الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia

براءة اختراع

إن الرئيس التنفيذي للهيئة السعودية للملكية الفكرية وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/27 وتاريخ 1425/05/29هـ والمعدل بقرار مجلس الوزراء رقم 536 وتاريخ 1439/10/19هـ، ولائحته التنفيذية.
يقرر منح:

نوفو نوردیسك ایه / اس
Novo Nordisk A/S

براءة اختراع رقم: SA 6676

بتـــاريخ: 1441/02/09 هـ
الموافق: 2019/10/08 م

عن الاختراع المسمى:

نظير إنسولين بشري من A22K, DESB27, B29R, DES B30 معالج بالأسيل، عند موضع الإبسيلون للبسين 22
AN A22K, DESB27, B29R, DES B30, AT EPSILON POSITION OF LYSINE 22 ACYLATED HUMAN INSULIN ANALOGUE

وفق ما هو موضح في وصف الاختراع المرفق، ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق النظامية في المملكة العربية السعودية خلال فترة سريان الحماية.

الرئيس التنفيذي

د. عبدالعزيز بن محمد السويلم

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

[19] **الهيئة السعودية للملكية الفكرية**
[11] **رقم البراءة:** SA 6676 B

[12] **براءة اختراع**

[45] **تاريخ المنح:** 1441/02/09 هـ
الموافق: 2019/10/08 م

[21] رقم الطلب: 516371705
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1437/11/18 هـ
الموافق: 2016/08/21 م
[30] بيانات الأسبقية:
2014/02/28م EP 14157215.6
[72] اسم المخترع: ماديسن بيتير، هوستروب سوسان، مونزيل مارتين، كجيلدسين توماس بورجلوم، هجورينجارد كلوديا اولريش، فليديلوس كريستيان
[73] مالك البراءة: نوفو نورديسك ايه / اس
عنوانه: نوفو الي، دي كيه – 2880 باجسفيرد، الدنمارك
جنسيته: دنماركية
[74] الوكيل: شركة الهدف لخدمات العلامات المحدودة

[86] رقم الطلب الدولي: PCT/EP2015/053989
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2015/02/26 م
[87] رقم النشر الدولي: WO/2015/128403 A2
تاريخ النشر الدولي: 2015/09/03 م
[51] التصنيف الدولي(IPC[8]):
A61K 038/000, A61K 047/022
A61K 038/028, A61K 031/000
[56] المراجع:
WO 2009022005 , WO 2009112583
- Ligand Controlled Assembly of Hexamers, Dihexamers, and Linear Multihexamer Structures by the Engineered Acylated Insulin Degludec

الفاحص: آمنه بنت ناصر الدوسري

[54] اسم الاختراع: نظير إنسولين بشري من A22K، DESB27، B29R، DES B30 مُعالج بالأسيل، عند موضع الإيبسيلون لليسيين 22

AN A22K, DESB27, B29R, DES B30, AT EPSILON POSITION OF LYSINE 22 ACYLATED HUMAN INSULIN ANALOGUE

[57] الملخص: يتعلق الاختراع الحالي بالمجال العلاجي لعقاقير للحالات الطبية المرتبطة بالسكري diabetes. بشكل أكثر تحديدا يتعلق الاختراع بمشتقات جديدة معالجة بأسيل novel acylated derivatives لنظائر إنسولين بشري human insulin analogues. يقدم الاختراع أيضا تركيبات صيدلانية pharmaceutical compositions تتضمن مشتقات الإنسولين insulin derivatives هذه، وتتعلق باستخدام هذه المشتقات لعلاج أو الوقاية من الحالات الطبية المرتبطة بالسكري.

عدد عناصر الحماية (47)، عدد الأشكال (21)

نظير إنسولين بشري من A22K، DESB27، B29R، DES B30 مُعالج بالأسيل، عند موضع الإيبسيلون لليسيين 22

AN A22K, DESB27, B29R, DES B30, AT EPSILON POSITION OF LYSINE 22 ACYLATED HUMAN INSULIN ANALOGUE

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بالمجال العلاجي لعقاقير للحالات الطبية المرتبطة بالسكري diabetes. بشكل أكثر تحديدا يتعلق الاختراع بمشتقات جديدة معالجة بأسيل novel acylated derivatives لنظائر إنسولين بشري human insulin analogues. يقدم الاختراع أيضا تركيبات صيدلانية pharmaceutical compositions تتضمن مشتقات نظير الإنسولين derivatized insulin analogues، وتتعلق باستخدام هذه المشتقات لعلاج أو الوقاية من الحالات الطبية المرتبطة بالسكري.

تم استخدام دواء الإنسولين Insulin therapy لعلاج السكري diabetes على مدار عقود. عادة ما يتضمن دواء الإنسولين إعطاء العديد من حقن الإنسولين insulin كل يوم. هذا العلاج عادة ما يتضمن إعطاء حقنة أساسية طويلة المدة long-acting basal injection مرة أو مرتين يوميا وحقنة من إنسولين سريع المفعول fast-acting insulin في أثناء الوجبة (أي الاستخدام قبل الأكل). كانت إحدى عمليات التطوير الأساسية في دواء الإنسولين هو إدخال نظائر إنسولين سريعة المفعول rapid-acting insulin analogues. مع ذلك، حتى مع نظائر إنسولين سريعة المفعول، لا تحدث أعلى مستويات الإنسولين بشكل مثالي حتى بعد 50 إلى 70 دقيقة من الحقن.

بالتالي لا تقوم حقن الإنسولين بمضاعفة حالة وقت الأثر الطبيعي للإنسولين. تحديدا، التشعب الطبيعي natural spike لعملية إطلاق إنسولين أحادية الطور first-phase insulin release في شخص بدون السكري تؤدي إلى ارتفاع مستويات إنسولين الدم blood insulin levels في خلال دقائق من دخول الجلوكوز glucose من أي وجبة إلى الدم. على العكس، يدخل الإنسولين المحقون

injected insulin إلى الدم فقط ببطء، مع حدوث مستويات إنسولين قمية في خلال 80 إلى 100 دقيقة بعد حقن الإنسولين البشري المنتظم.

