

**УКРАЇНА****(19) UA****(11) 119533****(13) C2****(51) МПК****C07K 14/62** (2006.01)**C12N 15/17** (2006.01)**A61K 38/28** (2006.01)**A61K 47/68** (2017.01)**A61K 47/60** (2017.01)**A61P 5/50** (2006.01)

**МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2015 07940**

(22) Дата подання заявки: **26.02.2014**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.07.2019**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **10-2013-0020703, 10-2013-0082511, 10-2014-0006937**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **26.02.2013, 12.07.2013, 20.01.2014**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: **KR, KR, KR**

(41) Публікація відомостей про заяву: **25.01.2016, Бюл.№ 2**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.07.2019, Бюл.№ 13**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/KR2014/001593, 26.02.2014**

(73) Власник(и): **ХАНМІ ФАРМ. КО., ЛТД., 214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, Republic of Korea (KR)**

(74) Представник: **Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30**

(72) Винахідник(и): **Хван Сан Юн (KR), Хух Йон Хо (KR), Кім Чін Юн (KR), Хон Сун Хі (KR), Чхой Ін Йон (KR), Чун Сун Юб (KR), Квон Се Чхан (KR), Кім Те Чін (KR), Кім Х'юн Ук (KR), Чан М'юн Х'юн (KR), Кім Сен Су (KR)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2011028813 A2, 10.03.2011
Vigneri R. et al. Insulin and its analogs: actions via insulin and IGF receptors. Acta diabetol, 2010, vol. 47, no. 4, p. 271-278
KR 10-2012-0135123 A, 12.12.2012
Database NCBI. No. NP_000198.1, 17.02.2013
WO 2010080606 A1, 15.07.2010
Kristensen C. et al. Alanine scanning mutagenesis of insulin. Journal of biological chemistry, 1997, vol. 272, no. 20, p. 12978-12983
WO 2011122921 A2, 06.10.2011
KR 20110134209 A, 14.12.2011
Ying-Chi Chu et al. the A14 position of insulin tolerates considerable structural alterations with modest effects on the biological behavior of the hormone. Journal of protein chemistry, 1992, vol. 11, no. 5, p. 571-577
US 2012071402 A1, 22.03.2012

(54) АНАЛОГ ІНСУЛІНУ ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Винахід стосується аналога інсуліну, де амінокислотну послідовність інсуліну модифіковано шляхом заміни 14-ої амінокислоти у ланцюзі А глутаміновою кислотою або аспарагіном.

UA 119533 C2

Винахід також стосується кон'югату аналога інсуліну, композиції інсуліну тривалої дії, яка має подовжений час життя, та способу отримання такого кон'югату.

Винахід стосується аналога інсуліну, який має зменшений титр інсуліну та зменшену, порівняно до природної форми, зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептора з метою подовження часу напівжиття інсуліну в крові, кон'югату, отриманого зв'язуванням цього аналога інсуліну та носія, а також композиції довготривалої дії, що містить цей кон'югат та способу отримання цього кон'югату.

Як відомо, усунення білків *in vivo* відбувається різними шляхами, як-то руйнуванням їх протеолітичними ферментами у крові, виведенням їх крізь нирки або з допомогою дії рецепторів. Внаслідок цього було здійснено багато зусиль, спрямованих до покращення терапевтичної ефективності уникненням механізмів виведення білків та подовження часу напівжиття фізіологічно активних білків.

З іншого боку, інсулін є гормоном підшлункової залози людського організму, який регулює рівень глюкози в крові та відіграє важливу роль у підтримці нормальних рівнів глюкози в крові при привнесенні надлишкової глюкози крові у клітини для забезпечення їх енергією. Проте у хворих на цукровий діабет цей фермент не функціонує належним чином через його відсутність, стійкість до нього та втрату функціональної активності бета-клітин, отже стає неможливим застосування глюкози в крові як джерела енергії, та рівень її зростає, що веде до гіперглікемії та зрештою відбувається її екскреція з сечею, що впливає на розвиток різних ускладнень. Отже, інсулінова терапія є важливою для пацієнтів з аномальною секрецією інсуліну (Тип I) або стійкістю до інсуліну (Тип II), та рівні глюкози у крові можна нормально регулювати введенням інсуліну. Однак, як і інші білкові та пептидні гормони, інсулін має дуже короткий час напівжиття *in vivo* та таким чином має недолік, який полягає у потребі повторного введення, яке при частому застосуванні викликає у пацієнтів сильний біль та дискомфорт. З цією метою для покращення якості життя подовженням часу напівжиття білка *in vivo* та зменшенням частоти введення було проведено багато досліджень білкової композиції та хімічної кон'югації (отримання кон'югату жирної кислоти, кон'югату полімерного поліетилену). Наявні у продажу препарати інсуліну тривалої дії охоплюють інсулін гларгін виробництва компанії Sanofi Aventis (препарат Лантус зі строком дії приблизно 20-22 год.), інсулін детемірг (препарат Левемірг зі строком дії приблизно 18-22 год.) та трезиба (препарат деглудек зі строком дії приблизно 40 год.) виробництва компанії Novo Nordisk. Ці інсулінові композиції тривалої дії не призводять до появи пікових концентрацій інсуліну в крові, та таким чином, вони є прийнятними для застосування як базального інсуліну. Однак, оскільки ці композиції не мають достатньо тривалого часу напівжиття, зберігається незручність, яка полягає у потребі застосовувати одну або дві ін'єкції на добу. Також в досягненні поставленої мети обмежено тим, що частота застосування інсуліну значно мала, щоб покращити зручності пацієнтів, хворих на діабет та які потребують тривалого застосування інсуліну.

У попередніх дослідженнях було повідомлено про відкриття конкретного способу виведення інсуліну *in vivo*, завдяки якому 50 % або ще більшу кількість інсуліну виводять з нирки, та решту виводять із застосуванням опосередкованого рецептором процесу виведення (RMC) з цільового місця, як-то м'язи, жир, печінка тощо.

У зв'язку з цим, у багатьох дослідницьких роботах, в тому числі J Pharmacol Exp Ther (1998) 286: 959, Diabetes Care (1990) 13: 923, Diabetes (1990) 39: 1033 було повідомлено, що зменшення активності *in vitro* з метою уникнення RMC інсуліну призводить до збільшення його рівня в крові. Однак, навіть при зменшенні RMC ці інсулінові аналоги, які мають зменшену зв'язувальну спорідненість до рецептору не можуть уникнути виведення з організму через нирки та, відповідно, існує обмеження помітного подовження часу напівжиття таких сполук у крові.

Зважаючи на ці умови, винахідники здійснили багато зусиль, спрямованих до подовження часу напівжиття інсуліну у крові. В результаті вони відкрили новий аналог інсуліну, який не має природної інсулінової послідовності, але його штучна інсулінова послідовність демонструє зменшений титр *in vitro* та зменшену зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору, отже може бути зменшено його виведення нирками. Цей винахід було завершено після відкриття того, що час напівжиття інсуліну у крові може бути додатково збільшено з допомогою зв'язування цього аналога інсуліну з Fc - фрагментом імуноглобуліну як характерного носія, ефективного для подовження часу напівжиття.

Метою за винаходом є отримання аналога інсуліну, який має зменшений титр *in vitro* з метою подовження часу напівжиття інсуліну *in vivo* та кон'югату, отриманого зв'язуванням його з носієм.

Конкретно метою за винаходом є отримання аналога інсуліну, який має зменшений, у порівнянні з природною формою, титр інсуліну.

Іншим метою за винаходом є отримання аналога інсуліну, кон'югат якого отримано зв'язуванням цього аналога інсуліну з носієм.

Іншим метою за винаходом є отримання композиції інсуліну тривалої дії, в тому числі кон'югату аналога інсуліну.

Іншим предметом за винаходом є надання способу отримання кон'югату аналога інсуліну.

Іншим предметом за винаходом є надання способу подовження часу напівжиття *in vivo* із застосуванням аналога інсуліну або кон'югату аналога інсуліну, отриманого зв'язуванням аналога інсуліну з носієм.

Іншим предметом за винаходом є надання способу лікування хвороб, пов'язаних з інсуліном, який зокрема полягає у введенні аналога інсуліну або кон'югату аналога інсуліну пацієнту, який того потребує.

У одному аспекті, для досягнення зазначених вище цілей, винаходом передбачено аналог інсуліну, який має зменшений, у порівнянні з природною формою, титр інсуліну та змінену амінокислоту В - ланцюга або А - ланцюга.

У одному особливому втіленні, винаходом передбачено аналог інсуліну, який має зменшену зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору.

У іншому особливому втіленні, винаходом передбачено штучний аналог інсуліну, в якому одну амінокислоту, вибрану з групи, яка складається з амінокислоти В-ланцюга у 8, 23, 24 та 25 положеннях та амінокислоти А-ланцюга у 1, 2 та 19 положеннях, заміщено аланіном, або в якому амінокислоту А-ланцюга у 14 положенні заміщено глютаміновою кислотою або аспарагіном у аналогу інсуліну за винаходом.

У іншому особливому втіленні, винаходом передбачено аналог інсуліну, вибраний з групи, яка охоплює послідовності SEQ ID №№ 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 та 36.

У іншому аспекті, винаходом передбачено кон'югат аналога інсуліну, отриманий зв'язуванням описаного вище аналога інсуліну з носієм, здатним до подовження часу напівжиття.

У одному особливому втіленні, винаходом передбачено кон'югат аналога інсуліну, який отримано зв'язуванням (i) описаного вище аналога інсуліну та (ii) Fc-ділянки імуноглобуліну через (iii) пептидний лінкер або непептидильний лінкер, вибраний з групи, яка охоплює поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь, сополімери етиленгліколю та пропіленгліколю, поліоксиетіловані поліоли, полівінілові спирти, полісахариди, декстран, полівініловий етиловий етер, біорозкладані полімери, ліпідні полімери, хітини, гіалуронову кислоту, а також їх комбінації.

У іншому аспекті, винаходом передбачено композицію інсуліну тривалої дії, яка містить описаний вище кон'югат аналога інсуліну, який відрізняється збільшеною тривалістю дії та стійкістю *in vivo*.

У іншому особливому втіленні, винаходом передбачено композицію довготривалої дії, яку застосовують для лікування діабету.

У іншому втіленні, винаходом передбачено спосіб отримання описаного вище кон'югату аналога інсуліну.

У іншому особливому втіленні, винаходом передбачено спосіб подовження часу напівжиття *in vivo* із застосуванням аналога інсуліну або кон'югату аналога інсуліну, отриманого зв'язуванням аналога інсуліну та носія.

У іншому особливому втіленні, винаходом передбачено спосіб лікування хвороб, пов'язаних з інсуліном, який зокрема полягає у введенні аналога інсуліну або кон'югату аналога інсуліну пацієнту, який того потребує.

Штучний аналог інсуліну за винаходом має зменшений, порівняно до природної форми, титр інсуліну та зменшену зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору, уникаючи тим самим дії механізмів виведення інсуліну *in vivo*. Отже, цей аналог інсуліну має збільшений час напівжиття у крові *in vivo* та кон'югат аналога інсуліну-Fc-ділянки імуноглобуліну отриманий із застосуванням такого аналога також виявляє помітно збільшений час напівжиття у крові, тим самим збільшуючи зручність для пацієнтів при необхідності введення інсуліну.

Опис Фігур.

На Фіг.1 наведено результат аналізу чистоти аналогу інсуліну електрофорезом білка, який є результатом дослідження характерного аналога інсуліну, який отримав назву Аналог № 7 (Лінія 1 – маркер розміру; Лінія 2 - природний інсулін; Лінія 3 - аналог інсуліну (№ 7));

На Фіг.2 наведено результат аналізу чистоти аналогу інсуліну ВЕРХ-хроматографією, який є результатом дослідження характерного аналога інсуліну, який отримав назву Аналог № 7 ((А) ВЕРХ-хроматографія зі зворотною фазою, (В) ексклюзивна ВЕРХ-хроматографія);

На Фіг.3 наведено результат пептидного картування аналога інсуліну, який є результатом дослідження характерного аналога інсуліну, який отримав назву Аналог № 7 ((А) природний інсулін, (В) аналог інсуліну (№ 7));

На Фіг.4 наведено результат аналізу чистоти кон'югату аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну електрофорезом білка, який є дослідженням характерного аналога інсуліну, який отримав назву Аналог № 7 (Лінія 1 – маркер розміру; Лінія 2 - кон'югат аналога інсуліну (№ 7) та Fc-ділянки імуноглобуліну);

5 На Фіг.5 наведено результат аналізу чистоти кон'югату аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну ВЕРХ-хроматографією, який є дослідженням характерного аналога інсуліну, який отримав назву Аналог № 7 ((А) ВЕРХ-хроматографія зі зворотною фазою, (В) ексклюзійна ВЕРХ-хроматографія, (С) іонообмінна ВЕРХ-хроматографія);

10 На Фіг.6 наведено результат аналізу фармакокінетичних характеристик кон'югату природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югату аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну у звичайних щурів, який є дослідженням характерного аналога інсуліну, який отримав назву Аналог № 7 (○ - кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну (21,7 нмоль/кг), ● - кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну (65,1 нмоль/кг), □ - кон'югат аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну (21,7 нмоль/кг), ■ - кон'югат аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну (65,1 нмоль/кг). (А) - кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югат аналога інсуліну (№ 7) з Fc-ділянкою імуноглобуліну, (В) - кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югат аналога інсуліну (№ 8) з Fc-ділянкою імуноглобуліну, (С) - кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югат аналога інсуліну (№ 9) з Fc-ділянкою імуноглобуліну.

