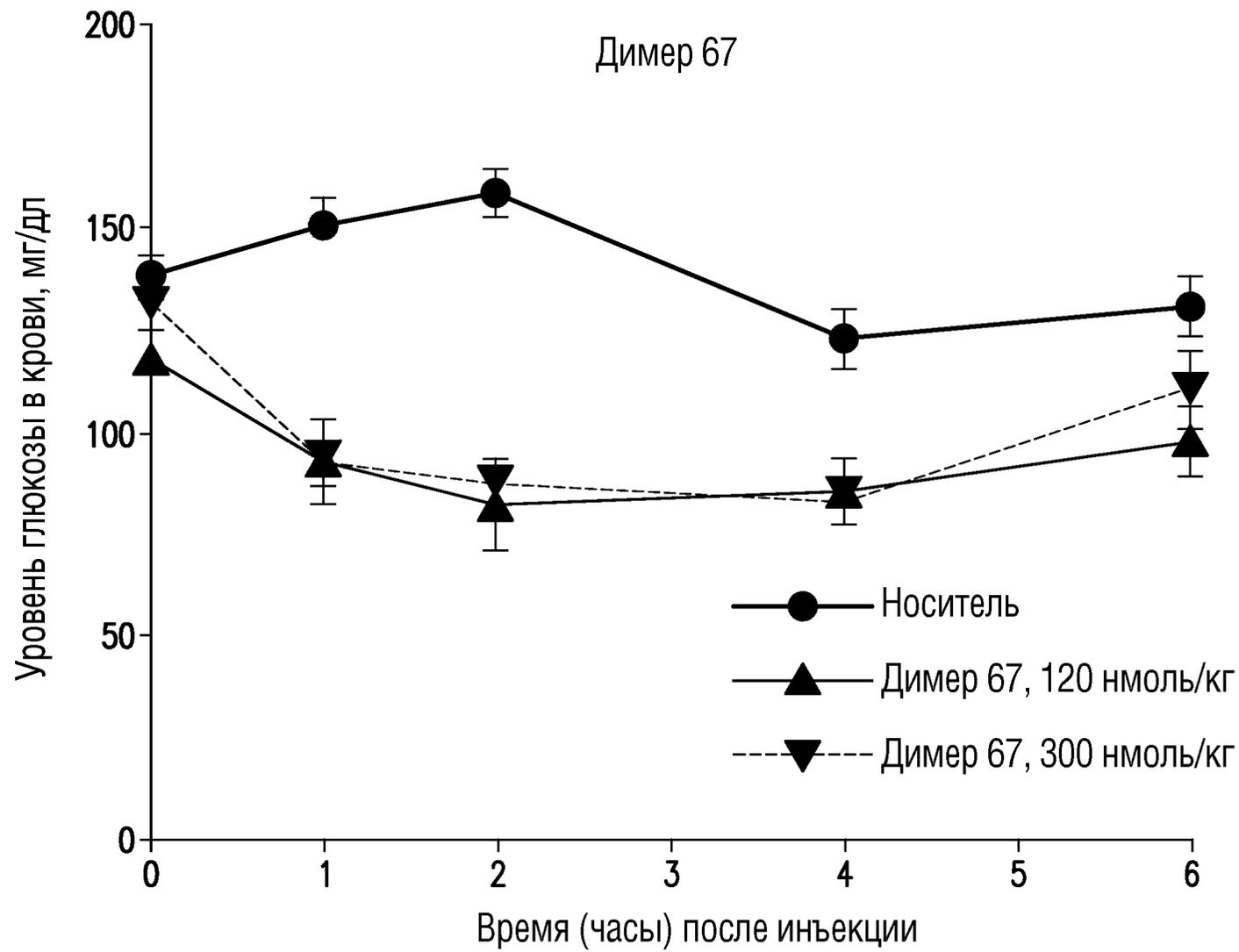
ФИГ. 2D



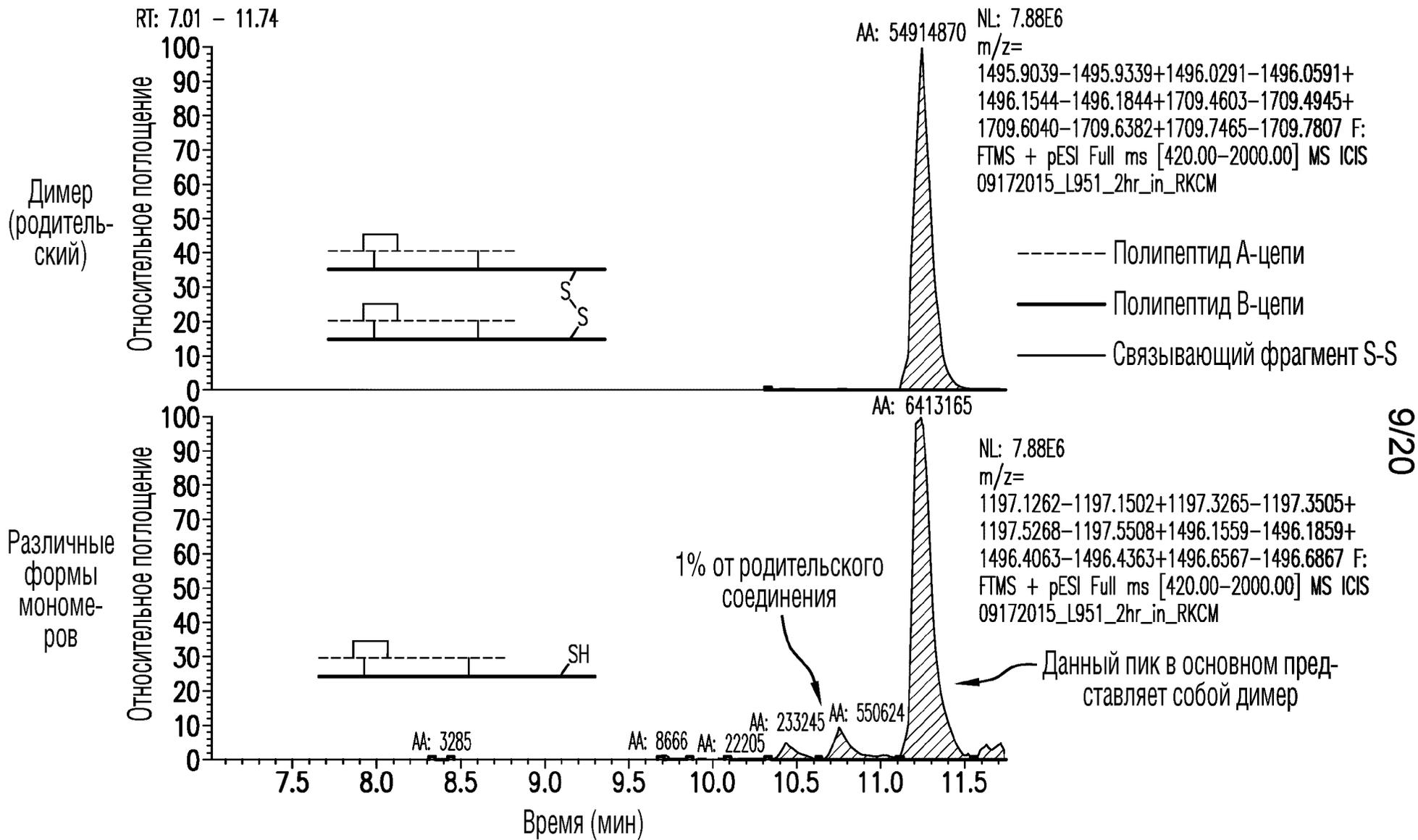
ФИГ. 2Е



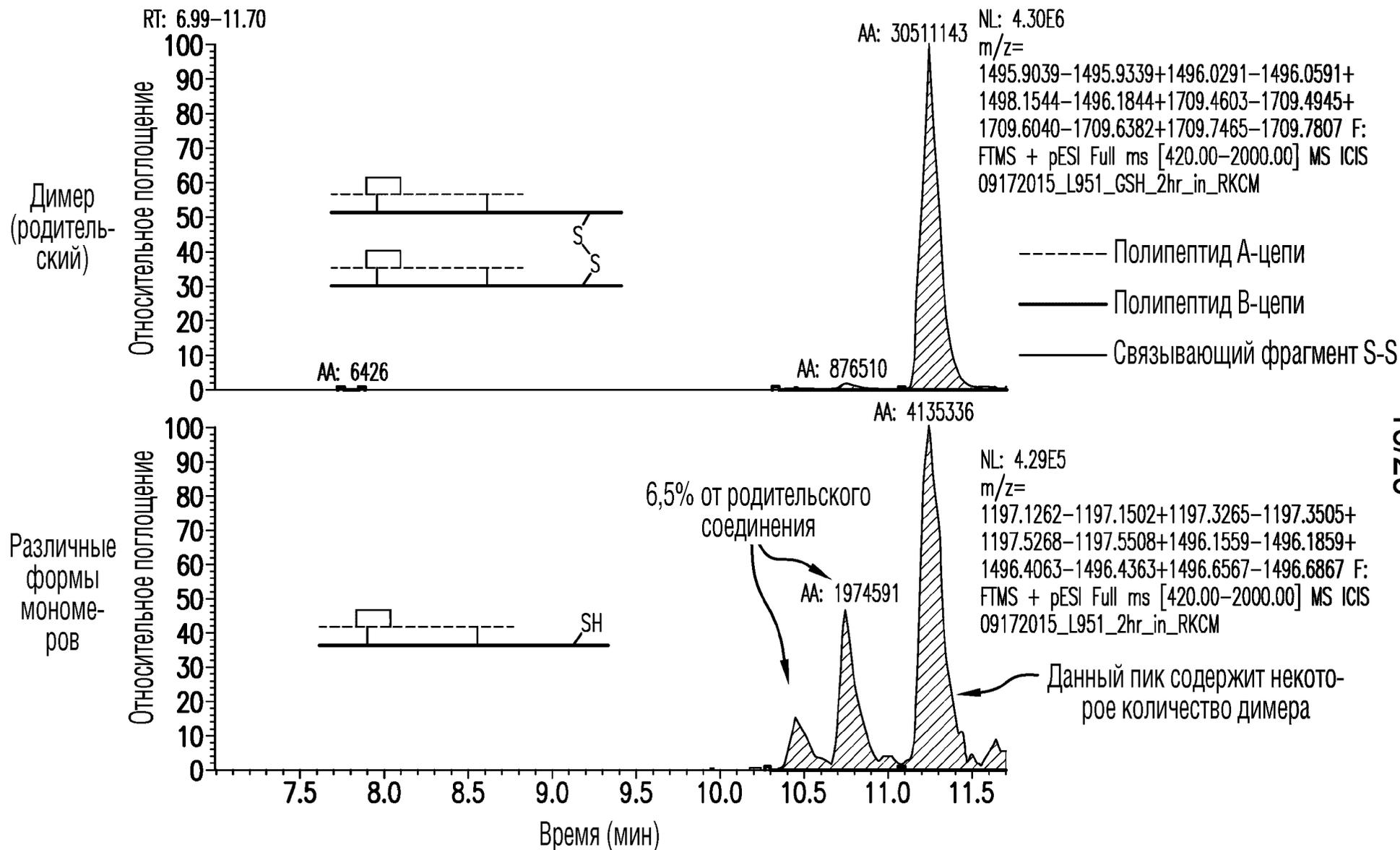
ФИГ. 2F



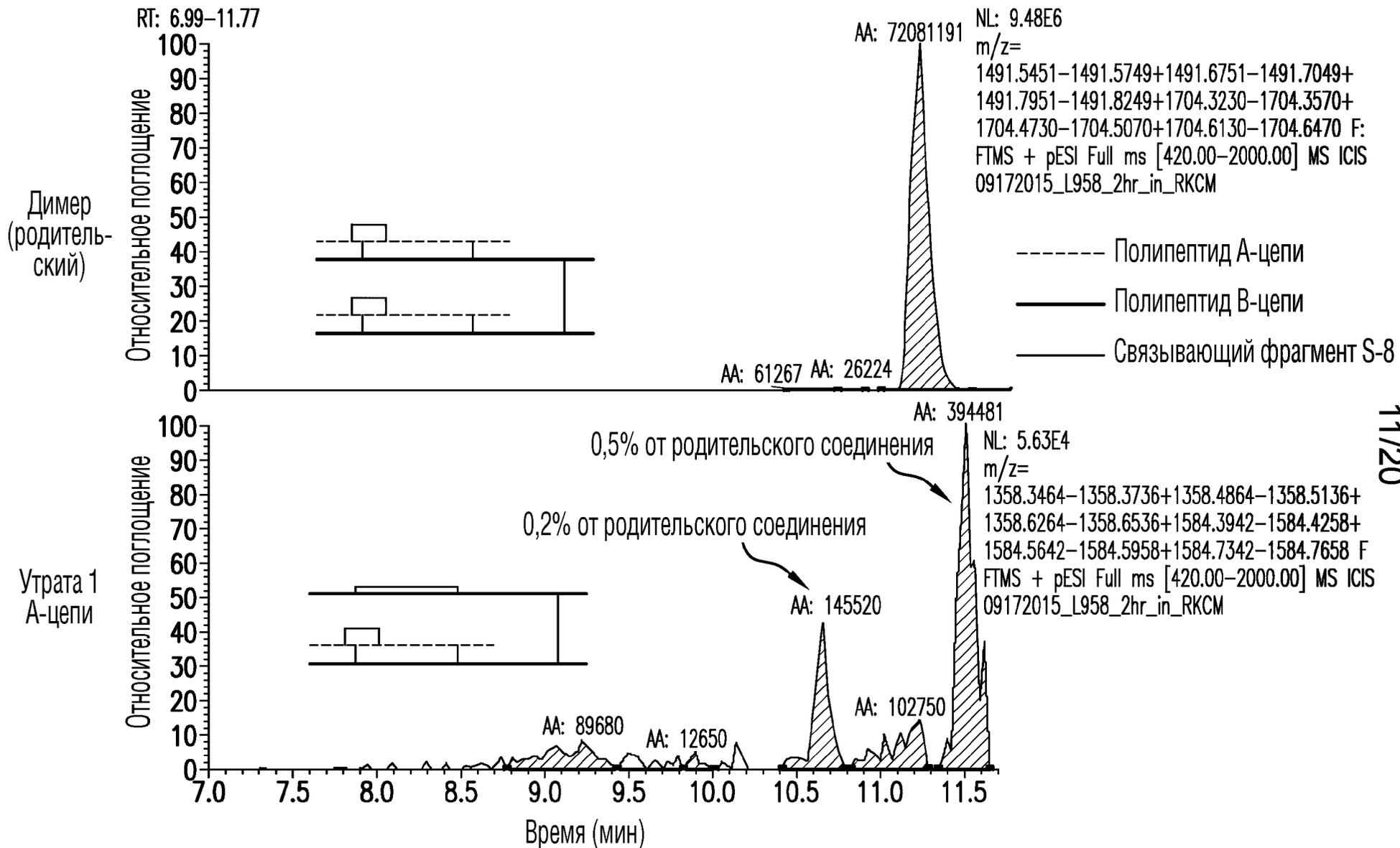
ФИГ. 2G



ФИГ. 3

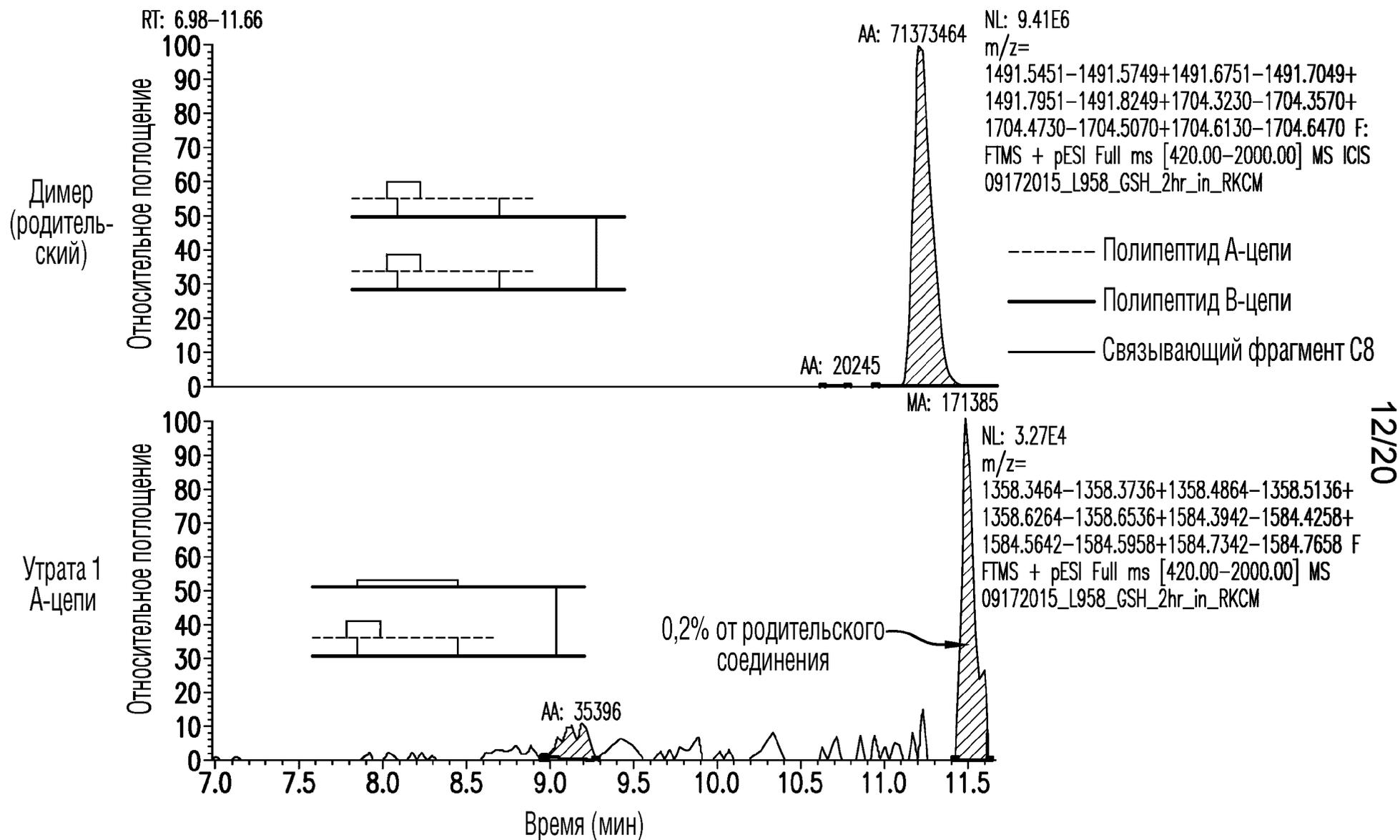


ФИГ. 4

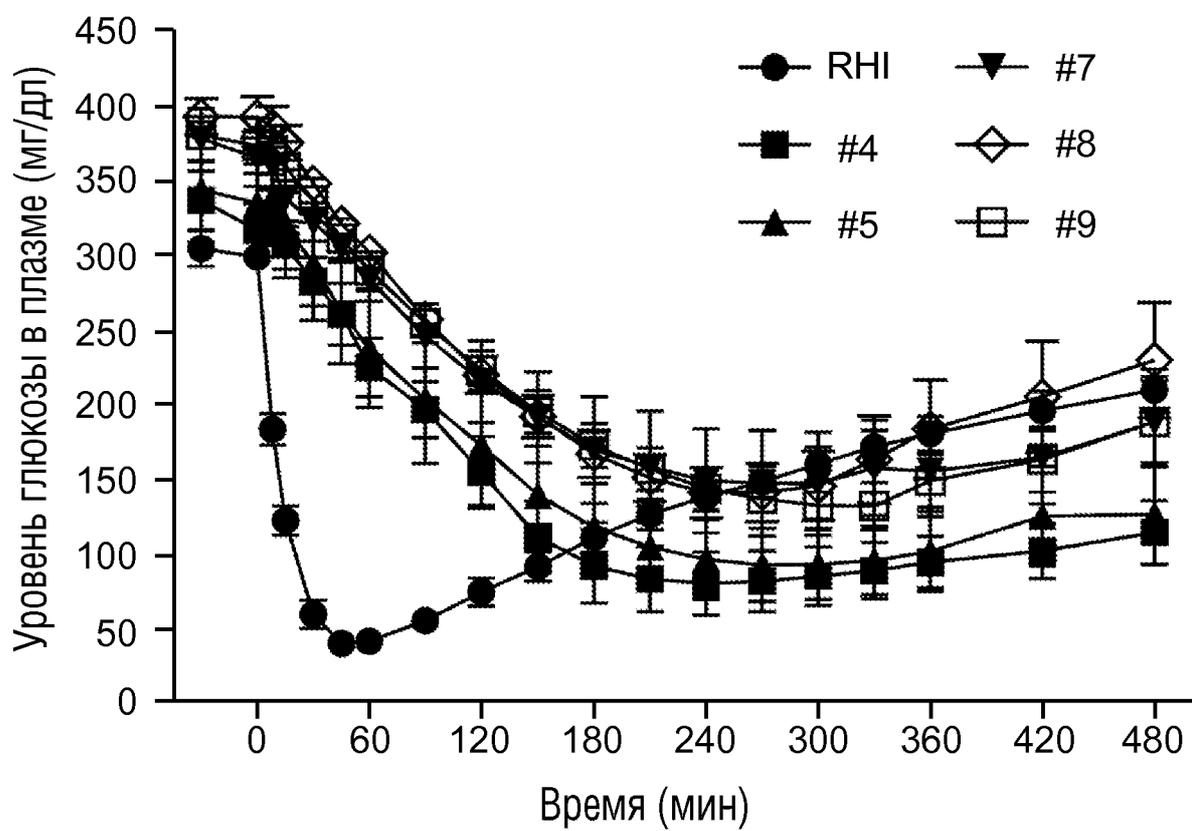


11/20

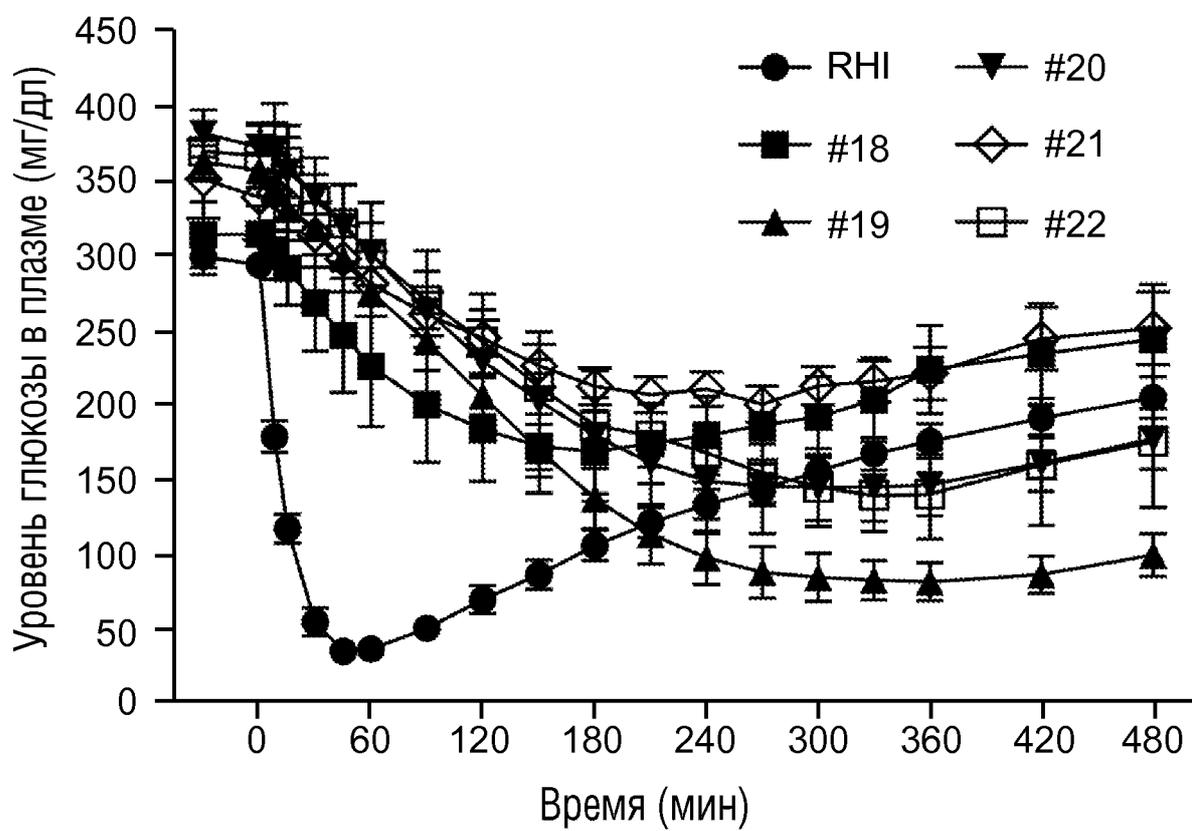
ФИГ. 5



