

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"

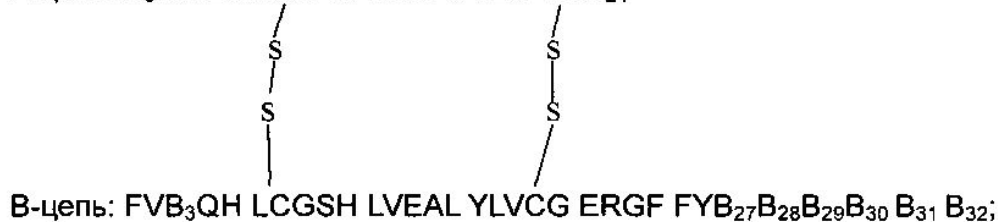
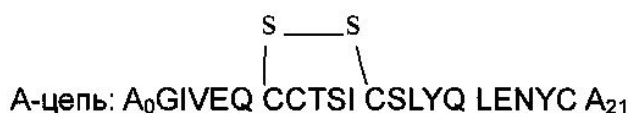
(71) Заявитель(и):

**ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN),  
ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ МЕДСИН КО., ЛТД.  
(CN)**

(72) Автор(ы):

**СУНЬ Пяоян (CN),  
ЧЖАН Ляньшань (CN),  
ЛЮ Цзяцзянь (CN),  
ЮАНЬ Цзицзюнь (CN),  
ФАН Чуньцянь (CN),  
СУНЬ Чангань (CN),  
ЮАНЬ Хэнли (CN),  
ВАН Яли (CN)**(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  $\text{A}_0$  может представлять собой R или отсутствует; $\text{A}_{21}$  может представлять собой N или G; $\text{B}_3$  может представлять собой K, D или N; $\text{B}_{27}$  может представлять собой E, T, D или K; $\text{B}_{28}$  может представлять собой E, D, P или K; $\text{B}_{29}$  может представлять собой E, K или P; $\text{B}_{30}$  может представлять собой K, R, E, T или отсутствует;

В<sub>31</sub>, В<sub>32</sub> может представлять собой R, возможно один или оба отсутствуют; при условии, что:

когда А<sub>0</sub> отсутствует, а А<sub>21</sub> и В<sub>3</sub> представляют собой N:

В<sub>31</sub>В<sub>32</sub> отсутствует, В<sub>27</sub>В<sub>28</sub>В<sub>29</sub>В<sub>30</sub> не является ТРКТ, ТКРТ или ТДКТ;

или В<sub>30</sub>В<sub>31</sub>В<sub>32</sub> отсутствует, В<sub>27</sub>В<sub>28</sub>В<sub>29</sub> не является ТРК;

когда А<sub>0</sub> отсутствует, А<sub>21</sub> представляет собой N, В<sub>3</sub> представляет собой K, и В<sub>31</sub>В<sub>32</sub> отсутствует, В<sub>27</sub>В<sub>28</sub>В<sub>29</sub>В<sub>30</sub> не является ТЕКТ;

когда А<sub>0</sub> отсутствует, А<sub>21</sub> представляет собой G, и В<sub>3</sub> представляет собой N, В<sub>27</sub>В<sub>28</sub>В<sub>29</sub>В<sub>30</sub>В<sub>31</sub>В<sub>32</sub> не является ТРКТRR;

когда В<sub>3</sub> и В<sub>27</sub>-В<sub>30</sub> представляют собой остатки лизина, ε-аминогруппа по остаткам лизина может быть ацилирована;

возможно, α-аминогруппа в N'-терминальном положении А-цепи и В-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 В<sub>3</sub> и В<sub>27</sub>-В<sub>30</sub> представляют собой остатки лизина.

3. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по п. 1, отличающийся тем, что, когда указанный В<sub>3</sub> в В-цепи представляет собой N:

В<sub>28</sub> выбран из K, P или D, В<sub>29</sub> выбран из E, K или P, В<sub>30</sub> выбран из R, E, T или отсутствует, В<sub>31</sub> и В<sub>32</sub> отсутствуют.

4. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по п. 3, отличающийся тем, что, когда указанный В<sub>30</sub>В<sub>31</sub>В<sub>32</sub> отсутствует, В<sub>28</sub>В<sub>29</sub> представляет собой KE.

5. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по п. 1, отличающийся тем, что, когда указанный В<sub>3</sub> в В-цепи представляет собой D:

В<sub>28</sub> и В<sub>29</sub> представляют собой P или K;

В<sub>30</sub> представляет собой R или T или отсутствует;

В<sub>31</sub> и В<sub>32</sub> представляют собой R или отсутствуют;

среди которых В<sub>28</sub>В<sub>29</sub> представляет собой предпочтительно PK.

