



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2014127270, 22.11.2012

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.12.2011 CN 201110422095.2

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2016 Бюл. № 04

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.07.2014(86) Заявка РСТ:
CN 2012/085054 (22.11.2012)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/086927 (20.06.2013)Адрес для переписки:
191002, Санкт-Петербург, а/я 5, ООО "Ляпунов
и партнеры"

(71) Заявитель(и):

ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСҮОТИКАЛ КО., ЛТД. (CN),
ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ МЕДСИН КО., ЛТД.
(CN)

(72) Автор(ы):

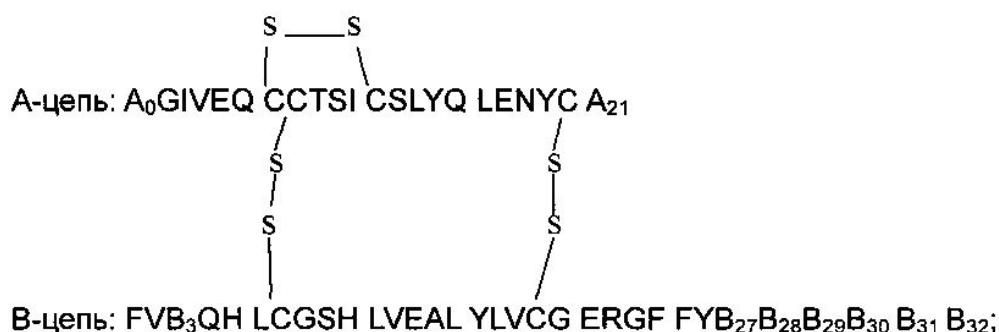
СУНЬ Пляоян (CN),
ЧЖАН Ляньшань (CN),
ЛЮ Цзяцзянь (CN),
ЮАНЬ Цзицзюнь (CN),
ФАН Чуньцзянь (CN),
СУНЬ Чангань (CN),
ЮАНЬ Хэнли (CN),
ВАН Яли (CN)

A

(54) АНАЛОГ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИНСУЛИНА И ЕГО АЦИЛИРОВАННОЕ ПРОИЗВОДНОЕ

(57) Формула изобретения

1. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль, имеющий А-цепь и В-цепь, как представлено ниже:

где A₀ может представлять собой R или отсутствует;A₂₁ может представлять собой N или G;B₃ может представлять собой K, D или N;B₂₇ может представлять собой E, T, D или K;B₂₈ может представлять собой E, D, P или K;B₂₉ может представлять собой E, K или P;B₃₀ может представлять собой K, R, E, T или отсутствует;

2014127270

RU

R U 2 0 1 4 1 2 7 2 7 0 A

B_{31}, B_{32} может представлять собой R, возможно один или оба отсутствуют; при условии, что:

когда A_0 отсутствует, а A_{21} и B_3 представляют собой N:

$B_{31}B_{32}$ отсутствует, $B_{27}B_{28}B_{29}B_{30}$ не является ТРКТ, ТКРТ или ТДКТ;

или $B_{30}B_{31}B_{32}$ отсутствует, $B_{27}B_{28}B_{29}$ не является ТРК;

когда A_0 отсутствует, A_{21} представляет собой N, B_3 представляет собой K, и $B_{31}B_{32}$ отсутствует, $B_{27}B_{28}B_{29}B_{30}$ не является ТЕКТ;

когда A_0 отсутствует, A_{21} представляет собой G, и B_3 представляет собой N, $B_{27}B_{28}B_{29}B_{30}B_{31}B_{32}$ не является ТРКТРР;

когда B_3 и $B_{27}-B_{30}$ представляют собой остатки лизина, ϵ -аминогруппа по остаткам лизина может быть ацилирована;

возможно, α -аминогруппа в N'-терминальном положении A-цепи и B-цепи также может быть ацилирована.

2. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по п. 1, отличающийся тем, что только один из указанных остатков аминокислот B_3 и $B_{27}-B_{30}$ представляют собой остатки лизина.

3. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по п. 1, отличающийся тем, что, когда указанный B_3 в B-цепи представляет собой N:

B_{28} выбран из K, R или D, B_{29} выбран из E, K или P, B_{30} выбран из R, E, T или отсутствует, B_{31} и B_{32} отсутствуют.

4. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по п. 3, отличающийся тем, что, когда указанный $B_{30}B_{31}B_{32}$ отсутствует, $B_{28}B_{29}$ представляет собой KE.

5. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по п. 1, отличающийся тем, что, когда указанный B_3 в B-цепи представляет собой D:

B_{28} и B_{29} представляют собой P или K;

B_{30} представляет собой R или T или отсутствует;

B_{31} и B_{32} представляют собой R или отсутствуют;

среди которых $B_{28}B_{29}$ представляет собой предпочтительно РК.

6. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по п. 1, отличающийся тем, что, когда A_0 отсутствует и B_3 в B-цепи представляет собой K:

B_{28} и B_{29} представляют собой P или E;

B_{30} представляет собой E или R;

B_{31} представляет собой R или отсутствует;

и B_{32} отсутствует;

среди которых $B_{28}B_{29}$ представляет собой предпочтительно РЕ.

7. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по п. 1, отличающийся тем, что последовательности указанных A-цепи и B-цепи выбраны из группы, состоящей из:

A-цепь: RGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

SEQ ID NO.4

B-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK

SEQ ID NO.5

R U 2014127270

A

A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN	SEQ ID NO.1
В-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKER	SEQ ID NO.6
A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN	SEQ ID NO.1
В-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKE	SEQ ID NO.7
A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN	SEQ ID NO.1
В-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPE	SEQ ID NO.8
A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN	SEQ ID NO.1
В-цепь: FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPEE	SEQ ID NO.9
A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN	SEQ ID NO.1
В-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKE	SEQ ID NO.10
A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCG	SEQ ID NO.2
В-цепь: FVDQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR	SEQ ID NO.11
A-цепь: RGIVEQCCTSICSLYQLENYCG	SEQ ID NO.3
В-цепь: FVDQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTR	SEQ ID NO.12
A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN	SEQ ID NO.1
В-цепь: FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPERR	SEQ ID NO.13
A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN	SEQ ID NO.1
В-цепь: FVDQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK	SEQ ID NO.14
A-цепь: RGIVEQCCTSICSLYQLENYCN	SEQ ID NO.4
В-цепь: FVDQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK	SEQ ID NO.14
A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCG	SEQ ID NO.2
В-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKE	SEQ ID NO.15

R U 2014127270

A

RU 2014127270 A

R U 2 0 1 4 1 2 7 2 7 0 A

А-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCG SEQ ID NO.2
В-цепь: FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPEE SEQ ID NO.16

А-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCG SEQ ID NO.2
В-цепь: FVDQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKR SEQ ID NO.17

А-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCG SEQ ID NO.2
В-цепь: FVDQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK SEQ ID NO.18

А-цепь: RGIVEQCCTSICSLYQLENYCG SEQ ID NO.3
В-цепь: FVDQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK SEQ ID NO.18

А-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCG SEQ ID NO.2
В-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKE SEQ ID NO.10.

8. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный аналог человеческого инсулина пегилирован.

9. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по п. 1, отличающийся тем, что указанный аналог человеческого инсулина модифицирован ПЭГ (полиэтиленгликоль), молекулярная масса молекулы указанного ПЭГ составляет 5-100 кДа, предпочтительно 10-80 кДа, более предпочтительно 15-45 кДа, наиболее предпочтительно 20-40 кДа; и молекула указанного ПЭГ имеет разветвленное или линейное строение.

10. Способ получения аналога человеческого инсулина или его физиологически приемлемой соли по любому из пп. 1-9, включающий конструирование вектора экспрессии, экспрессию указанного вектора, трансформированного в клетки-хозяева, выделение и очистку экспрессированного белка-предшественника, высвобождение указанного аналога инсулина из экспрессированного белка-предшественника с помощью химических и/или ферментативных методов; возможно, аналог человеческого инсулина пегилируют, указанное пегилирование предпочтительно представляет собой способ химической модификации путем ацилирования, который включает синтез ацилирующего агента, ацилирование аминогруппы, входящей в состав аналогов человеческого инсулина, и удаление защитной группы с ацилированной группы.