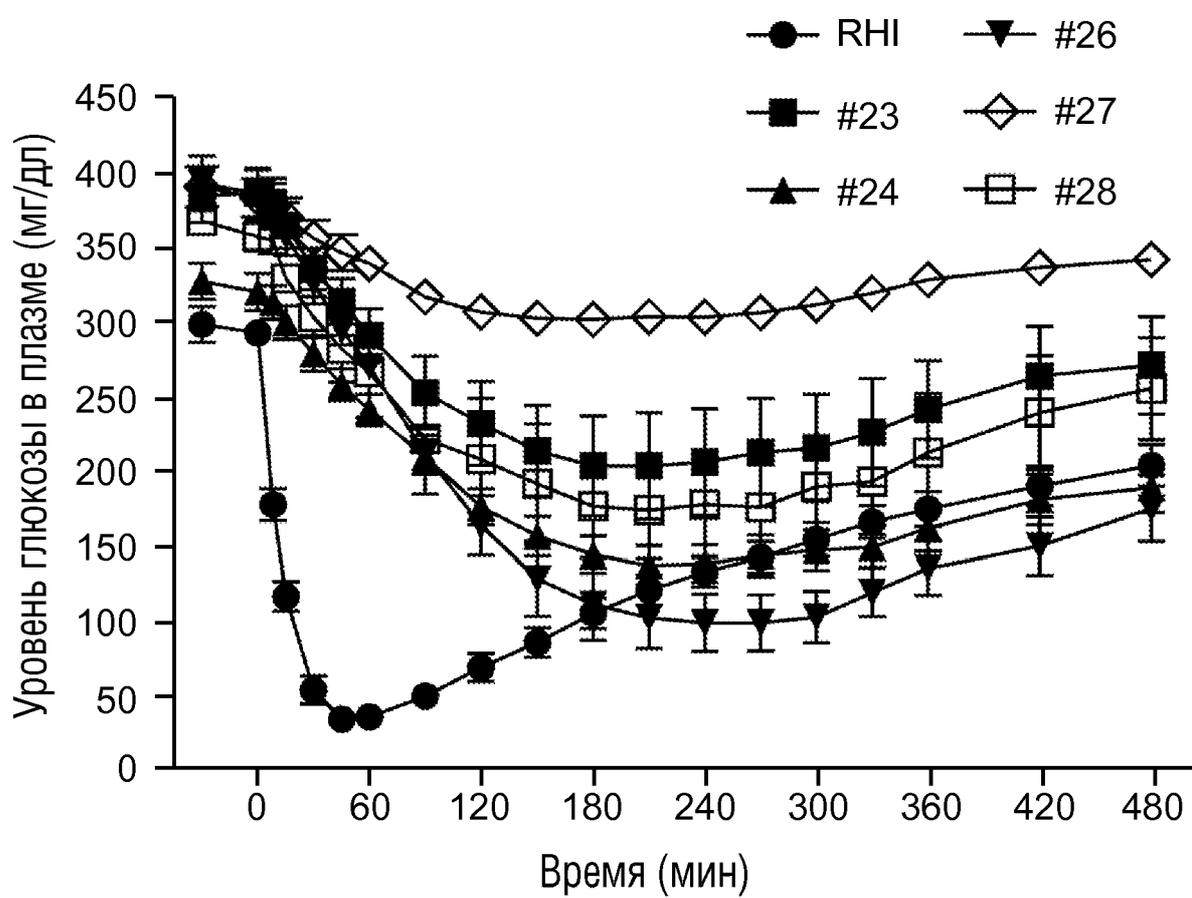
ФИГ. 6



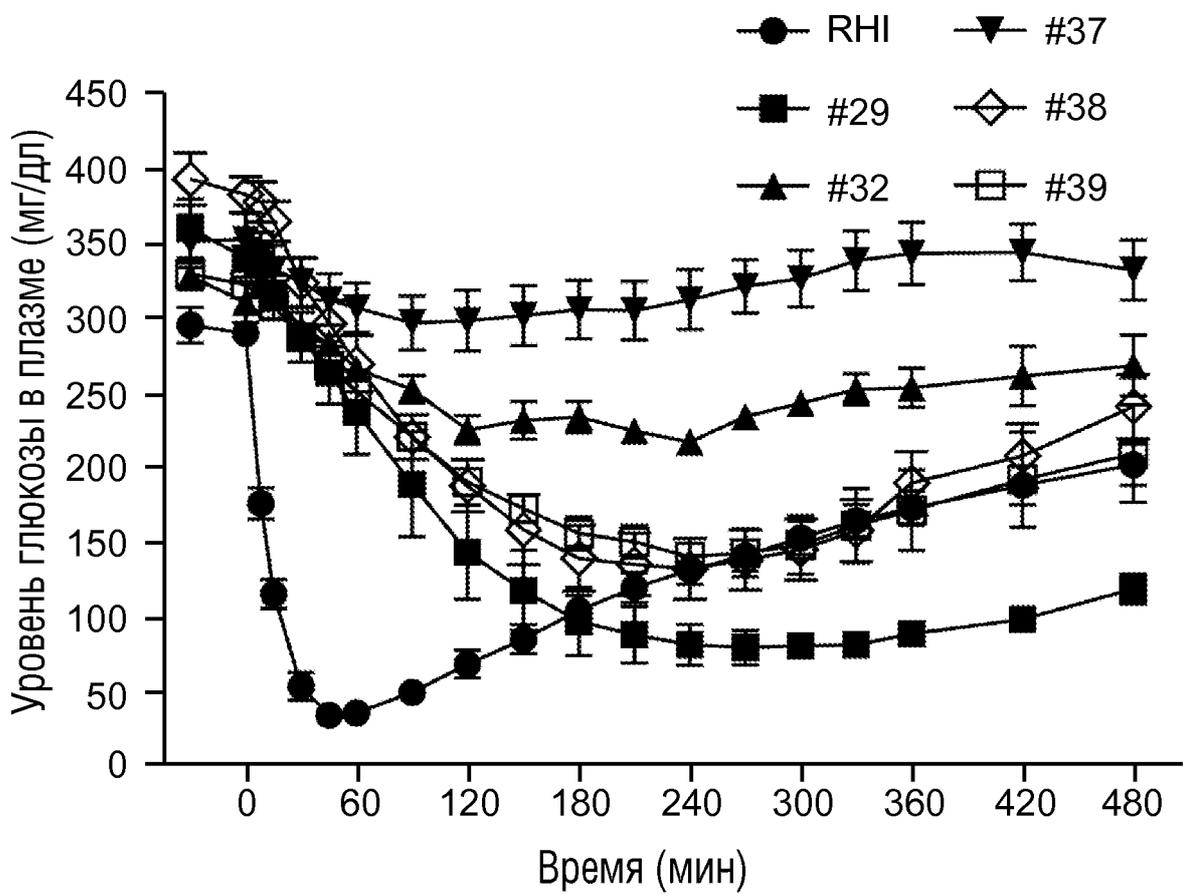
ФИГ. 7А



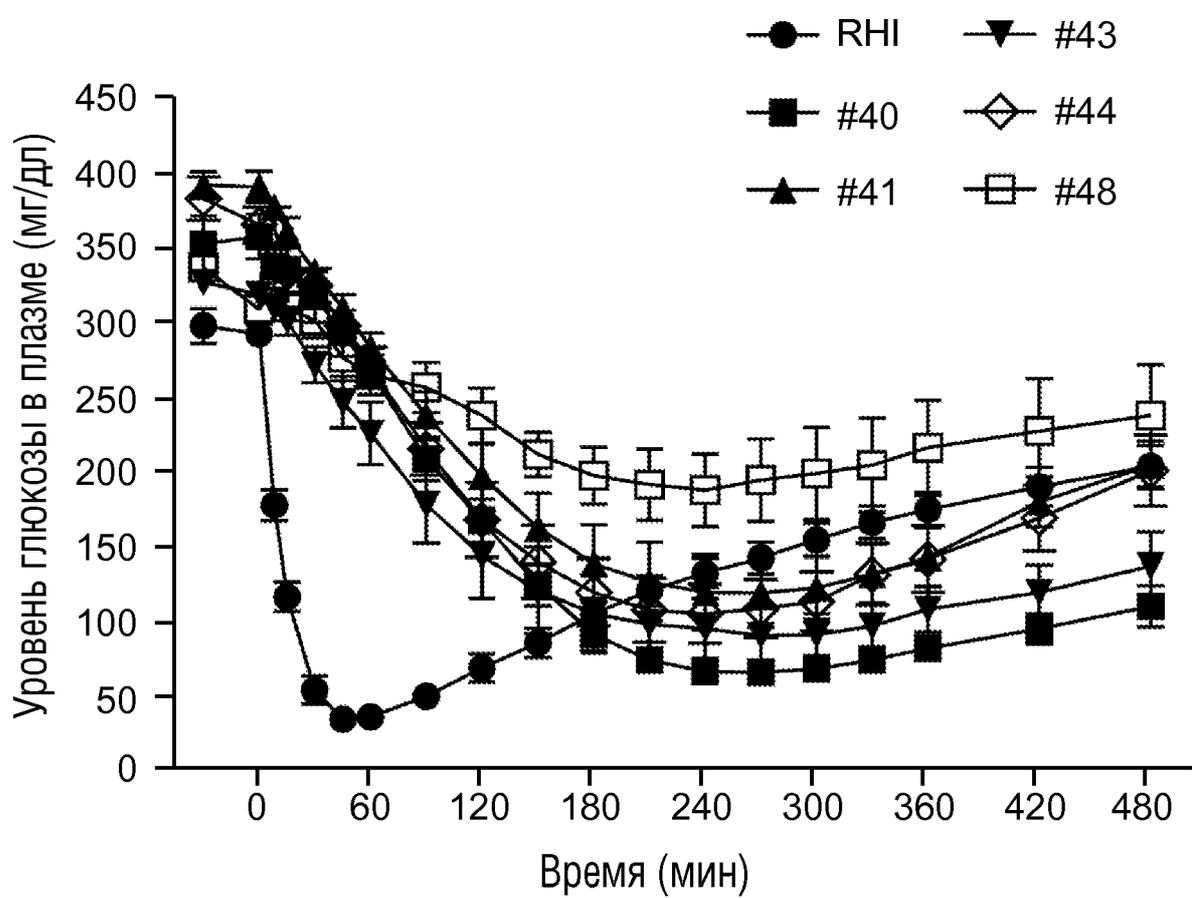
ФИГ. 7В



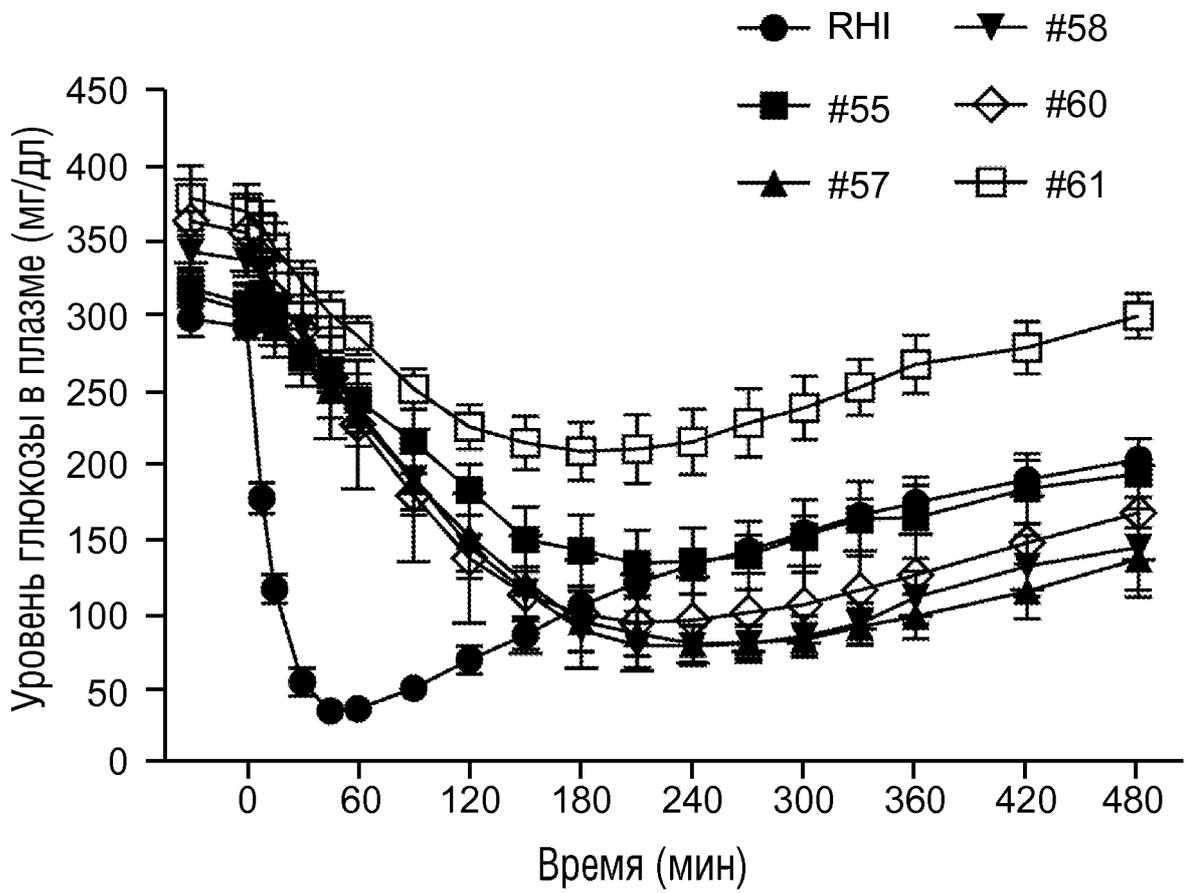
ФИГ. 7С



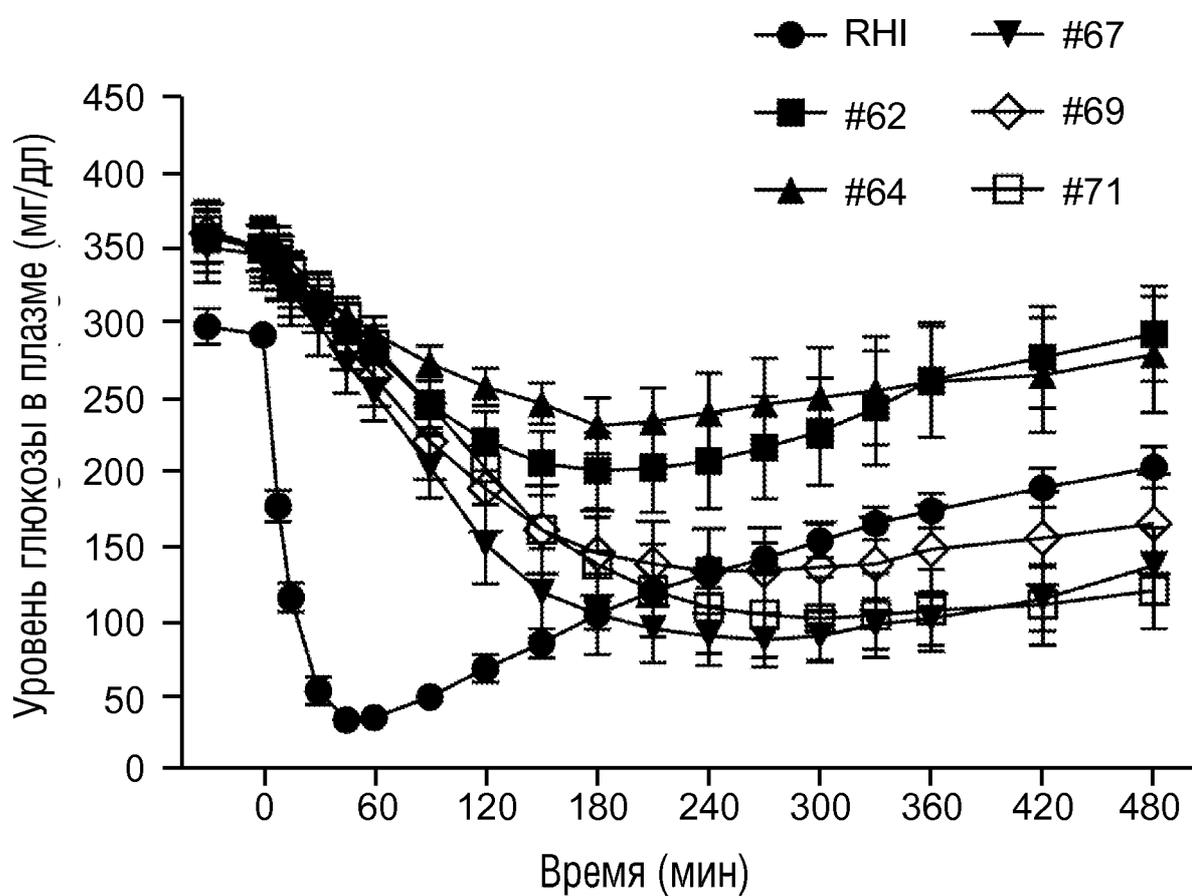
ФИГ. 7D



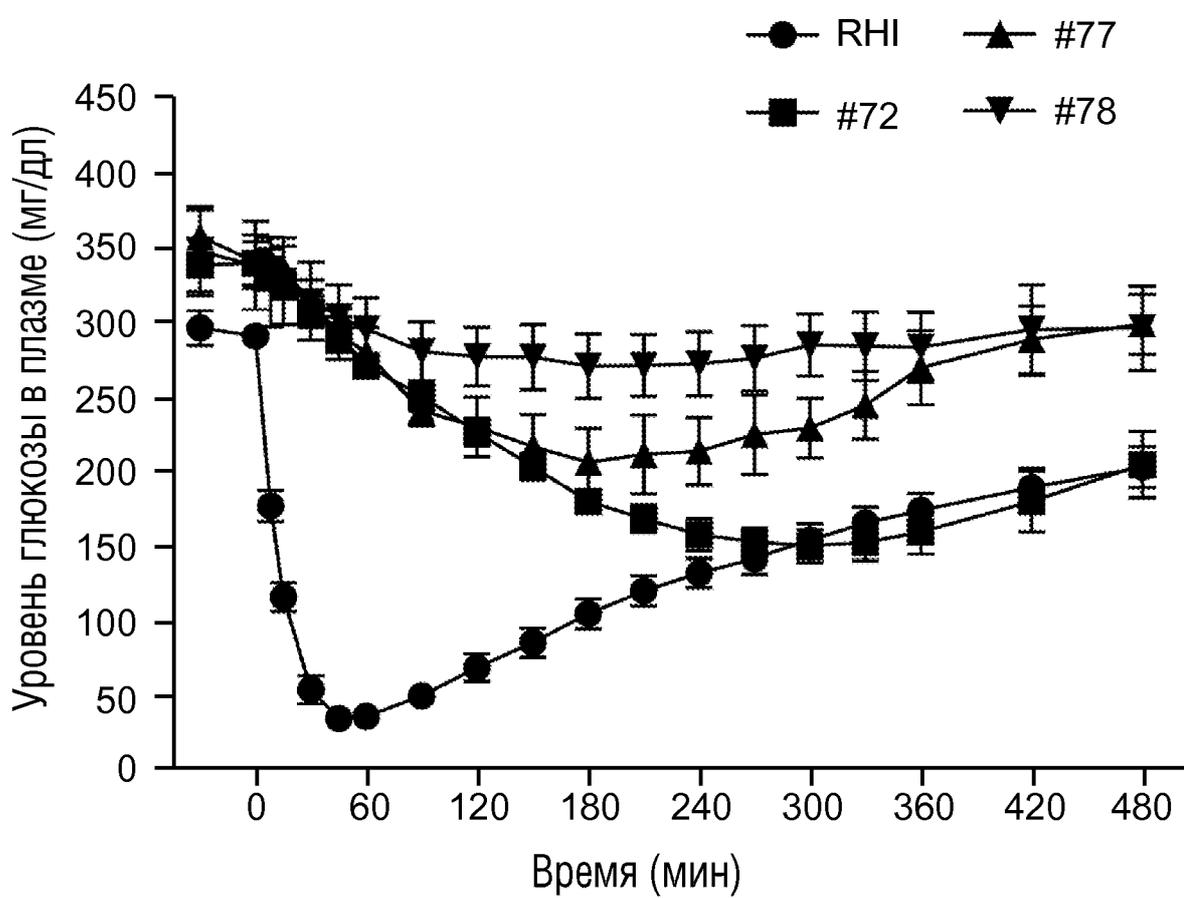
ФИГ. 7Е



ФИГ. 7F



ФИГ. 7G



ФИГ. 7Н

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 23876	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2015/061445	International filing date (<i>day/month/year</i>) 19 November 2015 (19-11-2015)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 21 November 2014 (21-11-2014)
Applicant MERCK SHARP & DOHME CORP.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 9 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
- a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
- the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
- the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1
 - as suggested by the applicant
 - as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 - as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/061445

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/061445

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1-73, 75-81(all partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, 6-13, 16-33, 36-43, 46-51, 54-60, 63-81(all partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/061445

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K14/62 A61K38/28 A61K47/48
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/052451 A2 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]) 3 April 2014 (2014-04-03) cited in the application claim 1; figures 22F, 22G -----	1-4, 6-13, 16-33, 36-43, 46-51, 54-60, 63-81
X	WO 00/50456 A2 (AVENTIS PHARMA GMBH [DE]; HOECKER HARTWIG [DE]; HAVENITH CHANTALLE [DE]) 31 August 2000 (2000-08-31) abstract; claims 1,2 ----- -/--	1-4, 6-13, 16-33, 36-43, 46-51, 54-60, 63-81

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 16 March 2016	Date of mailing of the international search report 17/06/2016
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Griesinger, Irina
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/061445