20 Винахід стосується аналога інсуліну, який має зменшений титр *in vitro*. Цей аналог інсуліну відрізняється тим, що він має штучну послідовність інсуліну, отже він має зменшену, порівняно до природного інсуліну, зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору та, відповідно, опосередковане рецептором виведення цієї сполуки з організму помітно зменшується збільшенням константи дисоціації, що призводить до появи подовження часу напівжиття у крові.

25 Як тут застосовано, термін "аналог інсуліну" охоплює різні аналоги, які мають зменшений, порівняно до природної форми, титр інсуліну.

Цей аналог інсуліну може бути аналогом інсуліну, що має зменшений, порівняно до природної форми, титр інсуліну, в якому змінено амінокислоту у складі В- ланцюга або А-ланцюга інсуліну. Амінокислотні послідовності природного інсуліну наведено нижче.

30 А-ланцюг:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID № 37)

В-ланцюг:

35 Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID № 38)

40 Хоча застосований у Прикладах винаходу аналог інсуліну отримано із застосуванням способу генетичної рекомбінації, заявлений винахід не обмежено лише цією сполукою, але й також стосується всіх інсулінів зі зменшеним титром *in vitro*. Переважно цей аналог інсуліну може охоплювати перевернуті інсуліни, варіанти чи фрагменти інсуліну тощо та спосіб отримання може полягати, але без обмеження, як у застосуванні генетичної рекомбінації, так і у застосуванні твердофазного способу.

Цей аналог інсуліну є пептидом, в якому збережено функцію контролювання глюкози у крові, яка є ідентичною до подібної функції інсуліну та цей пептид охоплює агоністи, похідні, фрагменти, варіанти інсуліну тощо.

45 Агоніст інсуліну за винаходом є речовиною, зв'язаною з інсуліновим рецептором *in vivo*, отже, незважаючи на структуру інсуліну він виявляє однакові з ним біологічні активні властивості.

Аналог інсуліну за винаходом є пептидом, який має принаймні 80 % гомологічність амінокислотної послідовності у порівнянні з А- або В-ланцюгом природного інсуліну, має певні групи амінокислотних залишків, змінених хімічним заміщенням (наприклад, альфа-метилуванням, альфа-гідроксилуванням), усуненням (наприклад, дезамінуванням) або модифікацією (наприклад, N-метилуванням) та має функцію контролювання глюкози у крові. Відносно предмету за винаходом, цей аналог інсуліну має (але без обмеження) зменшену, у порівнянні з природною формою, зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору та зменшений титр інсуліну.

50 Оскільки цей аналог інсуліну є здатним мати низький рівень опосередкованої рецептором інтерналізації або опосередкованого рецептором виведення, його тип та розмір особливо не є обмеженим. Для цілей за винаходом буде прийнятним такий аналог інсуліну, в якому головний механізм виведення *in vivo* є опосередкованою рецептором інтерналізацією або опосередкованим рецептором виведенням.

Фрагмент інсуліну за винаходом є ознакою типу інсуліну, в якому додано або видалено одну або декілька амінокислот та додані амінокислоти можуть бути штучними амінокислотами (наприклад амінокислотами D-типу). Такі інсулінові фрагменти зберігають функцію контролювання глюкози у крові.

5 Варіант інсуліну за винаходом є ознакою пептиду, якій відрізняється від інсуліну однією або кількома амінокислотними послідовностями та зберігає функцію контролювання глюкози у крові.

Відповідні способи отримання агоністів, похідних, фрагментів та варіантів інсуліну за винаходом можуть бути застосовані незалежно або у комбінації. Винахід, наприклад, стосується пептидів, в яких одна або декілька амінокислотних послідовностей відрізняються від

10 амінокислотних послідовностей інсуліну та які мають дезамінування N-кінцевого амінокислотного залишку та також здатні виконувати функцію контролювання глюкози у крові. Наприклад, аналог інсуліну може бути таким, в якому одну або декілька амінокислот вибрано з групи, вибрану з групи, яка охоплює амінокислоти B-ланцюга у 8, 23, 24 та 25

15 положеннях та амінокислоти A-ланцюга у 1, 2, 14 та 19 положеннях, заміщено іншою амінокислотою, та переважно в якому одну або більше амінокислот, вибраних з групи, яка складається з амінокислот B-ланцюга у 8, 23, 24 та 25 положеннях та амінокислот A-ланцюга у 1, 2 та 19 положеннях, заміщено аланіном, або в якому амінокислоту A-ланцюга у 14 положенні заміщено глютаміновою кислотою або аспарагіном. Окрім цього, аналог інсуліну може бути

20 вибрано з групи, яка охоплює послідовності SEQ ID №№ 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 та 36, але може також охоплювати без обмеження будь-який аналог інсуліну, який має зменшену зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору.

Відповідно до одного втілення за винаходом було відкрито, що аналоги інсуліну, як-то SEQ ID №№ 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 та 36 та, зокрема, характерні аналоги інсуліну №№ 7, 8 та 9 (SEQ ID №№ 32, 34 та 36) мають зменшену, порівняно з природною формою, зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору *in vitro* (Таблиця 4).

25 У іншому аспекті, винаходом передбачено кон'югат аналога інсуліну, отриманий зв'язуванням аналога інсуліну та носія.

Як тут застосовано, термін "носій" стосується речовини, здатної збільшувати час напівжиття прикріпленого аналога інсуліну *in vivo*. Аналог інсуліну за винаходом відрізняється тим, що він

30 має помітно зменшену, порівняно з природною формою, зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору та уникає опосередкованого рецептором виведення або виведення через нирки. Отже, якщо носій, який, як відомо, при прикріпленні до різних відомих фізіологічно активних поліпептидів збільшує час їх напівжиття *in vivo* з'єднано з аналогом інсуліну, то стає очевидним, що може бути збільшено час напівжиття цього аналога *in vivo* та отриманий кон'югат

35 може бути застосовано як композиції тривалої дії.

Наприклад, оскільки головним пріоритетом є подовження часу напівжиття, то цей носій, який треба з'єднати з новим інсуліном зі зменшеним титром не буде обмежуватися Fc-ділянкою імуноглобуліну. Цей носій містить біосумісний матеріал, здатний подовжувати час напівжиття *in vivo* зв'язуванням його з будь-яким біосумісним матеріалом, здатним зменшувати ниркове

40 виведення та є вибраним з групи, яка складається, але без обмеження, з різних полімерів (наприклад поліетиленгліколь та жирна кислота, альбумін та його фрагменти, окрема амінокислотна послідовність тощо), альбуміну та його фрагментів, альбумін-зв'язуючих матеріалів та полімерів повторюючихся одиниць окремої амінокислотної послідовності, антитіл, фрагментів антитіл, зв'язуючих матеріалів неонатального Fc-рецептору (надалі, FcRn-зв'язуючих матеріалів), сполучної тканини *in vivo* або її похідних, нуклеотиду, фибронектину, трансферину, сахариду та полімерів. Окрім цього, спосіб зв'язування біосумісного матеріалу, здатного збільшувати час напівжиття *in vivo* аналога інсуліну зі зменшеним титром полягає у застосуванні генетичної рекомбінації, кон'югації *in vitro* тощо. Приклади такого біосумісного матеріалу можуть охоплювати FcRn-зв'язуючий матеріал, жирну кислоту, поліетиленгліколь,

45 амінокислотний фрагмент або альбумін. Цей FcRn-зв'язуючий матеріал може бути Fc-ділянкою імуноглобуліну.

Аналог інсуліну та біосумісний матеріал як носія можуть бути з'єднані між собою лінкером, як-то пептидом або непептидильним полімером.

Кон'югат інсуліну може бути кон'югатом аналога інсуліну, отриманим зв'язуванням (i) аналога інсуліну та (ii) Fc-ділянки імуноглобуліну через (iii) пептидний лінкер або непептидильний лінкер, вибраний з групи, яка складається з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, сополімерів етиленгліколю-пропіленгліколю, поліоксиетиюваного поліолу, полівінілового спирту, полісахаридів, декстрану, полівінілового етилового етеру, биорозкладаного полімеру, ліпідних полімерів, хітинів, гіалуронової кислоти та їх комбінацій.

60 У одному особливому втіленні кон'югату аналога інсуліну за винаходом непептидильний

полімер приєднано до N-кінця В-ланцюга аналога інсуліну як лінкера. У іншому особливому втіленні кон'югату аналога інсуліну за винаходом непептидильний полімер приєднано до залишку В-ланцюга аналога інсуліну як лінкеру. Модифікація у А - ланцюзі інсуліну призводить до зменшення активності та безпечності. Отже, у цих втіленнях, непептидильний полімер

5 приєднано до В - ланцюга інсуліну як лінкера, що тим самим зберігає активність інсуліну та збільшує рівень його безпечності.

Як тут застосовано, термін "активність" означає здатність інсуліну зв'язуватися з інсуліновим рецептор та означає, що інсулін проявляє свою дію, зв'язуючись зі своїм рецептором. Таке зв'язування непептидильного полімеру до N-кінця В-ланцюга інсуліну за винаходом може бути

10 досягнуто контролюванням рН та бажаним діапазоном рН є 4,5-7,5.

Як тут застосовано, термін "N-кінець" може бути застосовано взаємозамінне з терміном "N-кінцева ділянка".

У одному особливому прикладі винахідники отримали кон'югат аналога інсуліну-ПЕГ- Fc - імуноглобуліну прикріпленням ПЕГ до N-кінця Fc-ділянки імуноглобуліну та вибіркового зв'язування з ним N-кінця В - ланцюга інсуліну. Сироватковий час напівжиття цього кон'югату аналога інсуліну-ПЕГ- Fc - імуноглобуліну у порівнянні з некон'югатом було збільшено та його застосування призвело до гіпоглікемічної дії у тваринних моделях захворювань. Таким чином, очевидно, що може бути отримано новий препарат інсуліну пролонгованої дії, здатний зберігати активність *in vivo*.

20 Fc-ділянка імуноглобуліну є безпечною для застосування як носія для лікарського засобу, оскільки вона являє собою біорозкладаний поліпептид, здатний до метаболічного перетворення *in vivo*. Також Fc-ділянка імуноглобуліну має, порівняно з повними імуноглобуліновими молекулами, відносно низьку молекулярну масу, отже вона має перевагу з точки зору отримання, очищення та виходу кон'югату. Fc-ділянка імуноглобуліну не містить Fab-фрагмент, який є дуже негомогенним через наявність різних амінокислотних послідовностей в залежності від підкласів антитіл, отже можна очікувати, що Fc-ділянка імуноглобуліну може

25 дуже збільшити гомогенність сполук та бути менш антигенною у крові.
Як тут застосовано, термін "Fc-ділянка імуноглобуліну" стосується білка, який містить важколанцюгову сталу ділянку 2 (CH2) та важколанцюгову сталу ділянку 3 (CH3) імуноглобуліну за виключенням змінних ділянок важкого та легкого ланцюгів, важколанцюгової сталої ділянки 1 (CH1) та легколанцюгової сталої ділянки 1 (CL1) імуноглобуліну. Також він може додатково містити шарнірну ділянку біля важколанцюгової сталої ділянки. Також Fc-ділянка імуноглобуліну за винаходом може містити частину або всі Fc – ділянки, в тому числі важколанцюгову сталу ділянку 1 (CH1) та / або легколанцюгову сталу ділянку 1 (CL1) за виключенням змінних ділянок

35 важкого та легкого ланцюгів імуноглобуліну, оскільки вона має по суті подібну до природної форми або більш кращу дію. Також вона може бути фрагментом, який має делецію відносно великої частини амінокислотної послідовності ділянки CH2 та / або CH3.
Отже Fc-ділянка імуноглобуліну винаходу може містити 1) домен CH1, домен CH2, домен CH3 та домен CH4, 2) домен CH1 та домен CH2, 3) домен CH1 та домен CH3, 4) домен CH2 та домен CH3 5) комбінацію одного або кількох доменів та шарнірну ділянку (або частину шарнірної ділянки) імуноглобуліну та 6) димер з будь-якого домену важколанцюгових сталих ділянок та легколанцюгової сталої ділянки.