لأن نظائر الإنسولين سريعة المفعول لا تحاكي عملية إطلاق إنسولين الطور الأول، يستمر السكر الذي يستخدم دواء الإنسولين في أن يكون له مستويات غير مناسب من الإنسولين الموجود عند بدء وجبة، والكثير جدا من الإنسولين الموجود بين الوجبات. وهذا البطء في توصيل الإنسولين يمكن أن يؤدي إلى في فرط السكر في الدم مبكرا قبل بدء الوجبة.

يتمتع الإنسولين بخواص ارتباط ذاتي، وتركيزه يمثل عامل أساسي للارتباط الذاتي. عند التركيزات العالية، خصوصا في الصيغة الصيدلانية، سوف يقوم الإنسولين ذاتيا بالارتباط بالديمر dimer والهكاسمر hexamer والدوديكامر dodecamer والبلور crystal. مع ذلك، تلك الصورة النشطة فسيولوجيا من الإنسولين عبارة عن المونومر monomer، والتي ترتبط بمستقبل الإنسولين وتبدأ استجابة بيولوجية.

تعتمد سرعة عمل الإنسولين على سرعة امتصاص الإنسولين من النسيج تحت الجلدي subcutaneous tissue. عند حقن الإنسولين البشري تحت الجلد، يتم تكوين الصيغة بشكل أساسي من هكسامرات hexamers تحتوي على اثنين من أيون الزنك zinc ions. بسبب حجمها، يتضمن الإنسولين هكسامر hexameric insulin إنسولين والذي له معدل أقل من الانتشار وبالتالي، معدل امتصاص أقل من أنواع أصغر .

يوجد داخل الهكسامر اثنين من أيونات التي تقوم بتثبيت الجزيء من حيث التدهور الكيماوي والفيزيائي. بعد الحقن، تتم المعايرة الديناميكية الناتجة عن التركيز في النسيج تحت الجلدي، بما يؤدي إلى فك الهكسامرات وتحويلها إلى ديمرات dimers، وبعد ذلك إلى مونومرات monomers. تاريخيا، صيغة الإنسولين البشري تتطلب تقريبا 120 دقيقة للوصول إلى أقصى مستويات تركيز بلازما plasma concentration levels. تم بيع مستحضرات زنك-إنسولين Zinc-insulin preparations، التي يتم امتصاصها بشكل أسرع من الإنسولين البشري العادي regular human insulin، مثلا إنسولين أسبارت insulin aspart وإنسولين ليسبرو insulin lispro.

سوف تسمح صيغ الإنسولين الخالية من الزنك Zinc-free insulin formulations بعملية امتصاص أسرع تحت الجلد faster subcutaneous absorption، ولكن بالنسبة لمركبات إنسولين insulins عموما، هناك تحد كبير أمام الثبات الكيميائي والفيزيائي.

وقد تم اقتراح العديد من مشتقات الإنسولين insulin derivatives للاستخدامات المختلفة.

تقوم البراءة الدولية 042749 1998 بوصف بلورات إنسولين خالي من الزنك zinc-free insulin crystals للإعطاء الرئوي pulmonary administration.

تقوم البراءة الامريكية 6960561 بوصف مستحضرات إنسولين insulin preparations منخفض الزنك low-zinc وخالي الزنك والتي لها ثبات محسن.

تقوم البراءة الدولية 096431/2007 بوصف مشتقات إنسولين بشري، شاملة نظائر a.i. عند الموضع A22 الذي يحمل وحدة ليسين بنائية معالجة بأسيل acylated lysine residue، في الموضع B29 الذي يحمل وحدة أرجينين بنائية arginine residue، والذي يسمى desB30، وحيث مشتقات قابلة للحل عند قيم حموضة فسيولوجية ولها حالة تأثير مطولة، ومطلوب استخدامها كمركبات إنسولين طويل الأثر long acting insulins.

تقوم البراءة الدولية 022013/2009 بوصف نظائر إنسولين معالج بأسيل acylated insulin analogues معينة، شاملة نظائر a.i. عند الموضع A22 الذي يحمل وحدة ليسين بنائية معالجة بأسيل، في الموضع B29 الذي يحمل وحدة أرجينين بنائية، والذي يسمى desB30، والذي يتضمن قيم ألفة ارتباط binding affinities مستقبل إنسولين insulin receptor أعلى، ومطلوب استخدامها كمركبات إنسولين طويلة المدى.

تصف البراءة الدولية 112583/2009 نظائر إنسولين معينة، شاملة نظائر عند الموضع A22 الذي يحمل وحدة ليسين بنائية، في الموضع B29 الذي يحمل وحدة أرجينين بنائية، والذي يسمى desB30، يبين ثبات بروتياز protease محسن.

تصف البراءة الدولية 161124/2011 نظائر إنسولين معينة معالجة بأسيل تحتوي على روابط داي سلفيد disulfide bonds إضافية للثبات المحسن، شاملة نظائر a.i. عند الموضع A22 الذي يحمل وحدة ليسين بنائية، في الموضع B29 الذي يحمل وحدة أرجينين بنائية، والذي يسمى desB30.

تقوم البراءة الدولية 171994/2012 بوصف مشتق إنسولين insulin derivative معين يتضمن اثنين أو أكثر من مجموعات الاستبدال، شاملة نظائر a.i. عند الموضع A22 الذي يحمل وحدة ليسين بنائية معالجة بأسيل، في الموضع B29 الذي يحمل وحدة أرجينين بنائية، والذي يسمى desB30، لنشاط الإعطاء المطول في الكائن الحي.

تقوم البراءة الدولية 063572 2013 بوصف صيغ نظير إنسولين سريع المفعول عالي التركيز خالية اختياريا من الزنك.

علاوة على ذلك، تم استخدام عملية معالجة الببتيدات بأسيل acylation of peptides وبروتينات proteins بشقوق ربط ألبومين albumin binding moieties لإطالة مدة أثر الببتيدات والبروتينات.

مع ذلك، لم تتم الإشارة إلى مشتقات إنسولين وفقا للاختراع الحالي، واستخدامها كمشتقات إنسولين سريعة المفعول للاستخدام قبل الأكل والتي لم يتم اقتراحها من قبل.

أحد أهداف الاختراع أن يقوم بتوفير نظائر إنسولين لها حالة قبل الأكل بعد الإعطاء تحت الجلد.

ثمة هدف آخر للاختراع هو توفير نظائر إنسولين مستقرة كيماويا في الصيغة.

ثمة هدف ثالث وفقا للاختراع هو توفير نظائر إنسولين مستقرة كيماويا في الصيغة بدون إضافة زنك.