11. Экспрессированный белок-предшественник, примененный для получения аналога человеческого инсулина или его физиологически приемлемой соли по любому из пп. 1-9, который имеет следующую формулу (I):

A-R1-B (I)

Где R1 представляет собой пептидный фрагмент, содержащий 0-5 аминокислотных остатков, указанный пептидный фрагмент состоит из аланина (A), лизина (K) и аргинина (R);

А соответствует А-цепи, а В соответствует В-цепи аналога человеческого инсулина.

12. Экспрессированный белок-предшественник по п. 11, отличающийся тем, что указанный белок-предшественник выбран из группы, состоящей из:

RU 2014127270 A

R U 2 0 1 4 1 2 7 2 7 0 A

SEQ ID NO.19:

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKEKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN,

SEQ ID NO.20:

FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPEEKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCG,

SEQ ID NO.21:

FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPEEKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

или SEQ ID NO.77:

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKEKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCG.

13. ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), кодирующая экспрессированный белок-предшественник по п. 11 или 12.

14. Вектор экспрессии, содержащий ДНК по п. 13.

15. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п. 14.

16. Клетка-хозяин по п. 15, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, предпочтительно *Escherichia coli*.

17. Клетка-хозяин по п. 15, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку, предпочтительно *Pichia pastoris* или *Saccharomyces cerevisiae*.

18. Производное инсулина, отличающееся тем, что ацилированный инсулин образован с помощью присоединения ацилированной группы к α -аминогруппе в N-терминальном положении А-цепи и В-цепи или к ϵ -аминогруппе по остатку лизина в положениях B₃, B₂₇-B₃₀, ацилированный инсулин имеет следующую формулу:

S-W-X-Y-Z

где S представляет собой инсулин или аналог человеческого инсулина в соответствии с одним из пп. 1-7;

-W-X-Y-Z представляет собой ацилированную группу аналога человеческого инсулина, где W выбран из

- группы, имеющей диацильную структуру -OC(CH₂)_mCO-, где m представляет собой целое число от 2 до 10, амидная связь образована между одной из карбоксильных групп указанной структуры и α -аминогруппой по N-терминальному аминокислотному остатку А-цепи или В-цепи исходного инсулина или его аналога или ϵ -аминогруппой по остатку Lys, находящегося в В-цепи;

- остатка α -аминокислоты с карбоксильной группой в боковой цепи или пептида, содержащего 2-4 α -аминокислоты с карбоксильной группой в боковой цепи, при этом амидная связь образована между указанным остатком или указанным пептидом и α -аминогруппой в N-терминальном положении А-цепи или В-цепи исходного инсулина или его аналога или ϵ -аминогруппой по остатку Lys находящегося в В-цепи;

X выбран из

- -CO-;

- соединения диамина, содержащего карбоксильную группу, при этом амидная связь образована между одной из α -аминогрупп указанного соединения диамина и карбоксильной группой W;

а) когда W представляет собой остаток α -аминокислоты или пептид, содержащий 2-4 α -аминокислоты, указанная амидная связь образована между аминогруппой W и -CO- X;

б) когда W представляет собой группу, имеющую диацильную структуру, указанная группа X связана с диацильной структурой через одну из ее аминогрупп;