Також Fc-ділянка імуноглобуліну винаходу містить похідну амінокислотної послідовності (мутантну послідовність), а також природну амінокислотну послідовність. Похідна амінокислотної послідовності містить послідовність, яка відрізняється від природної амінокислотної послідовності завдяки делеції, вставці, неконсервативному або консервативному заміщенню або комбінації таких змінень одного або кількох амінокислотних залишків. Наприклад, у Fc-ділянці IgG, як можливої мішені для модифікації можуть бути вибрані амінокислотні залишки у положеннях 214-238, 297-299, 318-322 або 327 – 331, які, як відомо, є

50 важливими у зв'язуванні.
Крім того, також можливо застосування інших різних похідних, в тому числі похідних, які мають делецію ділянки, здатної утворювати дисульфідний зв'язок, делецію деяких амінокислотних залишків біля N-кінця природної Fc-форми або додавання метіонінового залишку до N-кінця природної Fc-форми. Крім того, для усунення ефекторних функцій також може бути наявною делеція у ділянці зв'язування комплементу, як-то у ділянці зв'язування C1q та у ділянці ADCC (залежної від антитіл клітинно-опосередкованої цитотоксичності). Способи отримання таких похідних послідовностей Fc-ділянки імуноглобуліну наведено у WO 97/34631 та WO 96/32478.

Також у цій галузі відомі амінокислотні заміщення у складі білків та пептидів, які звичайно не впливають на активність молекул (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York,

1979). Найбільш часто з них трапляються заміщення типу Ala / Ser, Val / Ile, Asp / Glu, Thr / Ser, Ala / Gly, Ala / Thr, Ser / Asn, Ala / Val, Ser / Gly, Thy / Phe, Ala / Pro, Lys / Arg, Asp / Asn, Leu / Ile, Leu / Val, Ala / Glu, Asp / Gly, які здійснюються у обох напрямках.

5 При бажанні Fc-ділянку може бути модифіковано фосфорилуванням, сульфатуванням, акрилуванням, глікозилюванням, метилуванням, фарнезилюванням, ацетиуванням, амідуванням тощо.

Вищезгадані похідні Fc-ділянки є похідними, які мають біологічну активність, ідентичну з активністю Fc-ділянки сполуки за винаходом або покращену структурну стійкість проти нагрівання, pH тощо.

10 Крім того, ці Fc-ділянки можуть бути отриманими з природних форм, виділених з організму людини та інших тварин, в тому числі корів, кіз, свиней, мишей, кроликів, хом'яків, щурів та морських свинок або вони можуть бути рекомбінантами або їх похідними, отриманими з трансформованих тваринних клітин або мікроорганізмів. У цьому разі вони можуть бути отриманими з природного імуноглобуліну виділенням цілих імуноглобулінів з організму людини
15 або тварини та наступної обробки їх протеолітичним ферментом. Папаїн розщеплює природний імуноглобулін у Fab- та Fc- ділянках та обробка пепсином призводить до отримання фрагментів pF'c та F(ab)₂, які можна піддати ексклюзійній хроматографії для виділення Fc або pF'c.

Fc-ділянка людського походження переважним чином є рекомбінантною Fc-ділянкою імуноглобуліну, отриманою з мікроорганізму.

20 Крім того, Fc-ділянка імуноглобуліну може існувати у формі, яка має природні цукрові ланцюги, збільшені, порівняно до природної форми, цукрові ланцюги або може бути у деглікозильованій формі. Збільшення, зменшення або усунення цукрових ланцюгів Fc-ділянки імуноглобуліну може бути досягнуто із застосуванням загальноприйнятих у цій галузі способів, як-то хімічного, ферментативного та генно-інженерного способу із застосуванням
25 мікроорганізмів. У цьому разі усунення з Fc-ділянки цукрових ланцюгів призводить до різкого зниження зв'язувальної спорідненості до комплементу (C1q) та до зниження або до втрати залежної від антитіл клітинно-опосередкованої цитотоксичності або залежної від комплементу цитотоксичності, отже воно не викликає небажаних імунних відповідей in vivo. В зв'язку з цим, застосування Fc-ділянки імуноглобуліну у деглікозильованій або аглікозильованій формі може
30 бути більш прийнятним для носія лікарського засобу як предмета за винаходом.

Термін "дегліколізування", як тут застосовано, означає ферментативне усунення з Fc-ділянки цукрових функціональних груп та термін "аглікозилювання" означає, що Fc- ділянку отримано з прокаріотів, переважно E. Coli, у неглікозильованій формі.

35 З іншого боку, Fc-ділянку імуноглобуліну можна отримати від людини або інших тварин, в тому числі корів, кіз, свиней, мишей, кроликів, хом'яків, щурів та морських свинок та переважно від людини. Окрім цього, Fc-ділянка імуноглобуліну може бути Fc- ділянкою, отриманою з імуноглобулінів класу IgG, IgA, IgD, IgE та IgM або їх комбінацій або гібридів. Переважно її отримують з імуноглобулінів класу IgG або IgM, які є одними з найбільш розповсюджених білків у крові людини. Ще переважніше її отримують з імуноглобулінів класу IgG, які, як відомо,
40 підвищують час напівжиття білків, які зв'язують ліганди.

З іншого боку, термін "комбінація", як тут застосовано, означає, що поліпептиди, які кодують одноланцюгові Fc-ділянки імуноглобуліну однакового походження є з'єднаними з одноланцюговим поліпептидом іншого походження з отриманням димеру або мультимеру. Отже димер або мультимер може бути отримано із застосуванням двох або кількох фрагментів,
45 вибраних з групи, яка складається з Fc-фрагментів IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc та IgE Fc.

Термін "гібрид", як тут застосовано, означає, що у одноланцюговій Fc-ділянці імуноглобуліну присутні послідовності, які кодують дві або кілька Fc-ділянок імуноглобуліну різного походження та винаходом передбачено застосування різних типів гібридів. Отже доменні гібриди можуть складатися з 1-4 доменів, вибраних з групи, яка складається з ділянок CH1, CH2, CH3 та CH4
50 Fc-ділянок імуноглобулінів IgG, IgM, IgA, IgE та IgD та може також містити шарпір.

З іншого боку, клас імуноглобулінів IgG можна також розділити на підкласи IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4 та винахід також стосується комбінацій та гібридів цих підкласів, з яких більш бажаними є підкласи IgG2 та IgG4 та найбільш бажаною є Fc- ділянка IgG4, яка рідко має ефекторні функції, як-то CDC (залежної від комплементу цитотоксичності). Отже, як носія лікарського
55 засобу за винаходом, найбільш бажаною Fc-ділянкою імуноглобуліну є неглікозильована Fc-ділянка, яка походить від IgG4 людини. Fc-ділянка людського походження є більш бажаною, ніж Fc-ділянка іншого походження, яка може мати антигенну дію в організмі людини та викликати небажані імунні відповіді, як-то продукування нових антитіл проти антигену.

У особливому втіленні кон'югату аналога інсуліну, обидва кінці непептидильного полімеру
60 можуть бути з'єднані з N-кінцем Fc-ділянки імуноглобуліну та аміногрупою N- кінця В-ланцюга

аналога інсуліну або з ϵ -аміногрупою або, відповідно, з тіоловою групою внутрішнього лізінового залишку В - ланцюга.

Конструкцію за винаходом типу "Fc-ділянка-лінкер-аналог інсуліну" отримують з різними молярними співвідношеннями. Отже, кількість Fc - фрагмента та / або лінкеру, з'єднаного з
5 одиничним аналогом інсуліну є необмеженою.

Крім того, зв'язок Fc-ділянки, певного лінкеру та аналога інсуліну за винаходом може охоплювати всі типи ковалентних зв'язків та всі типи нековалентних зв'язків, як-то водневих зв'язків, іонних взаємодій, сил Ван-дер-Ваальса та гідрофобних взаємодій, із застосуванням яких Fc-ділянка та аналог інсуліну мають вигляд отриманого генетичною рекомбінацією злитого (гібридного) білка. Однак, беручи за увагу фізіологічну активність аналога інсуліну, цей зв'язок
10 здебільшого є отриманим з допомогою ковалентних зв'язків, але не обмежуючись ними.

З іншого боку, Fc-ділянка за винаходом, специфічний лінкер та аналог інсуліну можуть бути з'єднаними між собою на N- або C-кінцях та переважно у вільній групі та головним чином, ковалентний зв'язок може утворюватися на N-кінці, на амінокислотному залишку лізіну, амінокислотному залишку гістидину або на вільному цистеїновому залишку.
15

Крім того, зв'язок Fc-ділянки за винаходом, специфічного лінкеру та аналога інсуліну може бути отримано в певному напрямку. Отже, лінкер може бути приєднано до N-кінця, C-кінця або до вільної групи Fc-ділянки імуноглобуліну та також його можна приєднати до N-кінця, C-кінця або до вільної групи аналога інсуліну.

Непептидильний лінкер може бути приєднано до фрагменту N-кінцевої аміногрупи імуноглобуліну та цей зв'язок не є обмеженим будь-якими лізіновими або цистеїновими залишками послідовності фрагменту імуноглобуліну.
20

Крім того, у особливому втіленні кон'югату аналога інсуліну, кінець непептидильного полімеру може бути з'єднано зі внутрішнім амінокислотним залишком або з вільною хімічно активною групою, здатними зв'язуватися, але без обмеження, окрім зв'язування з N-кінцем Fc-ділянки імуноглобуліну, також з хімічно активною групою на кінці непептидильного полімеру.
25

Значення непептидильного полімеру за винаходом означає біосумісний полімер, який містить два або декілька повторюючихся елементів, з'єднаних між собою будь-яким ковалентним зв'язком за виключенням пептидного зв'язку. Такий непептидильний полімер може
30 мати два або три кінці.

Непептидильний полімер, який може бути застосовано у винаході може бути вибрано з групи, яка складається з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, сополімерів етиленгліколю та пропіленгліколю, поліоксиетилованих поліолів, полівінілового спирту, полісахаридів, декстрану, полівінілового етеру, полімерів, що розкладаються мікроорганізмами, як-то PLA (полімолочна кислота)) та PLGA (полімолочна-гліколева кислота), ліпідних полімерів, хітинів, гіалуронової кислоти та їх комбінацій та переважно з поліетиленгліколю. Також до предмету за винаходом включено похідні цих сполук, які є добре відомими у цій галузі та можуть бути легко отримані фахівцями.
35

Пептидний лінкер, який застосовують для отримання злитих білків із застосуванням загальноприйнятого способу злиття зі збереженням рамки зчитування має певні недоліки через те, що він легко розщеплюється протеолітичним ферментом *in vivo*, отже з допомогою носія, в якому застосовано такий лінкер стає неможливим досягнути очікуваного суттєвого ефекту подовження часу напівжиття активного лікарського засобу у крові. Для отримання непептидильного лінкеру може бути застосовано полімер, який має стійкість до протеолітичного ферменту для підтримки часу напівжиття цього пептиду у крові, подібного до часу напівжиття носія. Отже, може бути застосовано без обмеження будь-який непептидильний полімер, оскільки він є полімером, якому притаманна вищезазначена функція, тобто він є полімером, який має стійкість до дії протеолітичного ферменту *in vivo*. Цей непептидильний полімер має молекулярну масу у межах 1-100 кДа та переважно у межах 1-20 кДа.
40 45

Непептидильний полімер винаходу, з'єднаний з Fc-ділянкою імуноглобуліну може бути одним полімером або комбінацією різних типів полімерів.
50

Непептидильний полімер винаходу також має реактивну групу, здатну зв'язуватися з Fc-ділянкою імуноглобуліну та білковим лікарським засобом.