ثمة هدف رابع للاختراع هو توفير نظائر إنسولين مستقرة فيزيائيا في الصيغة.

ثمة هدف خامس للاختراع هو توفير نظائر إنسولين مستقرة فيزيائيا في الصيغة بدون إضافة زنك.

ثمة هدف سادس للاختراع هو توفير نظائر إنسولين مستقرة فيزيائيا وكيميائيا في الصيغة.

ثمة هدف سابع للاختراع هو توفير نظائر إنسولين مستقرة فيزيائيا وكيميائيا في الصيغة بدون إضافة زنك.

ثمة هدف ثامن للاختراع هو توفير نظائر إنسولين مفضلة للكبد hepatopreferential نسبة إلى مركبات إنسولين المباعة حاليا والتي يتم إعطاؤها قبل الأقل بعد الإعطاء تحت الجلد.

ثمة هدف تاسع للاختراع هو توفير نظائر إنسولين انتقائية للكبد نسبة إلى مركبات إنسولين المباعة حاليا والتي يتم إعطاؤها قبل الأقل بعد الإعطاء تحت الجلد.

ثمة هدف عاشر للاختراع هو توفير نظائر إنسولين أقل ميلا إلى تحفيز نقص السكر في الدم hypoglycaemia نسبة إلى مركبات إنسولين المباعة حاليا والتي يتم إعطاؤها قبل الأقل بعد قبل الأكل الإعطاء تحت الجلد.

ثمة هدف حادي عشر للاختراع هو توفير نظائر إنسولين أقل ميلا إلى تحفيز زيادة الوزن نسبة إلى مركبات إنسولين المباعة حاليا والتي يتم إعطاؤها قبل الأقل بعد قبل الأكل الإعطاء تحت الجلد.

ثمة هدف ثاني عشر للاختراع هو توفير نظائر إنسولين أقل ميلا إلى تحفيز نقص السكر في الدم وزيادة الوزن نسبة إلى مركبات إنسولين المباعة حاليا والتي يتم إعطاؤها قبل الأقل بعد قبل الأكل الإعطاء تحت الجلد.

هناك أهداف أخرى لهذا الاختراع خاصة بتوليفات من واحد أو أكثر من الأهداف المذكورة أعلاه، وتحديدا توفير نظائر إنسولين تبدي حالة قبل الأكل بعد الإعطاء تحت الجلد، بينما تكون مستقرة كيماويا في الصيغ، وتحديدا في الصيغ بدون إضافة زنك.

الوصف العام للاختراع

لقد اكتشفنا أن مشتقات إنسولين المعالجة بأسيل A22K وفقا للاختراع الحالي لها خواص محسنة بشكل كبير نسبة إلى مشتقات إنسولين مشابهة وفقا للفن السابق. وقد اكتشفنا تحديدا أن مشتقات إنسولين وفقا للاختراع، في الصيغ لا تحتوي على أيونات زنك مضافة، وبالمقارنة بالمشتقات المشابهة وفقا للفن السابق، سوف تكون مرتبطة بحجم أصغر للجزيئات المتراكمة. هناك أنواع أصغر معروفة بأنها تنتشر بشكل أسرع من الأنواع الأكبر، وبالتالي يتوقع أن يكون لها امتصاص أسرع. يمكن مثلا قياس حجم نواتج التراكم الجزيئي كما هو موضح هنا بواسطة حيود الآشعة السينية صغير الزاوية Small Angle X-ray Scattering (SAXS) وبواسطة تنفيذ سلسلة من عمليات التخفيف مع SEC-HPLC (استبعاد حجم كروماتوجراف سائل عالي الأداء high-performance liquid chromatography (HPLC)) كما هو مبين في جزء الأمثلة.

وقد اكتشفنا أيضا أن مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع، نسبة إلى مشتقات مشابهة وفقا للفن السابق، في الصيغ التي لا تحتوي على أيونات زنك مضافة، يتم امتصاصها بشكل أسرع بعد الإعطاء تحت الجلد إلى الخنازير، وبالتالي تبين منفعة سريرية محتملة كمركبات إنسولين للاستخدام قبل الأكل. وقد اكتشفنا أن مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع، نسبة إلى مشتقات مشابهة وفقا للفن السابق، في الصيغ لا تحتوي على أيونات زنك مضافة مرتبطة بـ "بقعة الحقن tailing" بعد الإعطاء تحت الجلد إلى الخنازير. يقصد ببقعة حقن أصغر أن تكون منطقة حقن الإنسولين تحت الجلد التي يتم فيها امتصاصه بسرعة أكبر منها بالنسبة للنظائر المشابهة وفقا للفن السابق، بحيث يكون متوسط وقت البقاء mean residence time (MRT) بعد الإعطاء تحت الجلد أقصر بالنسبة لمشتقات إنسولين وفقا للاختراع مقارنة بمشتقات مشابهة معالجة بأسيل وفقا للفن السابق.

تسمح الصيغ الخالية من الزنك Zinc-free formulations بعملية امتصاص تحت الجلد أسرع، ولكن بالنسبة لمركبات إنسولين عموما، سوف يكون الثبات الكيماوي والفيزيائي للصيغ الخالية من الزنك بمثابة تحد، وقد تم توضيحه على أنه ممكن مع إنسولين جلوليسين insulin glulisine (Apidra®؛ B3K، B29E إنسولين بشري)، وفقط في وجود مواد خافضة للتوتر السطحي surfactants عند التصريف في الأوعية.

وقد اكتشفنا الآن أن هنا مجموعة فرعية من مشتقات إنسولين المعالجة بأسيل A22K وفقا للاختراع، مع مجموعات الاستبدال في الموضع B3، وهي غير متوقعة وغير مسبوعة من حيث الثبات الكيماوي والفيزيائي في الصيغ بدون إضافة أيونات زنك ولم تتم إضافة مواد خافضة للتوتر السطحي.

ثمة ميزة بواسطة استخدام مشتقات إنسولين المعالجة بأسيل كدواء الإنسولين قبل الأكل لتحقيق مستويات تركيز بلازما إنسولين plasma insulin concentrations أعلى من تلك التي يتم تحقيقها مع علاج بمركبات إنسولين غير معالجة بأسيل قبل الأكل، مثل إنسولين أسبارت، إنسولين ليسبرو أو إنسولين جلوليسين.