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DEPPE ET AL: "Structure-activity relationship of covalently dimerized insulin derivatives: correlation of partial agonist efficacy with cross-linkage at lysine B29", NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, SPRINGER, DE, vol. 350, no. 2, 1 August 1994 (1994-08-01), pages 213-217, XP000925874, ISSN: 0028-1298 figure 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-4, 6-13, 16-33, 36-43, 46-51, 54-60, 63-81</p>
X	<p>SCHUETTLER ET AL: "Preparation and Properties of Covalently Linked Insulin Dimers", HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT FUER PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, WALTER DE GRUYTER, BERLIN, DE, vol. 363, no. 3, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 317-330, XP000925886, ISSN: 0018-4888 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-4, 6-13, 16-33, 36-43, 46-51, 54-60, 63-81</p>
A	<p>JOHN P MAYER ET AL: "Insulin Structure and Function", BIOPOLYMERS, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 88, no. 5, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 687-713, XP008152505, ISSN: 0006-3525, DOI: 10.1002/BIP.20734 [retrieved on 2007-04-04] abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-4, 6-13, 16-33, 36-43, 46-51, 54-60, 63-81</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/061445

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2014052451	A2	03-04-2014	AU 2013323669 A1	26-03-2015
			CA 2886228 A1	03-04-2014
			CN 104981251 A	14-10-2015
			EP 2900255 A2	05-08-2015
			JP 2015532283 A	09-11-2015
			US 2015274802 A1	01-10-2015
			WO 2014052451 A2	03-04-2014

WO 0050456	A2	31-08-2000	AT 428729 T	15-05-2009
			AU 765076 B2	11-09-2003
			AU 3160100 A	14-09-2000
			CA 2363639 A1	31-08-2000
			CN 1341122 A	20-03-2002
			CY 1109241 T1	02-07-2014
			DE 19908041 A1	31-08-2000
			DK 1161452 T3	17-08-2009
			EP 1161452 A2	12-12-2001
			ES 2324093 T3	30-07-2009
			HK 1042710 A1	13-01-2006
			JP 4519324 B2	04-08-2010
			JP 2003525864 A	02-09-2003
			PT 1161452 E	08-07-2009
			US 2002160938 A1	31-10-2002
			WO 0050456 A2	31-08-2000
ZA 200106971 A	29-01-2003			

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-4, 6-13, 16-33, 36-43, 46-51, 54-60, 63-81(all partially)

relate to "Dimer 1" as shown in claim 74, said compound comprising two insulins, wherein each insulin respectively comprises an A and a B chain linked by two disulfide bridges and wherein the A chain comprises a further disulfide bridge and wherein the two insulins are linked by the linker shown for "Dimer 1" in claim 74 and variants of "Dimer 1" having the same linker and a similar structure; the corresponding compositions and medical uses.

2. claims: 1-81(partially)

relate to "Dimer 2" as shown in claim 74, said compound comprising two insulins, wherein each insulin respectively comprises an A and a B chain linked by two disulfide bridges and wherein the A chain comprises a further disulfide bridge and wherein the two insulins are linked by the linker shown for "Dimer 2" in claim 74 and variants of "Dimer 2" having the same linker and a similar structure; the corresponding compositions and medical uses.

- 3-94. claims: 1-93(partially)

relate to "Dimer 3" to "Dimer 94" as shown in claim 74, said compounds comprising two insulins, wherein each insulin respectively comprises an A and a B chain linked by two disulfide bridges and wherein the A chain comprises a further disulfide bridge and wherein the two insulins are linked by the linker shown for "Dimer 3" to "Dimer 94" in claim 74, respectively and variants of dimers 3-94 having respectively the same linker and a similar structure; the corresponding compositions and medical uses.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-73, 75-81(all partially)

The subject-matter of claims 1-73 and 75-81 is not supported by the description and not sufficiently disclosed (Articles 5 and 6 PCT), since it is only defined by the desired property without providing the corresponding structural features. According to the claims, the compounds are supposed to be an "insulin receptor partial agonist" or "insulin analog dimer". However, according to the application, the specific combination of features, namely (1) the sequence of the insulin or insulin analog, (2) the type and length of the linker, (3) the position of the amino acids linked by the linker and (4), optionally, the substituent at the N-terminus of the A or B chain, is responsible for the property of the dimer. The application does not seem to comprise any general teaching how said features need to be combined in order to achieve a desired property. Hence, the skilled practitioner needs to rely on trial and error in order to identify an insulin receptor partial agonist or insulin analog dimer. Consequently, the subject-matter of the afore-mentioned claims does not fulfill the requirements of Articles 5 and 6 PCT.

Independent of the lack of clarity due to the lack of structural features, it is not clear from the claims what the applicant considers to be the contribution to the art for the following reasons. Claims 1, 11, 21, 31, 41, 49, 57, 74, 82 and 88 are formulated as independent claims, wherein claims 1, 11, 21, 31 and 57 relate to an insulin receptor partial agonist, claims 41, 49 and 88 to an insulin analog dimer, claim 82 to an insulin dimer and claim 74 to a compound without providing any function. Hence, the present set of claims comprises numerous independent claims of the same category, wherein the products are not interrelated. Therefore, the present set of claims lacks conciseness making it as a whole unclear. The lack of clarity is even more pronounced due to the fact that the whole set of claims comprises 63 pages and that claim 74 lists on 44 pages 94 compounds, wherein each compound could be considered to be an independent claim. Furthermore, claims 82-93 relate to an insulin dimer comprising a linker defined by an arbitrary number, which seems to refer to the linkers 1-50 provided in the table on pages 49-59 of the description. However, not all linkers of the dimers listed in claim 74 are also listed in the table of the linkers. For example, the linker of "Dimer 1" does not seem to be disclosed in the table of the linkers. Furthermore, the application does not provide any indication which linker is used in which dimer, i.e. an indication for the correspondence between dimers listed in claim 74 and linkers listed in the table in the description. In conclusion, the way the claims are drafted makes it impossible to identify what the applicant considers to be the contribution to the art.

Furthermore, the contribution to the art is not clear from the description. It is disclosed in the description of the application that insulin and insulin analogs are well-known in the art (see e.g. description: page 21, lines 6 to page 23, line 5). Furthermore, insulin dimers are well-known in the art (description: page 27, lines 7-18). In addition, the presence of a substituent at the N-terminus of at least one A or B chain cannot be the

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

invention, since said feature is not present in all claims (see e.g. claim 21, where the substituent is optional). Furthermore, prior art documents such as D1 seem to disclosed all common features of the dimers of the application (see in particular Figures 22F and G). According to the description, the inventors have discovered that the level of insulin activity and partial agonist activity of the dimers is a function of the dimeric structure, the sequence of the insulin analog, the length of the dimerization linker and the site of dimerization that connects the two insulin polypeptides (description: page 27, lines 18-23). Hence, it seems that the applicant sees the contribution to the art in the specific combination of the features (1) the sequence of the insulin or insulin analog, (2) the type and length of the linker, (3) the position of the amino acids linked by the linker and (4), optionally, the substituent at the N-terminus of the A or B chain. The only claim which clearly defines the combination of the four features is claim 74, which lists the structure of 94 dimers.

In conclusion, the deficiencies under Articles 5 and 6 PCT are to such an extent that the subject-matter of the claims can not be searched completely. Therefore, the search has to be limited to the structurally defined compounds of dimers 1-94 of claim 74 and variants having the same linker and a similar structure and dimers as defined in claims 82-93.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.