Цей непептидильний полімер на обох кінцях має реактивну групу, яка є переважно вибраною з групи, яка складається з хімічно активної альдегідної групи, пропіональдегідної групи, бутиральдегідної групи, малеїмідної групи та сукцинімідної похідної. Сукцинімідна похідна може бути сукцинімідил-пропіонатом, гідрокисукцинімідиллом, сукцинімідил-карбоксиметиллом або сукцинімідил-карбонатом. Зокрема, якщо непептидильний полімер має на обох кінцях реактивну альдегідну групу, то обидва його кінця ефективно зв'язують фізіологічно активний поліпептид та імуноглобулін з мінімальними неспецифічними реакціями. Отриманий
55 60

відновлювальним алкілюванням по альдегідному зв'язку кінцевий продукт є набагато стійкішим, ніж продукт, з'єднаний з допомогою амідного зв'язку. Альдегідна хімічно активна група вибірково зв'язується з N-кінцем в умовах низького рН та зв'язується з лізиновим залишком з отриманням ковалентного зв'язку в умовах високого рН, як-то рН 9,0.

Хімічно активні групи на обох кінцях непептидильного полімеру можуть бути однаковими або відрізнятися. Наприклад, непептидильний полімер може мати малеїмідну групу на одному кінці та альдегідну групу, пропіональдегідну групу або бутиральдегідну групу на іншому кінці. При застосуванні як непептидильного полімеру поліетиленгліколю з хімічно активною гідроксигрупою на обох кінцях, ця гідроксигрупа може бути активована різними хімічно активними групами із застосуванням відомих хімічних реакцій або для отримання одностороннього кон'югату аналога інсуліну за винаходом може бути застосовано поліетиленгліколь, який має у своєму складі наявну у продажу модифіковану реактивну групу.

Кон'югат аналога інсуліну за винаходом зберігає активні властивості загальноприйнятого інсуліну *in vivo*, як-то енергетичний та цукровий метаболізм, а також збільшує час напівжиття аналога інсуліну у крові та помітно збільшує тривалість ефективності пептиду *in vivo*, отже, він є корисним у лікуванні діабету.

У одному прикладі винаходу було підтверджено, що при приєднанні до носія, здатного збільшувати час напівжиття *in vivo*, аналог інсуліну, який має зменшену зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору виявляє більш тривалий, ніж у природного кон'югату інсуліну час напівжиття *in vivo* (Фіг. 6).

У іншому аспекті, винаходом передбачено композицію інсуліну тривалої дії, яка містить кон'югат аналога інсуліну. Ця композиція інсуліну тривалої дії може бути композицією зі збільшеною тривалістю дії та стійкістю *in vivo*. Композиція тривалої дії може бути фармацевтичною композицією для лікування діабету.

Фармацевтична композиція, яка містить кон'югат за винаходом може містити фармацевтично прийнятні носії. Фармацевтично прийнятний носій, призначений для перорального введення може містити зв'язуючий агент, мастило, розпушувач, наповнювач, солюбілізатор, диспергуючий агент, стабілізатор, суспензуючий агент, барвник, ароматизатор тощо. Фармацевтично прийнятний носій, призначений для введення ін'єкцією може містити буферизуючий агент, консервант, анальгетик, солюбілізатор, ізотонічний агент та стабілізатор. Фармацевтично прийнятний носій, призначений для місцевого введення може містити основу, наповнювач, мастило, консервант тощо. Фармацевтична композиція за винаходом може бути отриманою у численних лікарських формах у комбінації з вищезгаданими фармацевтично прийнятними носіями. Наприклад, для перорального введення, фармацевтичну композицію може бути отримано у вигляді таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів або пластин. Для введення ін'єкцією, фармацевтичну композицію може бути отримано у вигляді ампул з одиничною дозою або мультиміксованого контейнера. Фармацевтичну композицію також може бути отримано у вигляді розчинів, суспензій, таблеток, пігулок, капсул та препаратів з уповільненим вивільненням.

З іншого боку, приклади прийнятних для композиції носіїв, наповнювачів та розчинників охоплюють лактозу, декстрозу, цукрозу, сорбіт, маніт, ксиліт, еритрит, мальтит, крохмаль, камедь, альгінат, желатин, фосфат кальцію, силікат кальцію, целюлозу, метилцелюлозу, мікрокристалічну целюлозу, полівінілпіролідон, воду, метилгідроксибензоат, пропілгідроксибензоат, тальк, стеарат магнію, мінеральні оливи тощо. Крім того, ці фармацевтичні композиції також можуть містити наповнювачі, антикоагулянти, мастила, зволожувачі, ароматизатори, антисептики тощо.

У іншому аспекті, винаходом передбачено спосіб лікування хвороб, пов'язаних з інсуліном, який полягає у введенні аналога інсуліну або кон'югату аналога інсуліну пацієнту, який того потребує.

Кон'югат винаходу є корисним у лікуванні діабету, отже цю хворобу можна буде лікувати введенням фармацевтичної композиції, в тому числі зазначеної вище.

Термін "введення", як тут застосовано, означає введення попередньо визначеної сполуки пацієнту з допомогою певного прийнятного способу. Кон'югат винаходу може бути введено будь-яким загальноприйнятним шляхом, оскільки він є здатним досягати бажаної тканини, включаючи, але без обмеження, внутрішньочеревне, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, підшкірне, внутрішньошкірне, пероральне, місцеве, інтраназальне, ректальне та внутрішньолегеневе введення. Однак, оскільки пептиди засвоюються при пероральному введенні, активні інгредієнти композиції для перорального введення повинні бути покриті або бути отримані у вигляді, прийнятному для захисту від деградації в шлунку. Переважно композицію за винаходом може бути введено у формі, прийнятній для застосування ін'єкцією.

Окрім цього, цю фармацевтичну композицію може бути введено із застосуванням певного обладнання, здатного до транспортування активних інгредієнтів до клітини-мішені.

Крім того, фармацевтична композиція за винаходом може бути визначеною кількома супутніми чинниками, як-то типи захворювань, які підлягають лікуванню, шляхи введення, вік, стать та маса тіла пацієнта, тяжкість хвороби, а також тип лікарського засобу як активного компонента. Оскільки фармацевтична композиція цього винаходу має чудову тривалість *in vivo* та титр, вона має перевагу у вигляді значного зниження частоти введення фармацевтичної композиції винаходу.

У ще одному аспекті, винаходом передбачено спосіб отримання кон'югату аналога інсуліну, який полягає у отриманні аналога інсуліну; отриманні носія та зв'язуванні аналога інсуліну та носія.

У іншому аспекті, винаходом передбачено спосіб подовження часу напівжиття *in vivo* із застосуванням аналога інсуліну або кон'югату аналога інсуліну, отриманого зв'язуванням аналога інсуліну та носія.

Здійснення винаходу.

Далі даний винахід буде описано більш докладно з посиланням на приклади. Однак ці приклади наведені тільки в ілюстративних цілях, та винахід не призначено бути обмеженим цими прикладами.

Приклад 1: Отримання вектора експресії одноланцюгового аналога інсуліну.

Для отримання аналогів інсуліну було синтезовано кожен з цих аналогів, які мали у складі модифіковану амінокислоту у А - або В – ланцюзі. Для цього було застосовано вектор експресії природного інсуліну як матриці, прямі та зворотні олігонуклеотиди (Таблиця 2) та потім для ампліфікації гена кожного аналога було здійснено реакцію ПЛР.

У наступній Таблиці 1 наведені амінокислотні послідовності, змінені у А - або В -ланцюзі та назви аналогів. Отже, Аналог 1 є випадком, коли перший гліцин А - ланцюга заміщено аланіном та Аналог 4 є випадком, коли восьмий гліцин В – ланцюга заміщено аланіном.

Таблиця 1.

Аналог	Змінена послідовність
Аналог 1	A ¹ G → A
Аналог 2	A ² I → A
Аналог 3	A ¹⁹ Y → A
Аналог 4	B ⁸ G → A
Аналог 5	B ²³ G → A
Аналог 6	B ²⁴ F → A
Аналог 7	B ²⁵ F → A
Аналог 8	A ¹⁴ Y → E
Аналог 9	A ¹⁴ Y → N

Праймери для ампліфікації аналога інсуліну наведені у наступній Таблиці 2.

Таблиця 2

Аналоги	Послідовність	SEQ ID №
Аналог 1	5' GGGTCCCTGCAGAAGCGTGCGATTGTGGAACAATGCTGT 3' 5' ACAGCATTGTTCCACAATCGCACGCTTTCGACGGGACCC 3'	SEQ ID №.1 SEQ ID №.2
Аналог 2	5' TCCCTGCAGAAGCGTGCGCGGTGGAACAATGCTGTACC 3' 5' GGTACAGCATTGTTCCACCGCGCCACGCTTCTGCAGGGA 3'	SEQ ID №.3 SEQ ID №.4
Аналог 3	5' CTCTACCAGCTGGAAAACGCGTGTAAGTGAAGGATCC 3' 5' GGATCCTCAGTTACACGCGTTTTCCAGCTGGTAGAG 3'	SEQ ID №.5 SEQ ID №.6
Аналог Д	5' GTTAACCAACACTTGTGTGCGTCACACCTGGTGGAAGCT 3' 5'AGCTTCCACCAGGTGTGACGCACACAAGTGTGGTTAAC 3'	SEQ ID №.7 SEQ ID №.8
Аналог 5	5 C1AGTG iCGGGGAACGAGCGTTCTFCTAuACACICAAG 3 5' CTTGGGTGTGTAGAAGAACGCTCGTTCGCCGCACTAG 3'	SEQ ID №.9 SEQ ID №.10
Аналог 6	5' GTGTGCGGGGAACGAGGCGGTTCTACACACCCAAGACC 3' 5' GGTCTTGGGTGTGTAGAACGCGCCTCGTTCGCCGCACTAG 3'	SEQ ID №.11 SEQ ID №.12
Аналог 7	5' TGCGGGGAACGAGGCTTCGCGTACACACCCAAGACCCGC 3' GCGGGTCTTGGGTGTGTACGCGAAGCCTCGTTCGCCGCA 3'	SEQ ID №.13 SEQ ID №.14
Аналог 8	5'-CCAGCATCTGCTCCCTCGAACAGCTGGAGAACTACTG-3' 5'-CAGTAGTTCTCCAGCTGTTCCGAGGGAGCAGATGCTGG-3'	SEQ ID №.15 SEQ ID №.16
Аналог 9	5'-CAGCATCTGCTCCCTCAACCAGCTGGAGAACTAC-3' 5'-GTAGTTCTCCAGCTGGTTGAGGGAGCAGATGCTG-3'	SEQ ID №.17 SEQ ID №.18

Реакцію ПЛР для ампліфікації аналога інсуліну проводили у вигляді 18 циклів (30 сек. при 95 °C, 30 сек. при 55 °C та 6 хв. при 68 °C). Фрагменти аналога інсуліну, отримані в цих умовах,

вставили у вектор рЕТ22b для наступної експресії у вигляді внутрішньоклітинних тільцевих включень, та отримані вектори експресії було позначено, як рЕТ22b-аналоги інсуліну 1-9. Таким чином були отримані вектори експресії, які містили нуклеїнові кислоти, що кодують амінокислотні послідовності аналогів інсуліну 1-9 під контролем промотора Т7, та отримано експресію білків аналога інсуліну у вигляді внутрішньоклітинних тільцевих включень у клітинах-хазяях.

Послідовності ДНК та білкові послідовності аналогів інсуліну 1-9 наведено у наступній Таблиці 3.

Таблиця 3

Аналог	Послідовність		SEQ ID №.
Аналог 1	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTC CAG AAG CGT GCG ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	19
	Білок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Ala Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	20
Аналог 2	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC GCG GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	21
	Білок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ala Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	22
Аналог 3	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC GCG TGC AAC	23
	Білок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Glu Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Ala Cys Asn	24
Аналог 4	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GCG TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	25
	Білок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Ala Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	26
Аналог 5	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GCG TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	27
	Білок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Ala Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Gln Asn Tyr Cys Asn	28

Аналог	Послідовність		SEQ ID №.
Аналог 6	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC GCG TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC. ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	29
	Білок	Phe Val Asrt Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Ala Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	30
Аналог 7	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC GCG TAC ACA CCC AAG ACC CGC CCG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	31
	Білок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Gln Arg Gly Phe Ala Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Aid Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	32
Аналог 8	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAA CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	33
	Білок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	34
Аналог 9	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC AAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	35
	Білок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Aia Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asn Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	36

Приклад 2: Експресія рекомбінантного злитого пептиду аналога інсуліну.

- Експресія рекомбінантних аналогів інсуліну відбувалася під контролем промотора T7.
- 5 Бактерії E.coli BL21-DE3 (E. coli B F-dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal λDE3); (Novagen) трансформували кожним з векторів експресії рекомбінантних аналогів інсуліну. Трансформацію здійснювали згідно з рекомендованим протоколом (Novagen). Одиничні колонії, трансформовані кожним з рекомбінантних векторів експресії зібрали та інокулювали у 2X середовищі LB, яке містило ампіцилін (50 мкг/мл) з наступним 15-ти годинним культивуванням при 37 °C. Потім
 - 10 культуральне середовище з рекомбінантним штамом змішали з 2X середовищем LB, яке містило 30 % гліцерин у об'ємному відношенні 1:1 (v/v). Кожен 1 мл суміші, яку потім було застосовано як клітинного запасу для отримання рекомбінантного злитого білка помістили у кріопробірку та зберігали при -140 °C.