تتضمن مشتقات الإنسولين المعالجة بأسيل A22K وفقا للاختراع حالة تأثير زمني شبيهة بما قبل الأكل بعد الإعطاء تحت الجلد.

مشتقات الإنسولين المعالجة بأسيل A22K مع مركبات ألبومين قائمة على أساس حمض تترا ديكان داي ويك tetradecanedioic acid، حمض بنتا ديكان داي ويك pentadecanedioic acid، أو حمض هكسا ديكان داي ويك hexadecanedioic acid وفقا للاختراع قد أبدت قيم ألفة ارتباط مستقبل إنسولين عالية جدا، قيم الألفة التي تم تقليلها في وجود 1.5٪ من مصل ألبومين بشري human serum albumin (HSA).

مشتقات الإنسولين المعالجة بأسيل A22K وفقا للاختراع لا تتمتع بذوبانية مخفضة عند تركيزات ملح فسيولوجية physiological salt concentrations.

بالتالي، في الجانب الأول، يقدم الاختراع مشتقات إنسولين جديدة، مشتقات إنسولين هذه عبارة عن مشتقات معالجة بأسيل لنظائر إنسولين بشري، هذا النظائر عبارة عن [A22K، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري؛ ونظير الإنسولين هذا مشتق بواسطة معالجة مجموعة الأمينو إيبسلون epsilon amino group من وحدة الليسين البنائية بأسيل عند الموضع A22 مع مجموعة من الصيغة II

[أسيل] - [رابط] - -[Acyl]-[Linker]

حيث المجموعة الرابطة Linker group عبارة عن سلسلة حمض أميني amino acid chain مكونة من 1 إلى 10 وحدات حمض أميني بنائية تم اختيارها من -gGlu- و-OEG-؛ حيث gGlu تمثل وحدة حمض جاما جلوتاميك بنائية gamma glutamic acid residue؛ [2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل [2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethylcarbonyl (OEG) تمثل الوحدة البنائية حمض 8-أمينو-3،6-داي أوكسا أوكتانويك 8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid (أي مجموعة من الصيغة $-NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-CO-$)؛ حيث وحدات الحمض الأميني البنائية amino acid residues يمكن أن تتواجد في أي ترتيب؛ وحيث تتضمن سلسلة الحمض الأميني وحدة حمض جاما جلوتاميك بنائية واحدة على الأقل؛ و

حيث مجموعة الأسيل Acyl group عبارة عن وحدة بنائية من حمض α،ω-داي -كربوكسيلي α,ω-di-carboxylic acid تم اختيارها من حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك 1,14-tetradecanedioic acid؛ حمض 1،15-بنتا ديكان داي ويك 1,15-pentadecanedioic acid؛ وحمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك 1,16-hexadecanedioic acid؛

هذا النظير المعالج بأسيل acylated analogue، يمكن أن يتضمن بشكل إضافي مجموعات استبدال A14E، و/أو B3E أو B3Q.

في جانب أول آخر، يقدم الاختراع تركيبات صيدلانية تتضمن مشتق الإنسولين وفقا للاختراع، وواحد أو أكثر من سواغات مقبولة صيدلانيا pharmaceutically acceptable excipients.

في جانب آخر، يتعلق الاختراع باستخدام مشتق الإنسولين وفقا للاختراع كدواء.

في جانب آخر أيضا يقدم الاختراع طرق لعلاج، الوقاية من أو تخفيف أمرض، اضطرابات أو حالات مرتبطة بالسكري، السكري من النوع الأول Type 1 diabetes، السكري من النوع الثاني Type 2 diabetes، ضعف تحمل الجلوكوز impaired glucose tolerance، فرط السكر في الدم، فرط الدهون في الدم dyslipidemia، السمنة obesity، متلازمة أيضية metabolic syndrome (متلازمة أيضية X، متلازمة مقاومة الإنسولين insulin resistance syndrome)، فرط الضغط hypertension، الاضطرابات الإدراكية cognitive disorders، تصلب الشرايين atherosclerosis، ذبحة قلبية myocardial infarction، أزمة قلبية stroke، اضطرابات قلبية وعائية cardiovascular disorders، أمراض القلب التاجية coronary heart disease،

متلازمة المعدة الالتهابية inflammatory bowel syndrome، عسر الهضم dyspepsia، أو قرحة المعدة gastric ulcers، والتي تتضمن الطريقة إعطاء إلى خاضع في حاجة إليه كمية فعالة علاجيا therapeutically effective amount من مشتق الإنسولين وفقا للاختراع.

سوف تتضح أهداف أخرى وفقا للاختراع لالخبير في المجال من الوصف التفصيلي والأمثلة.

شرح مختصر للرسومات

سوف يتم شرح الاختراع الحالي أيضا بواسطة بالإشارة إلى الأشكال المصاحبة، حيث:

الشكل 1 يبين الخواص الحركية الصيدلانية (تركيزات إنسولين insulin concentrations في مقابل الزمن) من مشتق الإنسولين وفقا للمثال 1 المصاغ مع صفر زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم) في مقارنة مع حالة NovoRapid®/NovoLog® (إنسولين أسبارت insulin aspart، الصيغة التجارية، 3 زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (0.5 و1 نانومول/كجم)؛

الشكل 2 يبين نفس بيانات الشكل 1، ولكن فقط تم توضيح أول ساعتين؛

الشكل 3أ يبين نفس بيانات الشكل 1، ولكنه يبين بيانات الإنسولين وفقا للمثال 1 المصاغ مع صفر زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم) في مقارنة مع حالة NovoRapid®/NovoLog® (إنسولين أسبارت، الصيغة التجارية، 3 زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم)؛

الشكل 3ب يبين التغيرات الناتجة في جلوكوز البلازما plasma glucose الناتج من حالات الإنسولين في الشكل 3أ؛

الأشكال 4أ و4ب تبين الخواص الحركية الصيدلانية (تركيزات إنسولين في مقابل الزمن) للإنسولين وفقا للمثال 2 المصاغ مع صفر زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم) في مقارنة مع حالة NovoRapid®/NovoLog® (إنسولين أسبارت، الصيغة التجارية، 3 زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (0.5 و1 نانومول/كجم)، والتغيرات الناتجة في جلوكوز البلازما، على التوالي؛