6. Аналог человеческого инсулина и его физиологически приемлемая соль по п. 1, отличающийся тем, что, когда А<sub>0</sub> отсутствует и В<sub>3</sub> в В-цепи представляет собой K:

В<sub>28</sub> и В<sub>29</sub> представляют собой P или E;

В<sub>30</sub> представляет собой E или R;

В<sub>31</sub> представляет собой R или отсутствует;

и В<sub>32</sub> отсутствует;

среди которых В<sub>28</sub>В<sub>29</sub> представляет собой предпочтительно PE.

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

А-цепь: RGIVEQCCTSI CSLYQLENYCN

SEQ ID NO.4

В-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK

SEQ ID NO.5

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

А-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCG SEQ ID NO.2

В-цепь: FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPPEE 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 аминокислотной группы, 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);

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

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

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

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

SEQ ID NO.19:

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKEKRGIVEQCCTSI~~CS~~LYQLENYCN,

SEQ ID NO.20:

FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP~~EE~~KRGIVEQCCTSI~~CS~~LYQLENYCG,

SEQ ID NO.21:

FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP~~EE~~KRGIVEQCCTSI~~CS~~LYQLENYCN

или SEQ ID NO.77:

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKEKRGIVEQCCTSI~~CS~~LYQLENYCG.

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  $\alpha$ -аминогруппе в N-терминальном положении А-цепи и В-цепи или к  $\epsilon$ -аминогруппе по остатку лизина в положениях В<sub>3</sub>, В<sub>27</sub>-В<sub>30</sub>, 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  $-\text{OC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ , где m представляет собой целое число от 2 до 10, амидная связь образована между одной из карбоксильных групп указанной структуры и  $\alpha$ -аминогруппой по N-терминальному аминокислотному остатку А-цепи или В-цепи исходного инсулина или его аналога или  $\epsilon$ -аминогруппой по остатку Lys, находящегося в В-цепи;

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

X выбран из

-  $-\text{CO}-$ ;

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

а) когда W представляет собой остаток  $\alpha$ -аминокислоты или пептид, содержащий 2-4  $\alpha$ -аминокислоты, указанная амидная связь образована между аминогруппой W и  $-\text{CO}-$  X;

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

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;
  - а) когда X представляет собой CO-, A или B отсутствует; или
  - б) 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  $\epsilon$ -аминогруппой по остаткам лизина в положениях B<sub>3</sub>, B<sub>27</sub>-B<sub>30</sub> исходного инсулина.

20. Производное инсулина по п. 18, отличающееся тем, что ацилированная группа  $-W-X-Y-Z$  соединена с  $\alpha$ -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:

А-цепь: GIVEQCCTSI <sup>CS</sup> LYQLENYCN	SEQ ID NO.1
В-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKE	SEQ ID NO.10

А-цепь: GIVEQCCTSI <sup>CS</sup> LYQLENYCN	SEQ ID NO.1
В-цепь: FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPEE	SEQ ID NO.9
А-цепь: GIVEQCCTSI <sup>CS</sup> LYQLENYCG	SEQ ID NO.2
В-цепь: FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPEE	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<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-y-Glu;
- $N^\alpha$ -(HO(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CO)- y -Glu;
- $N^\alpha$ -(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-N<sup>ε</sup>-(3-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<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-y-Glu)-B30E человеческий инсулин;
- B28D-N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HO(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CO)-y-Glu)-B30E человеческий инсулин;
- N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-N<sup>ε</sup>-(OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-(B28D-N<sup>εB29</sup>-B30E человеческий инсулин;))
- Lys-OH;
- N<sup>εB3</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-y-Glu)-B29E-B30E человеческий инсулин;

$N^{\epsilon B3}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{15}CO)-y-Glu)-B29E-B30E$  человеческий инсулин;

$N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N^{\epsilon}-(OCCH_2CH_2CO-(N^{\epsilon B3}-B29E-B30E \text{ человеческий инсулин;}))-Lys-OH$ ;

$N^{\epsilon B3}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-y-Glu)-B29E-B30E$ , A21G человеческий инсулин;

$N^{\epsilon B3}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{15}CO)-y-Glu)-B29E-B30E$ , A21G человеческий инсулин;

$N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N^{\epsilon}-(OCCH_2CH_2CO-(N^{\epsilon B3}-B29E-B30E, A21G \text{ человеческий инсулин;}))-Lys-OH$ .

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 адъювант, указанный длительно действующий адъювант 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.