- 15 Для отримання експресії рекомбінантних аналогів інсуліну по одній пробірці з кожного клітинного запасу піддали відтаванню та інокулювали у 500 мл 2X середовища LB та культивували зі струшуванням при 37 °C протягом 14~16 год. до досягнення оптичної густини (OD600) у 5,0 або вище. Отримане культуральне середовище було застосовано, як культуральне середовище для посіву, яким було інокульовано 50 л ферментер. (MSJ-U2, B.E.MARUBISHI, Japan), що містив 17 л середовища для ферментації та ферментацію головної

партії було розпочато. Умови культивування (температура 37 °С, швидкість потоку повітря 20 л./хв. (1 у об'ємному відношенні у хв.), швидкість струшування 500 об/хв. та рН 6,70) підтримували із застосуванням 30 % розчину аміаку. Ферментацію здійснювали періодичним культивуванням з підживлюванням додаванням живильного розчину при зменшенні поживних речовин у культуральному середовищі. Ріст штаму було піддано моніторингу вимірюванням значення оптичної густини. Коли значення оптичної густини перевищило 100, у середовище додали ІПТГ до кінцевої концентрації 500 мкмоль та культивування тривало після введення ще приблизно 23~25 год. Після закінчення культивування, рекомбінантні штами зібрали центрифугуванням та зберігали до застосування при -80 °С.

Приклад 3: Відновлення та рефолдинг рекомбінантного аналога інсуліну.

Для перетворення рекомбінантного аналога інсуліну, експресію якого було досягнуто у Прикладі 2 на розчинні форми, клітини були піддані руйнуванню з наступним рефолдингом. 100 г. (вологої маси) клітинного осаду ресуспендували у 1 л. лізуючого буферу (50 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,2 M NaCl та 0,5 % Triton X-100). Клітини піддали руйнуванню із застосуванням обладнання для отримання наночастинок M-110EH Microfluidizer® Processor (AC Technology Corp. Model M1475C) з робочим тиском 103,4 МПа (15000 фунтів на квадратний дюйм). Зруйнований таким чином клітинний лізат центрифугували протягом 20 хв при 7,000 об/хв. та 4 °С, супернатант вилучили та осад ресуспендували у 3 л. промивочного буферу (0,5 % Triton X-100 та 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA). Після 20-хвилинного центрифугування при 7,000 об/хв. та 4 °С, клітинний осад ресуспендували у дистильованій воді з наступним центрифугуванням у подібних умовах. Отриманий осад ресуспендували у 400 мл буферу (1 M гліцин, 3,78 г. цистеїну-HCl, pH 10,6) та перемішували при кімнатній температурі протягом години. Для відновлення рекомбінантний аналог інсуліну потім ресуспендували, додали 400 мл 8M сечовини та суміш перемішували при 40 °С протягом години. Для рефолдингу солюбілізованих рекомбінантних аналогів інсуліну їх піддали 30 - хвилинному центрифугуванню при 7000 об/хв. з температурою 4 °С з отриманням супернатанту, до якого з допомогою перистальтичної помпи зі швидкістю потоку у 1000 мл / год. з 16-годинним перемішуванням при 4 °С додали 2 л дистильованої води.

Приклад 4: Хроматографічна очистка катіонним зв'язуванням.

Підданий рефолдингу зразок завантажили на колонку Source S (GE healthcare), врівноважену 20 mM буфером цитрату натрію (pH 2,0), який містив 45 % етанолу та потім білки аналога інсуліну елюювали у 10 об'ємах колонки з лінійним градієнтом 0 % - 100 % 20 mM буфера цитрату натрію (pH 2,0), який містив 0,5 M хлориду калію та 45 % етанол.

Приклад 5: Обробка трипсином та карбоксипептидазою В.

Для усунення солей з елюйованих зразків було застосовано із застосуванням колонки для знесолювання та існуючий буфер замінили новим (10 mM Tris-HCl, pH 8,0). Потім у відповідності до отриманого зразка білка, до нього додали трипсин відповідно до 1000-разового молярного співвідношення та карбоксипептидазу В відповідно до 2000-разового співвідношення та реакційну суміш перемішували при 16 °С протягом 16 год. Для зупинення реакції, для зниження рН до 3,5 до суміші було додано 1 M цитрат натрію (pH 2,0).

Приклад 6: Хроматографічна очистка катіонним зв'язуванням.

Отриманий реакцією зразок завантажили на колонку Source S (GE healthcare), врівноважену 20 mM буфером цитрату натрію (pH 2,0), який містив 45 % етанолу та потім білки аналога інсуліну елюювали у 10 об'ємах колонки з лінійним градієнтом 0 % - 100 % 20 mM буфера цитрату натрію (pH 2,0), який містив 0,5 M хлориду калію та 45 % етанол.

Приклад 7: Хроматографічна очистка аніонним зв'язуванням.

Для усунення солей з елюйованих зразків було застосовано із застосуванням колонки для знесолювання та існуючий буфер замінили новим (10 mM Tris-HCl, pH 7,5). Для виділення чистого аналога аналогу інсуліну з отриманого у Прикладі 6 зразка, цей зразок завантажили на аніонообмінну колонку (Source Q: GE healthcare), врівноважену 10 mM буфером Tris (pH 7,5) та білок аналога інсуліну елюювали у 10 об'ємах колонки з лінійним градієнтом 0 % - 100 % 10 mM буфером Tris (pH 7,5), який містив 0,5 M хлориду натрію.

Аналіз чистоти отриманого таким чином аналога інсуліну було здійснено з допомогою білкового електрофорезу (електрофорез в поліакриламидному гелі в присутності додецилсульфату натрію, Фіг. 1) та ВЕРХ-хроматографії (Фіг. 2) та модифікації амінокислот були визначені пептидним картуванням (Фіг. 3) та аналізу молекулярної маси кожного піку.

В результаті було виявлено наявність бажаної модифікації амінокислотної послідовності кожного аналога інсуліну.

Приклад 8: Отримання кон'югату аналога інсуліну (№ 7) з Fc-ділянкою імуноглобуліну.

Для ПЕГілування N-кінця бета-ланцюга аналога інсуліну із застосуванням 3,4K ALD2 ПЕГ

(NOF, Japan) було здійснено реакцію між аналогом інсуліну (5 мг/мл) та ПЕГ з молярним співвідношенням 1:4, яка тривала приблизно 2 год. з температурою 4 °С. На цьому етапі реакцію здійснювали у 50 мМ хлориді натрію, рН 6,0 з 45 % ізопропанолом. Як відновника до суміші додали 3,0 мМ ціаноборгідрид натрію та реакція тривала далі. Потім реакційний розчин

очистили на колонці SP-HP (GE Healthcare, USA) із застосуванням буферу, який містив цитрат натрію (рН 3,0) та 45 % етанол та градієнту концентрації KCl.

Для отримання кон'югату аналога інсуліну з Fc-фрагментом імуноглобуліну було здійснено реакцію між очищеним моно-ПЕГілованим аналогом інсуліну та Fc-фрагментом імуноглобуліну з молярним співвідношенням 1:1-1:2, яка тривала 13 год. з температурою 25 °С та з загальною

концентрацією білка приблизно у 20 мг/мл. На цьому етапі реакційний буфер містив 100 мМ HEPES, рН 8,2 та як відновника до суміші додали 20 мМ ціаноборгідрид натрію. Таким чином було здійснено зв'язування ПЕГ з N-кінцем Fc-фрагменту.

Після закінчення реакції, реакційний розчин завантажили на колонку Q HP (GE Healthcare, USA) з буфером Tris-HCl (рН 7,5) та градієнтом концентрації NaCl для відокремлення та

очищення Fc-фрагменту імуноглобуліну та моно-ПЕГілованого аналога інсуліну, які не приймали участі у реакції.

Після цього, для відокремлення позосталого Fc-фрагменту імуноглобуліну та кон'югату дослідники застосували допоміжну колонку Source 15 ISO (GE Healthcare, USA), в якій відбувалося з'єднання двох або кількох аналогів інсуліну з Fc-фрагментом імуноглобуліну з отриманням таким чином кон'югату аналога інсуліну з Fc-фрагментом імуноглобуліну. На цьому етапі було здійснено елюювання із застосуванням градієнту концентрації сульфату амонію, який містив Tris-HCl (рН 7,5). Отриманий в результаті такого елюювання кон'югат аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну було піддано аналізу із застосуванням білкового електрофорезу (електрофорез в поліакриламидному гелі в присутності додецилсульфату натрію, Фіг. 4) та ВЕРХ-хроматографії (Фіг. 5). Було визначено, що отриманий кон'югат мав майже 99 % чистоту.

Приклад 9: Порівняння зв'язувальної спорідненості до інсулінового рецептора між природним інсуліном, аналогом інсуліну, кон'югатом природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югатом аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну.

Для вимірювання та аналізу зв'язувальної спорідненості кон'югату аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну до інсулінового рецептору було застосовано систему для поверхневого плазмонного резонансу (SPR, BIACORE 3000, GE healthcare). Інсулінові рецептори імобілізували на чіпі CM5 аміним зв'язуванням з наступним незалежним застосуванням до них природного інсуліну, аналога інсуліну, кон'югату природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югату аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну, які було розведено у 5 або більше разів та перевіркою зв'язувальної спорідненості кожної досліджуваної сполуки до інсулінового рецептору, яку обчислено із застосуванням програмного забезпечення BIAevaluation software. На цьому етапі було застосовано 1:1 модель зв'язування Лангмюра зі зміщенням нульової лінії.

В результаті, у порівнянні з інсуліном людини, аналог інсуліну (№ 6) виявив 14,8 % зв'язувальної спорідненості до рецептору, аналог інсуліну (№ 7) виявив 9,9 % зв'язувальної спорідненості до рецептору, аналог інсуліну (№ 8) виявив 57,1 % зв'язувальної спорідненості до рецептору, аналог інсуліну (№ 9) виявив 78,8 % зв'язувальної спорідненості до рецептору, кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну мав 3,7-5,9 % зв'язувальної спорідненості до рецептору в залежності від ходу експерименту, кон'югат аналога інсуліну (№ 6) з Fc –ділянкою імуноглобуліну мав 0,9 % або менше зв'язувальної спорідненості до рецептору, кон'югат аналога інсуліну (№ 7) з Fc-ділянкою імуноглобуліну мав 1,9 % зв'язувальної спорідненості до рецептору, кон'югат аналога інсуліну (№ 8) з Fc-ділянкою імуноглобуліну виявив 1,8 % зв'язувальної спорідненості до рецептору та кон'югат аналога інсуліну (№ 9) з Fc-ділянкою імуноглобуліну мав 3,3 % зв'язувальної спорідненості до рецептору (Таблиця 4). Таким чином було виявлено, що аналоги інсуліну за винаходом мали зменшену, у порівнянні з природним інсуліном, зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору та кон'югат аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну також мав помітно зменшену зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору.

Таблиця 4

Порівняння зв'язувальної спорідненості до інсулінового рецептора.