الأشكال 5أ و5ب تبين نفس بيانات كما في الأشكال 4أ و4ب، ولكنها تبين فقط بيانات الإنسولين وفقا للمثال 2 المصاغ مع صفر زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم) في مقارنة مع حالة NovoRapid®/NovoLog® (إنسولين أسبارت، الصيغة التجارية، 3 زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم)، والتغيرات الناتجة في جلوكوز البلازما، على التوالي؛

الأشكال 6 و7 تبين الخواص الحركية الصيدلانية (تركيزات إنسولين في مقابل الزمن) للإنسولين وفقا للمثال 11 المصاغ مع صفر زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم)، والتغيرات الناتجة في جلوكوز البلازما، على التوالي؛

الأشكال 8 و9 تبين الخواص الحركية الصيدلانية (تركيزات إنسولين في مقابل الزمن) للإنسولين وفقا للمثال 44 المصاغ مع صفر زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم)، والتغيرات الناتجة في جلوكوز البلازما، على التوالي (1 نانومول/كجم)؛

الأشكال 10 و11 يبين الخواص الحركية الصيدلانية (تركيزات إنسولين في مقابل الزمن) لإنسولين وفقا للفن السابق A22K(N(eps)-هكسا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG)، B29R، desB30 إنسولين بشري (البراءة الدولية 022013/2009، المثال 45) المصاغ مع صفر زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم)، والتغيرات الناتجة في جلوكوز البلازما، على التوالي (1 نانومول/كجم)؛

الأشكال 12 و13 تبين الخواص الحركية الصيدلانية (تركيزات إنسولين في مقابل الزمن) لحمض تترا ديكان داي ويك نظير ممثل للفن السابق (البراءة الدولية 022013/2009، المثال 45، المبين في الأشكال 10 و11، المصاغ مع صفر زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (72 نانومول/حيوان)، والتغيرات الناتجة في جلوكوز البلازما، على التوالي؛

الأشكال 14أ، 14ب و14ج تبين مخططات التألق في مقابل الزمن، والتي يمكن منها توقع التأخر الزمني كفاصل بين التقارب الخطي linear approximation للتأخر المناطقي Lag Zone ومنطقة الرجفان Fibrillation Zone؛

الشكل 15 يبين حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية pharmacodynamics (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) PD/الخواص الصيدلانية الديناميكية pharmacodynamics (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) PK لمشتق الإنسولين وفقا للمثال 2 بعد حقن تحت الجلد في جرذان زوكر سمينة obese Zucker rats في غياب/وجود 170 مل مولار نيكوتيناميد nicotinamide؛

الأشكال 16-17 تبين حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) لمشتق الإنسولين وفقا للمثال 7 بعد حقن تحت الجلد في جرذان زوكر سمينة في غياب/وجود 170 مل مولار نيكوتيناميد؛

الأشكال 18–19 تبين حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) لمشتق الإنسولين وفقا للمثال 7 بعد حقن تحت الجلد في جرذان زوكر سمينة في غياب/وجود 170 مل مولار نيكوتيناميد؛ و

الأشكال 20–21 تبين حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) لمشتق الإنسولين وفقا للمثال 4 بعد حقن تحت الجلد في جرذان زوكر سمينة في غياب/وجود 170 مل مولار نيكوتيناميد.

<u>الوصف التفصيلي:</u>

مشتقات إنسولين

في الجانب الأول، يقدم الاختراع الحالي مشتقات إنسولين جديدة، مشتق الإنسولين هذا عبارة عن نظائر معالجة بأسيل من إنسولين بشري.

يمكن تحديد وصف مشتق الإنسولين وفقا للاختراع تحديدا بنظير معالج بأسيل من إنسولين بشري، هذا النظير عبارة عن [A22K، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري؛

ونظير الإنسولين هذا مشتق بواسطة معالجة مجموعة الأمينو إيبسلون epsilon amino group من وحدة الليسين البنائية بأسيل عند الموضع A22 مع مجموعة من الصيغة II

[أسيل] - [رابط] -

حيث المجموعة الرابطة عبارة عن سلسلة حمض أميني مكونة من 1 إلى 10 وحدات حمض أميني بنائية تم اختيارها من -حمض جاما جلوتاميك- و-[2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل-؛ حيث حمض جاما جلوتاميك تمثل وحدة حمض جاما جلوتاميك بنائية؛ [2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل تمثل الوحدة البنائية حمض 8-أمينو-3،6-داي أوكسا أوكتانويك (أي مجموعة من الصيغة $-NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-CO-$)؛ حيث وحدات الحمض الأميني البنائية يمكن أن تتواجد في أي ترتيب؛ وحيث تتضمن سلسلة الحمض الأميني وحدة حمض جاما جلوتاميك بنائية واحدة على الأقل؛ و

حيث مجموعة الأسيل عبارة عن وحدة بنائية من حمض α،ω-داي -كربوكسيلي تم اختيارها من حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك؛ حمض 1،15-بنتا ديكان داي ويك؛ وحمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك.

مشتق الإنسولين وفقا للاختراع يمكن أن يتضمن بشكل إضافي مجموعات استبدال A14E، و/أو B3E أو B3Q.

في أحد النماذج، نظير الإنسولين البشري عبارة عن [A14E، A22K، B3E، desB27، B29R، desB30] ؛ [A14E، A22K، desB27، B29R، desB30] ؛ [A22K، B3E، desB27، B29R، desB30] ؛ [A22K، B3Q، desB27، B29R، desB30] ؛ أو [A22K، desB27، B29R، desB30] ؛ نسبة إلى إنسولين بشري؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

في نموذج آخر، نظير الإنسولين البشري عبارة عن [A22K، desB27، B29R، desB30]، نسبة إلى إنسولين بشري؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

في نموذج ثالث، نظير الإنسولين البشري عبارة عن [A22K، B3E، desB27، B29R، desB30]، نسبة إلى إنسولين بشري؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

في نموذج رابع، نظير الإنسولين البشري عبارة عن [A22K، B3Q، desB27، B29R، desB30]، نسبة إلى إنسولين بشري؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

في نموذج خامس، نظير الإنسولين البشري عبارة عن [A14E، A22K، desB27، B29R، desB30]، نسبة إلى إنسولين بشري؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

في نموذج سادس، نظير الإنسولين البشري عبارة عن [A14E، A22K، B3E، desB27، B29R، desB30]، نسبة إلى إنسولين بشري؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

كما هو مبين أعلاه، نظير الإنسولين مشتق بواسطة معالجة مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية بأسيل عند الموضع A22 مع مجموعة من الصيغة II، كما هو مبين أعلاه، أي بديل يحمل مجموعة أسيل مرتبطة بمجموعة ربط linking group.