2014127270A

R U 2014127270 A

Y выбран из

- $-A(CH_2)_m-$, где m представляет собой целое число от 6 до 32, и A отсутствует или представляет собой $CO-$;
 - бивалентной углеводородной цепи, содержащей ацильную группу, которая содержит 1, 2 или 3 $-CH=CH-$ групп и несколько $-CH_2-$ групп, достаточных чтобы достичь общего содержания атомов углерода в цепи 10-32;
 - бивалентной углеводородной цепи, имеющей формулу $-B(CH_2)_vC_6H_4(CH_2)_w-$, где B отсутствует или представляет собой $CO-$, v и w представляют собой целые числа или одно из них является 0, v и w находятся в диапазоне от 6 до 30;
 - a) когда X представляет собой $CO-$, A или B отсутствует; или
 - b) когда X представляет собой соединение диамина, A или B представляет собой $CO-$;
- Z выбран из группы, состоящей из $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-SO_3H$, $-PO_3H$.
19. Производное инсулина по п. 18, отличающееся тем, что ацилированная группа $-W-X-Y-Z$ соединена с ϵ -аминогруппой по остаткам лизина в положениях B_3 , B_{27} - B_{30} исходного инсулина.
20. Производное инсулина по п. 18, отличающееся тем, что ацилированная группа $-W-X-Y-Z$ соединена с α -аминогруппой в N-терминальном положении A-цепи и B-цепи исходного инсулина.
21. Производное инсулина по п. 18, отличающееся тем, что S представляет собой аналог человеческого инсулина, выбранный из группы, состоящей из:
- | | |
|--|--------------|
| A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN | SEQ ID NO.1 |
| B-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKE | SEQ ID NO.10 |
-
- | | |
|---|-------------|
| A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN | SEQ ID NO.1 |
| B-цепь: FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPPEE | SEQ ID NO.9 |
-
- | | |
|---|--------------|
| A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCG | SEQ ID NO.2 |
| B-цепь: FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPPEE | SEQ ID NO.16 |
22. Производное инсулина по п. 18, отличающееся тем, что ацилированная группа $-W-X-Y-Z$ выбрана из группы, состоящей из:
- $N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-y-Glu$;
- $N^{\alpha}-(HO(CH_2)_{15}CO)-y-Glu$;
- $N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N^{\epsilon}-(3\text{-ацилпропионовая кислота}^*)-Lys$,
- где * представляет собой сайт для присоединения инсулина.
23. Производное инсулина по п. 18, отличающееся тем, что оно выбрано из группы, состоящей из:
- $B28D-N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-y-Glu)-B30E$ человеческий инсулин;
- $B28D-N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HO(CH_2)_{15}CO)-y-Glu)-B30E$ человеческий инсулин;
- $N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N^{\epsilon}-(OCCCH_2CH_2CO-(B28D-N^{\epsilon B29}-B30E$ человеческий инсулин;))
- $-Lys-OH$;
- $N^{\epsilon B3}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-y-Glu)-B29E-B30E$ человеческий инсулин;

$N^{\varepsilon B^3}-(N^{\alpha}-(HOC(CH_2)_{15}CO)-y-Glu)-B29E-B30E$ человеческий инсулин;
 $N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N^{\varepsilon}-(OCCH_2CH_2CO-(N^{\varepsilon B^3}-B29E-B30E$ человеческий инсулин;))-Lys-OH;
 $N^{\varepsilon B^3}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-y-Glu)-B29E-B30E$, A21G человеческий инсулин;
 $N^{\varepsilon B^3}-(N^{\alpha}-(HOC(CH_2)_{15}CO)-y-Glu)-B29E-B30E$, A21G человеческий инсулин;
 $N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N^{\varepsilon}-(OCCH_2CH_2CO-(N^{\varepsilon B^3}-B29E-B30E$, A21G человеческий инсулин;))-Lys-OH.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая аналог человеческого инсулина или его физиологически приемлемую соль по любому из пп. 1-9, или содержащая производные инсулина по любому из пп. 18-23.

25. Фармацевтическая композиция по п. 24, содержащая аналог человеческого инсулина или его физиологически приемлемую соль в растворенном, аморфном и/или кристаллическом виде.

26. Фармацевтическая композиция по п. 24, содержащая длительно действующий адьювант, указанный длительно действующий адьювант присутствует наряду с лекарственным средством по типу сокристаллизации.

27. Инъекционный раствор, обладающий активностью инсулина, отличающийся тем, что включает фармацевтическую композицию по п. 24, присутствующую в растворенном виде.

28. Применение аналога человеческого инсулина и/или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 1-9, или производного инсулина по любому из пп. 18-23 для получения лекарственного средства для лечения диабета II типа, гипергликемии, ожирения или синдрома резистентности к инсулину.

29. Применение аналога человеческого инсулина и/или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 1-9 для получения быстро действующей или длительно действующей фармацевтической композиции, обладающей активностью инсулина.