Тест №	Назва речовини	K_a (1/мс, $\times 10^{5?}$)	K_c (1/с, $\times 10^{-3}$)	K_c (нМ)
Тест 1	Природний інсулін людини	2,21 (100 %)	7,47 (100 %)	35,05 (100 %)
	Аналог інсуліну (№ 6)	0,28 (12,6 %)	6,60 (88,4 %)	237,0 (14,8 %)
Тест 2	Природний інсулін людини	2,29 (100 %)	10,1 (100 %)	46,1 (100 %)
	Кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну	0,09 (3,9 %)	7,8 (77,2 %)	781,3 (5,9 %)
	кон'югат аналога інсуліну (№ 6) з Fc-ділянкою імуноглобуліну	0,02 (0,9 %)	10,1 (100 %)	5260,0 (0,9 %)
Тест 3	Природний інсулін людини	1,76 (100 %)	10,73 (100 %)	63,47 (100 %)
	Аналог інсуліну (№7)	0,14 (7,8 %)	8,34 (77,7 %)	642,0 (9,9 %)
	Кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну	0,05 (2,7 %)	5,85 (54,5 %)	1236,67 (5,1 %)
	кон'югат аналога інсуліну (№ 7) з Fc-ділянкою імуноглобуліну	0,02 (1,3 %)	7,20 (67,1 %)	3270,0 (1,9 %)
Тест 4	Природний інсулін людини	2,9 (100 %)	12,4 (100 %)	42,0 (100 %)
	Аналог інсуліну (№ 8)	1,78 (60 %)	12,9 (104,6 %)	73,4 (57,1 %)
	Кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну	0,06 (2,1 %)	6,9 (56,1 %)	1140,0 (3,7 %)
	кон'югат аналога інсуліну (№ 8) з Fc-ділянкою імуноглобуліну	0,03 (0,9 %)	6,4 (51,6 %)	2320,0 (1,8 %)
Тест 5	Природний інсулін людини	2,0 (100 %)	9,7 (100 %)	50,4 (100 %)
	Аналог інсуліну (№ 9)	1,85 (92,5 %)	11,9 (122,5 %)	64,0 (78,8 %)
	Кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну	0,09 (4,3 %)	7,4 (76,5 %)	862,0 (5,9 %)
	кон'югат аналога інсуліну (№ 9) з Fc-ділянкою імуноглобуліну	0,05 (2,4 %)	7,3 (75,0 %)	1536,7 (3,3 %)

K_a – константа швидкості асоціації, K_c – спорідненість імобілізованого ліганду.

Приклад 10: Порівняння ефективності in vitro кон'югату природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югату аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну.

- 5 Для оцінки ефективності in vitro кон'югату аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну, для перевірки поглинання глюкози або синтезу ліпідів було застосовано диференційовані адипоцити 3T3-L1 мишачого походження. Клітини 3T3-L1 спочатку підтримували у середовищі DMEM (середовище Ігла, модифіковане по способу Дульбекко, Gibco, Cat.No, 12430), збагаченому 10 % NBCS (сироваткою з новонароджених телят) з пасивуванням двічі або тричі на тиждень.
- 10 Клітини 3T3-L1 суспендували у середовищі для диференціації (середовище DMEM, збагачене 10 % FBS) та потім нанесли їх на 48-луночний планшет зі щільністю у 5×10^4 клітин на лунку з наступним 48 – годинним культивуванням. Для диференціації адипоцитів, середовище для диференціації змішали з 1 мкг / мл інсуліну людини (Sigma, Cat. № I9278), 0,5 мМ IBMX (3-ізобутил-1-метилксантин, Sigma, Cat. № I5879) та 1 мкмоль дексаметазону (Sigma, Cat. № D4902) та по 250 мкл отриманої суміші додали до кожної лунки після усунення попереднього середовища. Через 48 год. це середовище замінили на середовище для диференціації, доповненим лише інсуліном людини (1 мкг/мл). Перевірку індукування диференціювання адипоцитів здійснювали на 7-9 день після інкубування клітин, з заміною кожні 48 год. існуючого середовища середовищем для диференціації, доповненим інсуліном людини (1 мкг/мл). Для
- 20 перевірки зворотнього поглинання глюкози, диференційовані клітини один раз промили безсироватковим середовищем DMEM та потім впродовж 4 год. додали ще 250 мкл для започаткування спустошення сироватки. Для здійснення 10-разових серійних розведень було застосовано безсироваткове середовище DMEM з концентрацією 2-0,01 мкмоль для інсуліну

людини та 20-0,02 мкмоль для кон'югатів природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну. По 250 мкл кожного з отриманих таким чином зразків додали до клітин та культивували у інкубаторі з 5 % CO₂ протягом 24 год. при 37 °C. Для вимірювання залишкової кількості глюкози у середовищі після інкубування було вилучено 200 мкл цього середовища, яке потім розвели у 5 разів буфером D-PBS та піддали аналізу з застосуванням набору GOPOD (GOPOD Assay Kit, Megazyme, Cat. № K-GLUC). Перетворення концентрації позostalої у середовищі глюкози було здійснено на основі результатів поглинання стандартного розчину глюкози з обчисленням, відповідно, значень EC₅₀ для поглинання глюкози кон'югату природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югатів аналога інсуліну з Fc-ділянкою.

В результаті, порівняно до інсуліну людини, кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну мав 11,6 % поглинання глюкози, кон'югат аналога інсуліну (№ 6) з Fc-ділянкою імуноглобуліну мав 0,43 % поглинання глюкози, кон'югат аналога інсуліну (№ 7) з Fc-ділянкою імуноглобуліну мав 1,84 % поглинання глюкози, кон'югат аналога інсуліну (№ 8) з Fc-ділянкою імуноглобуліну мав 16,0 % поглинання глюкози та кон'югат аналога інсуліну (№ 9) з Fc-ділянкою імуноглобуліну мав 15,1 % поглинання глюкози (Таблиця 5). Таким чином було виявлено, що кон'югат аналога інсуліну (№ 6) з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югат аналога інсуліну (№ 7) з Fc-ділянкою імуноглобуліну за винаходом мав помітно зменшений титр *in vitro* у порівнянні з кон'югатом природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну. Також було виявлено, що кон'югат аналога інсуліну (№ 8) з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югат аналога інсуліну (№ 9) з Fc-ділянкою імуноглобуліну мали титр *in vitro*, подібний до титру *in vitro* кон'югату природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну.

Таблиця 5

Тест №	Назва речовини	Поглинання глюкози (порівняно до природного інсуліну)
Тест 1	Природний інсулін людини	100 %
	кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну	11,6 %
	кон'югат аналога інсуліну (№ 6) з Fc-ділянкою імуноглобуліну	0,43 %
	кон'югат аналога інсуліну (№ 7) з Fc-ділянкою імуноглобуліну	1,84 %
Тест 2	Природний інсулін людини	100 %
	кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну	15,2 %
	кон'югат аналога інсуліну (№ 8) з Fc-ділянкою імуноглобуліну	16,0 %
Тест 3	Природний інсулін людини	100 %
	кон'югат природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну	11,7 %
	кон'югат аналога інсуліну (№ 9) з Fc-ділянкою імуноглобуліну	15,1 %

Приклад 11: Фармакокінетичні характеристики кон'югату аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну.

Для перевірки фармакокінетичних характеристик кон'югатів аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну було здійснено порівняння їх концентрацій у крові протягом часу у нормальних щурів (6-тижневі щури SD чоловічої статі), які пройшли 5-денний адаптаційний період до перебування у лабораторних умовах. Піддослідним тваринам було підшкірно введено, відповідно, 21,7 нмоль/кг кон'югату природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну та 65,1 нмоль/кг кон'югату аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну з відбором зразків крові у 0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 та 216 годину досліджень. Вимірювання концентрацій кон'югату природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югату аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну в крові у кожну точку часу було здійснено з допомогою ферментного імуносорбентного аналізу (ІФА) із застосуванням набору Insulin ELISA (ALPCO, USA). При цьому як детекторного антитіла було застосовано мишаче антитіло до IgG4 людини, кон'юговане з пероксидазою хрому (Alpha Diagnostic Intl, Inc, USA).

Результати перевірки фармакокінетичних характеристик кон'югату природного інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну та кон'югату аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну виявили збільшення їх концентрацій в крові, які збільшувалися пропорційно їх концентраціям введення. Також було виявлено, що кон'югати аналога інсуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну, які мали низьку зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору мали дуже збільшений, порівняно до кон'югату природного інсуліну з Fc-ділянкою, час напівжиття (Fig. 6).

Ці результати наводять на думку, що при з'єднанні змінених для отримання зниженої зв'язувальної спорідненості до інсулінового рецептору аналогів інсуліну за винаходом з Fc-ділянкою імуноглобуліну для отримання кон'югатів можна передбачити застосування цих

кон'югатів як стійких інсулінових композицій завдяки їх помітно збільшеному часу напівжиття *in vivo* у крові, отже можна передбачити їх ефективне застосування як терапевтичних агентів у лікуванні діабету. Крім того, оскільки аналоги інсуліну за винаходом самі по собі також мають зменшену зв'язувальну спорідненість до інсулінового рецептору та зменшений титр, вони також

5

виявляють подібний ефект, хоча і є приєднаними до інших різних носіїв.

На підставі наведеного вище опису, фахівцям у цій галузі техніки має бути очевидною можливість здійснення різних модифікацій та змінень без відходу від обсягу та суті цього винаходу. Таким чином, слід розуміти, що наведене вище втілення є не обмежуючим, а лише ілюстративним у всіх аспектах. Обсяг винаходу визначено скоріше доданою до нього Формулою

10

Винаходу, а не попереднім його описом, отже, всі зміни і модифікації, які охоплюються межами Формули Винаходу або еквівалентами цих меж призначені бути охопленими Формулою Винаходу.

<110> ХАНМІ ФАРМ. КО., ЛТД

<120> Новий аналог інсуліну та його застосування

<130> ОРА14031-РСТ

<150> KR 10-2013-0020703

<151> 2013-02-26

<150> KR 10-2013-0082511

<151> 2013-07-12

<150> KR 10-2014-0006937

<151> 2014-01-20

<160> 38

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 39

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 1

gggtccctgc agaagcgtgc gattgtgga caatgctgt

39

<210> 2

<211> 39

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 2

acagcattgt tccacaatcg cacgcttctg cagggaccc

39

<210> 3

<211> 39

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 3

tcctgcaga agcgtggcgc ggtggaaca tgctgtacc

39

<210> 4

<211> 39

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 4

ggtacagcat tgtccaccg cgccacgctt ctgcaggga

39

<210> 5

<211> 36

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 5

ctctaccagc tggaaaacgc gtgtaactga ggatcc

36

<210> 6

<211> 36

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 6

ggatcctcag ttacacgcgt ttccagctg gtagag

36

<210> 7

<211> 39

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 7

gttaaccaac acttgtgtgc gtcacacctg gtggaagct

39

<210> 8
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> праймер

<400> 8
 agcttcacc aggtgtgacg cacacaagtg ttggtaac

39

<210> 9
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> праймер

<400> 9
 ctagtgtgcg gggaacgagc gttcttctac acacccaag

39

<210> 10
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> праймер

<400> 10
cttgggtgtg tagaagaacg ctggtcccc gcacactag 39

<210> 11
<211> 39
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> праймер

<400> 11
gtgtgcgggg aacgaggcgc gttctacaca cccaagacc 39

<210> 12
<211> 39
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> праймер

<400> 12
ggctctgggt gtgtagaacg cgcctcgttc cccgcacac 39

<210> 13
<211> 39
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 13

tgcggggaac gaggcttcgc gtacacaccc aagacccgc

39

<210> 14

<211> 39

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 14

gcgggtcttg ggtgtgtacg cgaagcctcg ttccccgca

39

<210> 15

<211> 37

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 15

ccagcatctg ctccctcgaa cagctggaga actactg

37

<210> 16

<211> 37

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 16

cagtagttct ccagctgttc gagggagcag atgctgg

37

<210> 17

<211> 34

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 17

cagcatctgc tccctcaacc agctggagaa ctac

34

<210> 18

<211> 34

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 18

gtagttctcc agctggttga gggagcagat gctg

34

<210> 19
 <211> 258
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> аналог 1

<400> 19
 ttcgtaacc aacacttg tggtcacac ctggtgaag ctctacct agtgtcggg 60
 gaacgaggct tctctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agccctggc cctggagggg 180
 tcctgcaga agcgtgcgat tgtggaaca tgctgtacca gcatctgct cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 20
 <211> 86
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> аналог 1

<400> 20
 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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Ala Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 21
<211> 258
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> аналог 2

<400> 21
ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
gaacgaggct tctctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agccctggc cctggagggg 180
tcctgcaga agcgtggcgc ggtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240
ctggagaact actgcaac 258

<210> 22

<211> 86
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> аналог 2

<400> 22
 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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60

Arg Gly Ala Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 23
 <211> 258
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> аналог 3

<400> 23

ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgaggct tctctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agccctggc cctggagggg 180

tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

ctggagaacg cgtgcaac 258

<210> 24

<211> 86

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> аналог 3

<400> 24

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln

65 70 75 80

Leu Glu Asn Ala Cys Asn

85

<210> 25

<211> 258

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> аналог 4

<400> 25

ttcgtaacc aacactgtg tgcgtcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg cctggtgca ggcagcctgc agccctggc cctggagggg 180

tccctgcaga agcgtggcat tgtggaaca tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 26

<211> 86

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> аналог 4

<400> 26

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Ala 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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 27

<211> 258

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> аналог 5

<400> 27

ttcglttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgagcgt tctctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg cctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180

tcctgcaga agcgtggcat tgtggaaca tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 28

<211> 86

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> аналог 5

<400> 28

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 Ala Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg

20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 29

<211> 258

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> аналог 6

<400> 29

ttcgtaacc aacactgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgaggcg cgttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcagggtggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agccctggc cctggagggg 180

tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcctctgctc cctctaccag 240

ctggagaact actgcaac 258

<210> 30

<211> 86

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> аналог 6

<400> 30

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 Ala Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg

20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 31
 <211> 258
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> аналог 7

<400> 31
 ttcgtaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcgctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcagggtggg 120
 cagggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agccctggc cctggagggg 180
 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 32
 <211> 86
 <212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> аналог 7

<400> 32

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 Ala Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg

20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys

50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln

65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 33

<211> 261

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> аналог 8

<400> 33

ttcgtaacc aacactgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgctgg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcagggtggg 120
 cagggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agccctggc cctggagggg 180
 tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcctctgctc cctcgaacag 240
 ctggagaact actgcaactg a 261

<210> 34
 <211> 86
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> аналог 8

<400> 34
 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
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

<210> 35

<211> 261

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> аналог 9

<400> 35

ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agccctggc cctggagggg 180

tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcctctgctc cctcaaccag 240

ctggagaact actgcaactg a 261

<210> 36

<211> 86

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> аналог 9

<400> 36

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
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asn Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 37
 <211> 21
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> А - ланцюг інсуліну

<400> 37
 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> 38

<211> 30

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> В - ланцюг інсуліну

<400> 38

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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Аналог інсуліну, де амінокислотну послідовність інсуліну модифіковано шляхом заміни 14-ої амінокислоти у ланцюзі А глутаміновою кислотою або аспарагіном, та де амінокислотні послідовності В та А ланцюгів інсуліну складаються з SEQ ID NO: 38 та 37, відповідно.
2. Аналог інсуліну за п. 1, в якому зменшений титр інсуліну асоційований зі зменшеною зв'язувальною спорідненістю до інсулінового рецептора.
- 10 3. Аналог інсуліну за п. 1, який вибрано з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 34 та 36.
4. Кон'югат аналога інсуліну, в якому (i) аналог інсуліну за будь-яким з пп. 1-3 є зв'язаним з (ii) одним біосумісним матеріалом, вибраним з групи, яка складається з поліетиленгліколю, жирної кислоти, холестерину, альбуміну та його фрагментів, альбумін-зв'язуючих матеріалів, полімерів,
- 15 які складаються з повторюваних одиниць окремої амінокислотної послідовності, антитіл, фрагментів антитіл, FcRn-зв'язувальних матеріалів, фібронектину, трансферину, сахариду та полімерів, як носієм, здатним подовжувати час напівжиття аналога інсуліну *in vivo*.
5. Кон'югат аналога інсуліну за п. 4, в якому аналог інсуліну та біосумісний матеріал з'єднано один з одним пептидним або непептидильним полімером як лінкером.
- 20 6. Кон'югат аналога інсуліну за п. 4, в якому FcRn-зв'язуючий матеріал є Fc-ділянкою імуноглобуліну.
7. Кон'югат аналога інсуліну за п. 5, в якому (i) аналог інсуліну за будь-яким з пп. 1-3 є зв'язаним з (ii) Fc-ділянкою імуноглобуліну (iii) пептидним лінкером або непептидильним лінкером, вибраним з групи, що складається з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, співполімерів
- 25 етиленгліколю - пропіленгліколю, поліоксіетілованих поліолів, полівінілового спирту, полівінілового етилового етеру та їх комбінації.
8. Кон'югат аналога інсуліну за п. 7, в якому непептидильний лінкер приєднано до N-кінця В-ланцюга аналога інсуліну.
9. Кон'югат аналога інсуліну за п. 7, в якому обидва кінці непептидильного полімеру приєднано відповідно до N-кінця Fc-ділянки імуноглобуліну та до N-кінцевої аміногрупи аналога інсуліну
- 30 або до ε-аміногрупи або тіолової групи внутрішнього лізинового залишку В - ланцюга.
10. Кон'югат аналога інсуліну за п. 7, в якому Fc-ділянка імуноглобуліну є неглікозилюваною.
11. Кон'югат аналога інсуліну за п. 7, в якому Fc-ділянка імуноглобуліну складається з 1-4 доменів, вибраних з групи, яка складається з доменів CH1, CH2, CH3 та CH4.
- 35 12. Кон'югат аналога інсуліну за п. 7, в якому Fc-ділянка імуноглобуліну є Fc-ділянкою, отриманою з IgG, IgA, IgD, IgE або IgM.
13. Кон'югат аналога інсуліну за п. 12, в якому кожен домен Fc-ділянки імуноглобуліну є гібридом доменів різного походження та отриманим з імуноглобуліну, вибраного з групи, яка складається з IgG, IgA, IgD, IgE та IgM.

14. Кон'югат аналога інсуліну за п. 7, в якому Fc-ділянка імуноглобуліну додатково містить шарнірну ділянку.
15. Кон'югат аналога інсуліну за п. 12, в якому Fc-ділянка імуноглобуліну є димером або мультимером, який складається з одноланцюгових імуноглобулінів, які складаються з доменів
5 однакового походження.
16. Кон'югат аналога інсуліну за п. 12, в якому Fc-ділянка імуноглобуліну є Fc-ділянкою IgG4.
17. Кон'югат аналога інсуліну за п. 16, в якому Fc-ділянка імуноглобуліну є неглікозилованою Fc-ділянкою, отриманою від IgG4 людини.
18. Кон'югат аналога інсуліну за п. 7, в якому реакційну групу непептидильного лінкера вибрано
10 з групи, яка складається з альдегідної групи, пропіональдегідної групи, бутиральдегідної групи, малеїмідної групи та сукцинімідної похідної.
19. Кон'югат аналога інсуліну за п. 18, в якому сукцинімідною похідною є сукцинімідил-пропіонат, сукцинімідил-карбоксиметил, гідроксисукцинімідил або сукцинімідил-карбонат.
20. Кон'югат аналога інсуліну за п. 7, в якому непептидильний лінкер має реакційні альдегідні
15 групи на своїх обох кінцях.
21. Композиція інсуліну тривалої дії, яка має подовжений строк життя *in vivo* та стійкість та містить кон'югат аналога інсуліну за п. 4.
22. Композиція інсуліну тривалої дії за п. 21, яка є терапевтичним засобом проти діабету.
23. Спосіб отримання кон'югату аналога інсуліну за п. 4, який полягає в:
20 (i) отриманні аналога інсуліну;
(ii) отриманні біосумісного матеріалу, вибраного з групи, яка складається з поліетиленгліколю, жирної кислоти, холестерину, альбуміну та їх фрагментів, альбумін-зв'язуючих матеріалів, полімерів повторюваних одиниць певної амінокислотної послідовності, антитіла, фрагментів антитіла, FcRn-зв'язуючих матеріалів, фібрoneктину, трансферину,
25 сахариду та полімерів; та
(iii) зв'язуванні аналога інсуліну з біосумісним матеріалом.

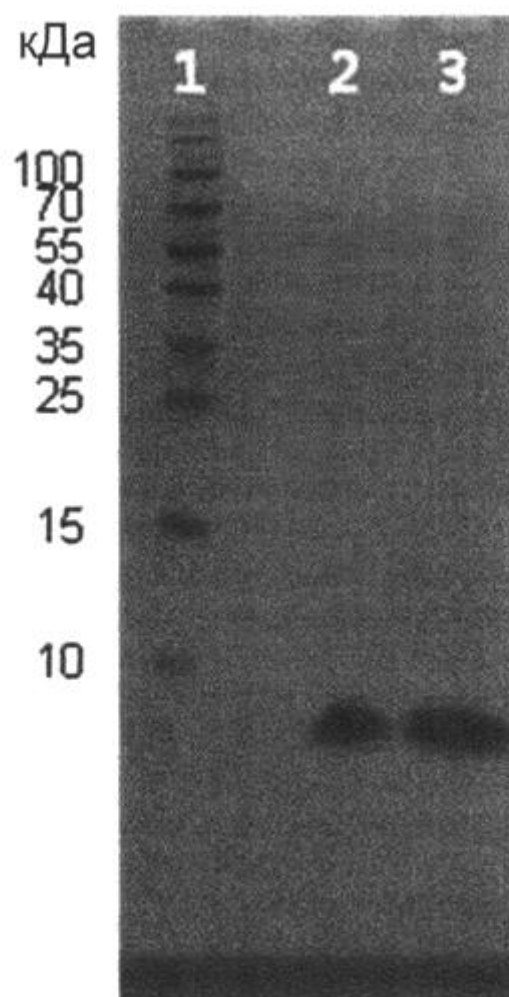
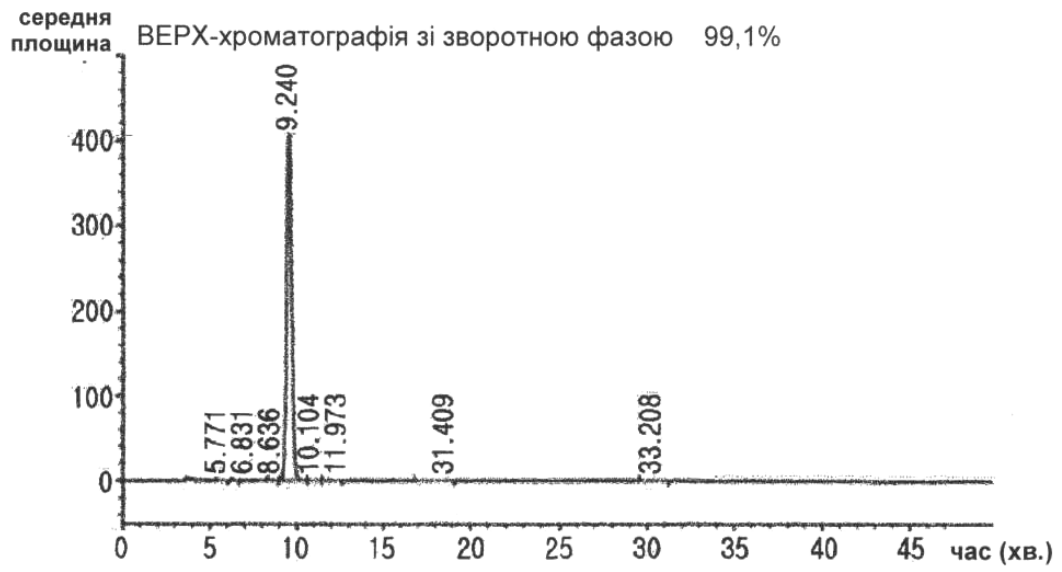
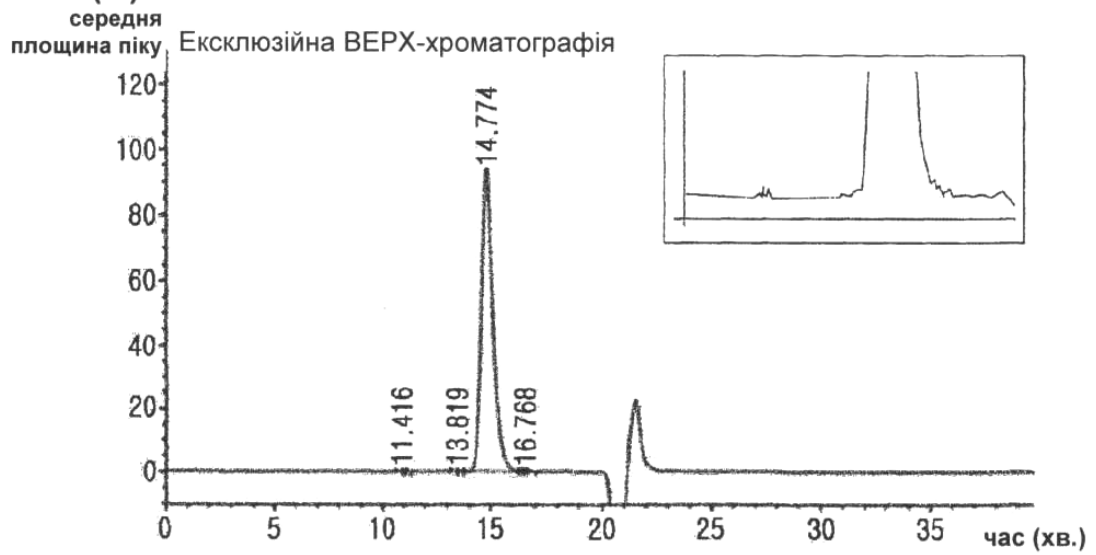


Fig. 1

(A)