في سياق هذا الاختراع مجموعة الربط وفقا للصيغة II عبارة عن سلسلة حمض أميني مكونة من 1 إلى 10 وحدات حمض أميني بنائية تم اختيارها من -حمض جاما جلوتاميك- و-[2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل-.

في أحد النماذج، مجموعة الربط وفقا للصيغة II عبارة عن سلسلة حمض أميني مكونة من 1 إلى 7 وحدات حمض أميني بنائية تم اختيارها من -حمض جاما جلوتاميك- و-[2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل-، تتضمن من 1 إلى 4 وحدات حمض جاما جلوتاميك بنائية ومن صفر إلى 3 وحدات [2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل بنائية.

في نموذج آخر، يتم اختيار مجموعة الربط وفقا للصيغة II من -حمض جاما جلوتاميك-؛ -2xgGlu-؛ -3xgGlu-؛ -4xgGlu-؛ -gGlu-2xOEG-؛ -gGlu-3x(OEG-gGlu)-؛ -4xgGlu-2xOEG-؛ -2xOEG-؛ و-gGlu-2xOEG-.

في نموذج ثالث، مجموعة الربط وفقا للصيغة II عبارة عن -حمض جاما جلوتاميك-.

في نموذج رابع، مجموعة الربط وفقا للصيغة II عبارة عن -2xgGlu-.

في نموذج خامس، مجموعة الربط وفقا للصيغة II عبارة عن -3xgGlu-.

في نموذج سادس، مجموعة الربط وفقا للصيغة II عبارة عن -4xgGlu-.

في نموذج سابع، مجموعة الربط وفقا للصيغة II عبارة عن -gGlu-2xOEG-.

في نموذج ثامن، مجموعة الربط وفقا للصيغة II عبارة عن -gGlu-3x(OEG-gGlu)-.

في نموذج تاسع، مجموعة الربط وفقا للصيغة II عبارة عن -4xgGlu-2xOEG-.

في نموذج عاشر، مجموعة الربط وفقا للصيغة II عبارة عن -2xOEG-.

في نموذج حادي عشر، مجموعة الربط وفقا للصيغة II عبارة عن -gGlu-2xOEG-.

في سياق هذا الاختراع مجموعة الأسيل وفقا للصيغة II is مشتق من حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك؛ حمض 1،15-بنتا ديكان داي ويك؛ أو حمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك.

في أحد النماذج، مجموعة الأسيل وفقا للصيغة II is مشتق من حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك (أي 1،14-تترا ديكان داي ول 1,14-tetradecanedioyl).

في نموذج آخر، مجموعة الأسيل وفقا للصيغة II is مشتق من حمض 1،15-بنتا ديكان داي ويك (أي 1،15-بنتا ديكان داي ول 1,15-pentadecanedioyl).

في نموذج ثالث، مجموعة الأسيل وفقا للصيغة II عبارة عن مشتق من حمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك (أي 1،16-هكسا ديكان داي ول 1,16-hexadecanedioyl).

في نموذج آخر، المجموعة من الصيغة II، كما هو مبين أعلاه، عبارة عن تترا ديكان داي ول-حمض جاما جلوتاميك-؛ تترا ديكان داي ول-2xgGlu-؛ تترا ديكان داي ول-3xgGlu-؛ تترا ديكان داي ول-4xgGlu-؛ تترا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG-؛ تترا ديكان داي ول-4xgGlu-2xOEG-؛ تترا ديكان داي ول-2xOEG-؛ بنتا ديكان داي ول-4xgGlu؛ هكسا ديكان داي ول-4xgGlu-؛ هكسا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG-؛ أو هكسا ديكان داي ول-gGlu-3x(gGlu-OEG).

في نموذج آخر، المجموعة من الصيغة II عبارة عن تترا ديكان داي ول-حمض جاما جلوتاميك-.

في نموذج ثالث، المجموعة من الصيغة II عبارة عن تترا ديكان داي ول-2xgGlu-.

في نموذج رابع، المجموعة من الصيغة II عبارة عن تترا ديكان داي ول-3xgGlu-.

في نموذج خامس، المجموعة من الصيغة II عبارة عن تترا ديكان داي ول-4xgGlu-.

في نموذج سادس، المجموعة من الصيغة II عبارة عن تترا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG-.

في نموذج سابع، المجموعة من الصيغة II عبارة عن تترا ديكان داي ول-2xOEG-.

في نموذج ثامن، المجموعة من الصيغة II عبارة عن تترا ديكان داي ول-4xgGlu-2xOEG-.

في نموذج تاسع، المجموعة من الصيغة II عبارة عن بنتا ديكان داي ول-4xgGlu-.

في نموذج عاشر، المجموعة من الصيغة II عبارة عن هكسا ديكان داي ول-4xgGlu-.

في نموذج حادي عشر، المجموعة من الصيغة II عبارة عن هكسا ديكان داي ول--gGlu-2xOEG-.

في نموذج ثاني عشر، المجموعة من الصيغة II عبارة عن هكسا ديكان داي ول--3x(gGlu-gGlu-OEG).