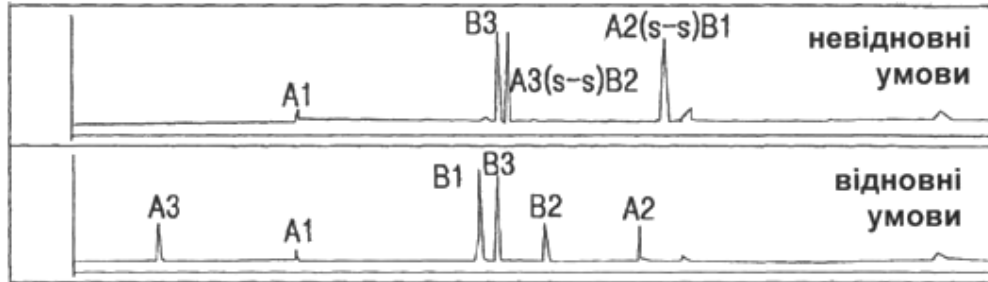
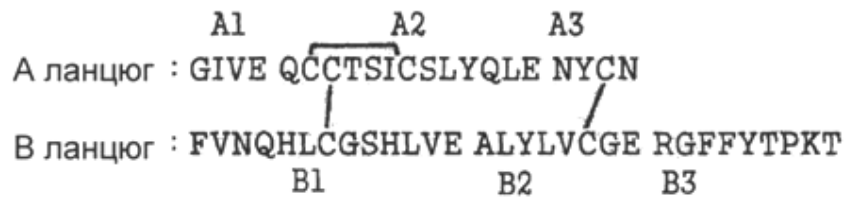


(B)

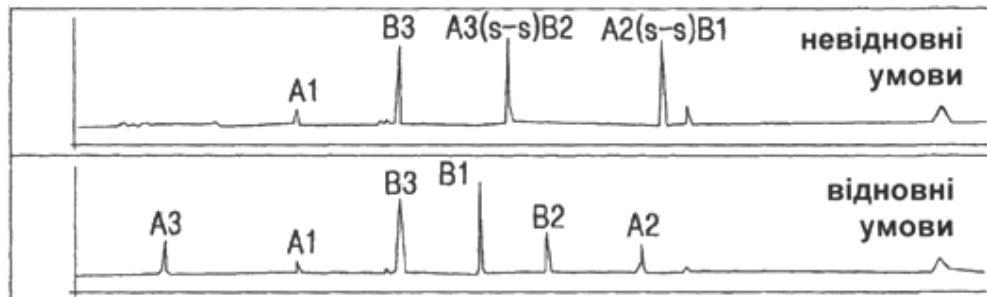
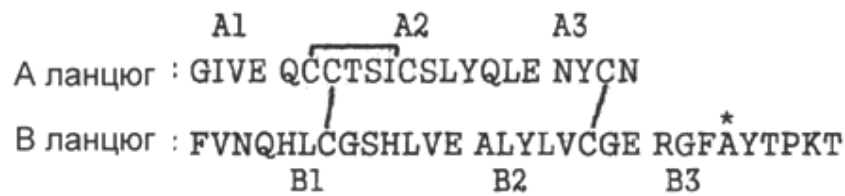


Фіг. 2

(A) фрагмент розщеплення Glu-C природної послідовності інсуліну



(B) фрагмент розщеплення Glu-C послідовності аналога інсуліну (№7)



Фіг. 3

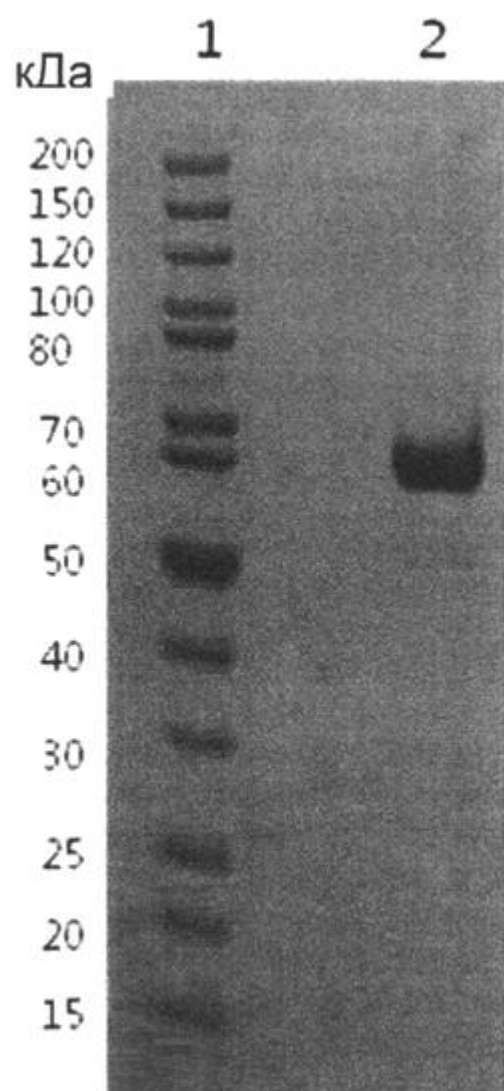
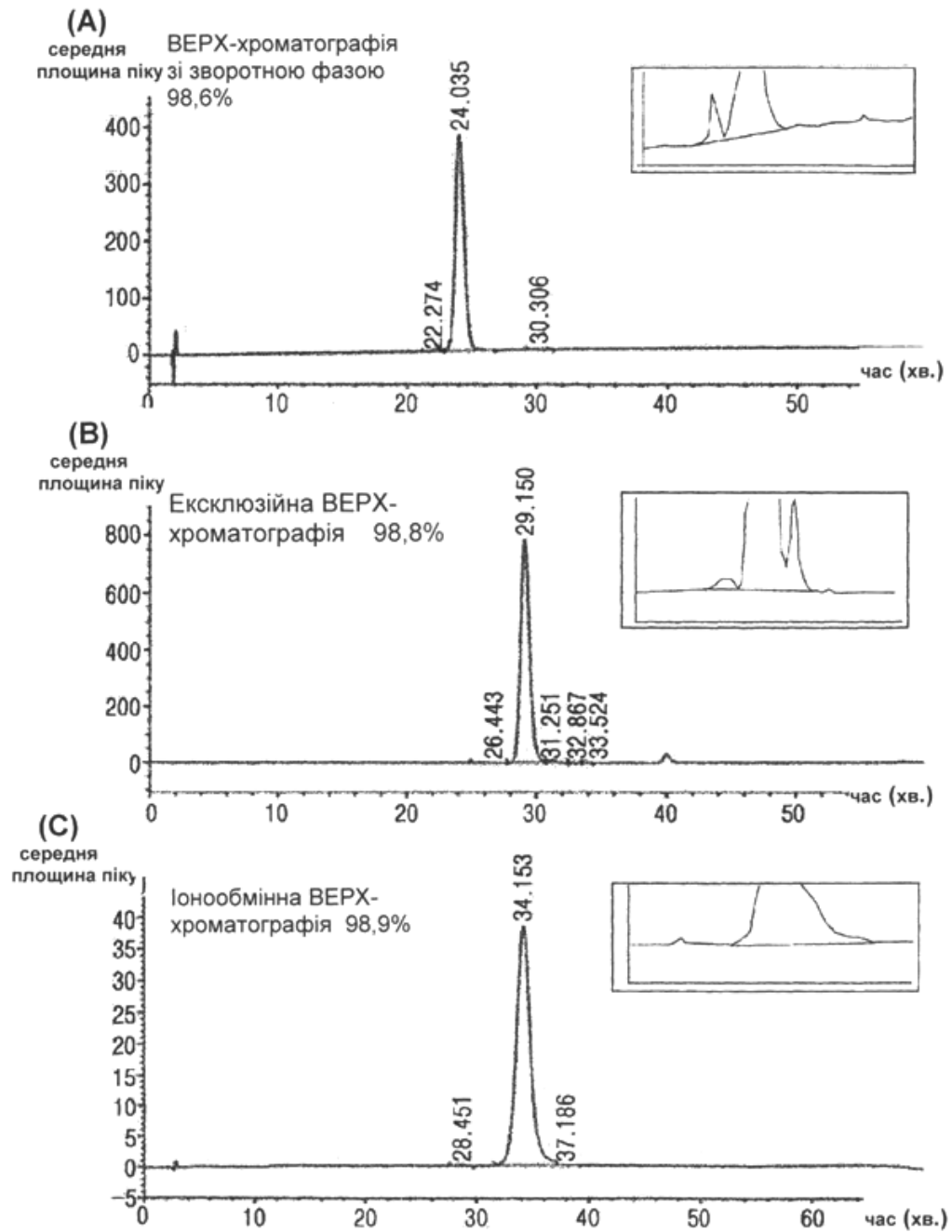
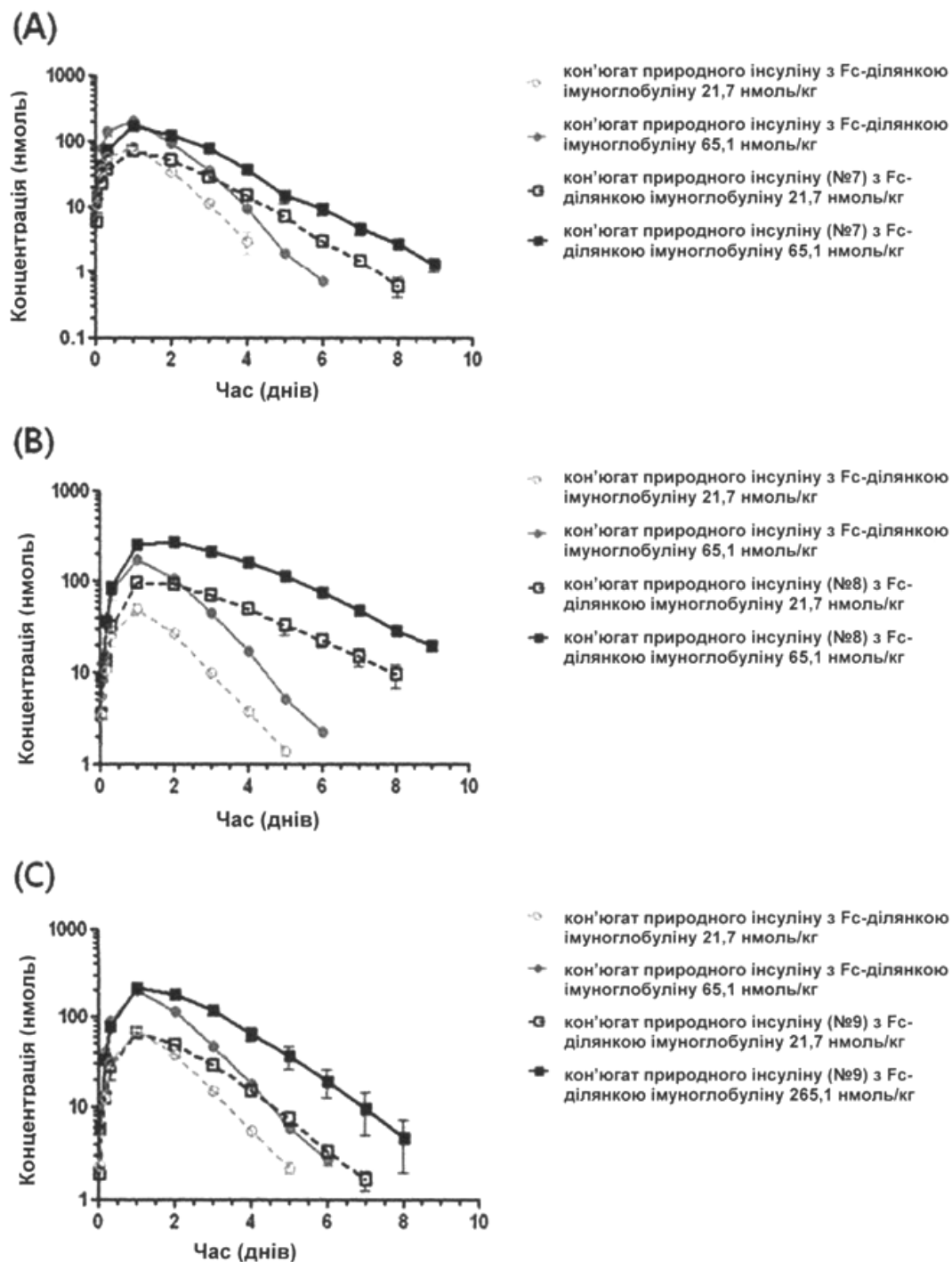


Fig. 4



Фіг. 5



Фіг. 6

Комп'ютерна верстка В. Юкін

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601