يمكن أن يكون مشتق الإنسولين وفقا للاختراع تحديدا عبارة عن واحد من من المجموعة التي تتكون من

A22K(N(eps)-تترا ديكان داي ول-4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A14E، A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-3x(gGlu-OEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-3x(gGlu-OEG)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ول-(2xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-3x(gGlu-OEG)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ول-حمض جاما جلوتاميك)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

desB30 ،B29R ،desB27 ،B3Q ،(gGlu-2xOEG-ول-تترا ديكان داي (eps)N)A22K

إنسولين بشري؛

desB30 إنسولين بشري؛ ،B29R ،desB27 ،(2xOEG-ول-تترا ديكان داي (eps)N)A22K

desB30 ،B29R ،desB27 ،B3Q ،(4xgGlu-ول-هكسا ديكان داي (eps)N)A22K

إنسولين بشري؛

desB30 إنسولين بشري؛ ،B29R ،desB27 ،B3E ،(4xgGlu-ول-بنتا ديكان داي (eps)N)A22K

بشري؛

desB30 ،B29R ،desB27 ،(4xgGlu-2xOEG-ول-تترا ديكان داي (eps)N)A22K

إنسولين بشري؛

B29R ،desB27 ،B3E ،(4xgGlu-2xOEG-ول-تترا ديكان داي (eps)N)A22K

desB30 إنسولين بشري؛

B29R ،desB27 ،B3E ،(gGlu-2xOEG-ول-تترا ديكان داي (eps)N)A22K ،A14E

desB30 إنسولين بشري؛

desB30 ،B29R ،desB27 ،B3E ،(4xgGlu-ول-تترا ديكان داي (eps)N)A22K ،A14E

إنسولين بشري؛

desB30 إنسولين بشري؛ ،B29R ،desB27 ،B3E ،(2xgGlu-ول-تترا ديكان داي (eps)N)A22K

بشري؛

desB30 إنسولين بشري؛ ،B29R ،desB27 ،B3E ،(gGlu-ول-تترا ديكان داي (eps)N)A22K

بشري؛ و

desB30 إنسولين بشري. ،B29R ،desB27 ،B3E ،(3xgGlu-ول-تترا ديكان داي (eps)N)A22K

الخواص المفضل للمركبات الخاصة بالاختراع

يمكن وصف الاختراع الحالي بواسطة بالإشارة إلى واحد أو أكثر من الخواص التالية:

1. نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري، هذا النظير عبارة عن [A22K، desB27، B29R، desB30] ؛ ونظير الإنسولين هذا اختياريا مستبدل بـ A14E، و/أو B3E، أو B3Q؛ وتتم معالجة

نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

2. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 1، هذا النظير عبارة عن [A22K، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري؛ ونظير الإنسولين هذا مستبدل بـ B3E، أو B3Q؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

3. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 1، هذا النظير عبارة عن [A22K، B3E، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

4. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 1، هذا النظير عبارة عن [A22K، B3Q، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

5. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 1، هذا النظير عبارة عن [A14E، A22K، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

6. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 1، هذا النظير عبارة عن [A14E، A22K، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري؛ ونظير الإنسولين هذا مستبدل بـ B3E أو B3Q؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

7. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 1، هذا النظير عبارة عن [A14E، A22K، B3E، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري؛ وتتم معالجة نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية عند الموضع A22.

8. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 1، هذا النظير عبارة عن [A22K، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري؛ ونظير الإنسولين هذا مشتق بواسطة معالجة مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية بأسيل عند الموضع A22 مع مجموعة من الصيغة II

[أسيل] - [رابط] -

حيث المجموعة الرابطة عبارة عن سلسلة حمض أميني مكونة من 1 إلى 10 وحدات حمض أميني بنائية تم اختيارها من -حمض جاما جلوتاميك- و-[2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل-؛ حيث

حمض جاما جلوتاميك تمثل وحدة حمض جاما جلوتاميك بنائية؛ و

[2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل تمثل الوحدة البنائية حمض 8-أمينو-3،6-داي أوكسا أوكتانويك (أي مجموعة من الصيغة $-NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-CO-$؛

حيث وحدات الحمض الأميني البنائية يمكن أن تتواجد في أي ترتيب؛ و

حيث تتضمن سلسلة الحمض الأميني وحدة حمض جاما جلوتاميك بنائية واحدة على الأقل؛ و

حيث مجموعة الأسيل عبارة عن وحدة بنائية من حمض α،ω-داي -كربوكسيلي تم اختيارها من

حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك؛

حمض 1،15-بنتا ديكان داي ويك؛ و

حمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك؛

هذا النظير المعالج بأسيل، يمكن أن يتضمن بشكل إضافي مجموعات استبدال A14E، و/أو B3E أو B3Q.

9. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الأسيل عبارة عن مجموعة حمض ثنائي di-acid group مشتق من حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك؛ حمض 1،15-بنتا ديكان داي ويك؛ أو حمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك.

10. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الأسيل عبارة عن مجموعة حمض ثنائي مشتق من حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك أو حمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك.

11. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الأسيل عبارة عن مجموعة حمض ثنائي مشتق من حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك.

12. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الأسيل عبارة عن مجموعة حمض ثنائي مشتق من حمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك.

13. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الأسيل عبارة عن مجموعة حمض ثنائي مشتق من حمض 1،15-بنتا ديكان داي ويك.

14. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن 1-10 وحدات حمض جاما جلوتاميك بنائية.

15. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن 1-8 وحدات حمض جاما جلوتاميك بنائية.

16. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن 1-6 وحدات حمض جاما جلوتاميك بنائية.

17. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن 1-4 وحدات حمض جاما جلوتاميك بنائية.

18. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن 1-3 وحدات حمض جاما جلوتاميك بنائية.

19. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن 1-2 وحدات حمض جاما جلوتاميك بنائية.

20. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن وحدة حمض جاما جلوتاميك بنائية واحدة.

21. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن اثنين من وحدات حمض جاما جلوتاميك بنائية.

22. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن ثلاثة من وحدات حمض جاما جلوتاميك بنائية.

23. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن أربعة من وحدات حمض جاما جلوتامي بنائية.

24. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن 1-6 وحدات [2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل بنائية.

25. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن 1-4 وحدات [2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل بنائية.

26. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن 1-3 وحدات [2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل بنائية.

27. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن وحدة [2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل بنائية واحدة.

28. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن اثنين من وحدات [2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل بنائية.

29. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط تتضمن ثلاثة من وحدات [2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل بنائية.

30. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث مجموعة الربط لا تتضمن وحدات [2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل بنائية.

31. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث يتم اختيار مجموعة الربط من -حمض جاما جلوتاميك-؛ -2xgGlu-؛ -3xgGlu-؛ --gGlu-3x(OEG-Glu)؛ -4xgGlu-؛ -2xOEG-؛ --4xgGlu-2xOEG-؛ -gGlu-2xOEG-؛ و--gGlu-2xOEG-.

32. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث يتم اختيار مجموعة الربط من -حمض جاما جلوتاميك؛ -gGlu-3x(OEG-gGlu)-؛ و-gGlu-2xOEG-gGlu-.

33. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث يتم اختيار مجموعة الربط من -حمض جاما جلوتاميك-؛ -2xgGlu-؛ و-4xgGlu-.

34. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث المجموعة من الصيغة II [أسيل] - [رابط] - عبارة عن تترا ديكان داي ول-حمض جاما جلوتاميك-؛ تترا ديكان داي ول-2xgGlu-؛ تترا ديكان داي ول-3xgGlu-؛ تترا ديكان داي ول-4xgGlu-؛ تترا ديكان داي ول--gGlu-2xOEG-؛ تترا ديكان داي ول-2xOEG-؛ تترا ديكان داي ول-4xgGlu-2xOEG-؛ هكسا ديكان داي ول-4xgGlu-؛ هكسا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG-؛ أو هكسا ديكان داي ول-gGlu-3x(gGlu-OEG)-.

35. النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للعبارة 7، حيث المجموعة من الصيغة II [أسيل] - [رابط] - عبارة عن تترا ديكان داي ول-حمض جاما جلوتاميك-؛ تترا ديكان داي ول-2xgGlu-؛

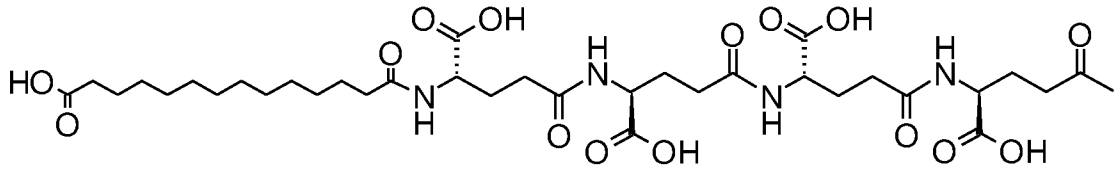
تترا ديكان داي ول-4xgGlu-؛ تترا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG-؛ أو تترا ديكان داي ول-2xOEG-؛ هكسا ديكان داي ول-4xgGlu-؛ هكسا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG-؛ أو هكسا ديكان داي ول-gGlu-3x(gGlu-OEG)-.

هنا، تتم تسمية مركبات إنسولين وفقا للمبادئ التالية:

يتم استخدام المصطلح "نظير" بشكل متكرر لبروتين أو ببتيد peptide إنسولين محل الاستفهام قبل أن تخضع إلى المزيد من التعديلات الكيماوية chemical modification (الاشتقاق derivatisation)، وتحديدا المعالجة بأسيل acylation. عادة ما تتم تسمية المنتج الناتج عن عملية التعديل الكيماوي (الاشتقاق) بـ "مشتق" أو "نظير معالج بأسيل". مع ذلك، في سياق هذا الطلب، يشير المصطلح "نظير" نظائر من إنسولين بشري بالإضافة إلى مشتقات (معالج بأسيل) من نظائر إنسولين بشري هذه.

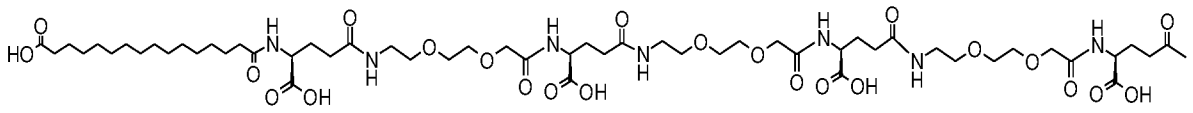
يتم إعطاء الأسماء بنظائر، مشتقات وتعديلات (عمليات المعالجة بأسيل acylations) نسبة إلى إنسولين بشري. لتسمية شق أسيل acyl moiety (أي المجموعة [أسيل] - [رابط] - من الصيغة II)، في بعض الحالات تتم التسمية وفقا لتسمية آى يو بى أيه سى IUPAC، وفي حالات أخرى في حالات أخرى تتم التسمية كتسمية ببتيدية.

كمثال، شق الأسيل للبنية التالية (Chem.1):



يمكن تسميته "تترا ديكان داي ول-4xgGlu"، "تترا ديكان داي ول-4xγGlu" أو، "1،14-تترا ديكان داي ول-4xgGlu" أو ما شابه، حيث γGlu (و حمض جاما جلوتاميك) عبارة عن تسمية مختصرة لحمض أميني جاما جلوتاميك في التهيئة L-، و"4x" تعني أن الوحدة البنائية التالية متكررة 4 مرات.

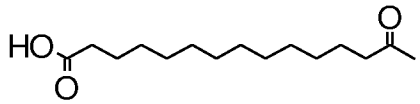
بشكل مشابه، شق الأسيل للبنية التالية (Chem.2):



يمكن مثلا تسميتها "هكسا ديكان داي ول-3(gGlu-(gGlu-OEG)"، "هكسا ديكان داي ول-3(gGlu-(gGlu-OEG)"، "هكسا ديكان داي ول-gGlu-3x(gGlu-OEG)"، "1،16-هكسا

ديكان داي ول-3(gGlu-(gGlu-OEG)"، "1،16-هكسا ديكان داي ول-3(gGlu-OEG)-gGlu)"، "1،16-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-3x(gGlu-OEG)"، "هكسا ديكان داي ول-(γGlu-3(OEG-γGlu)"، "هكسا ديكان داي ول-(γGlu-3(OEG-γGlu)"، أو "هكسا ديكان داي ول-3x(γGlu-(OEG-γGlu)"؛

حيث شق البنية التالية (Chem.3):



يمكن أن تتم تسميته تترا ديكان داي ول، 1،14-تترا ديكان داي ول أو (تسمية مختصرة) حمض C14 ثنائي. يتم تطبيق التسميات المشابهة لوحدات بنائية مشابهة مع 15 و16 ذرات الكربون carbon atoms، بنتا ديكان داي ول، حمض C15 ثنائي C15 diacid، وهكسا ديكان داي ول، حمض C16 ثنائي، على التوالي.

γGlu (وحمض جاما جلوتاميك) عبارة عن تسمية مختصرة للحمض أميني جاما جلوتاميك في التهيئة-L.

[2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل عبارة عن تسمية مختصرة لوحدة حمض أميني بنائية حمض 8-أمينو-3،6-داي أوكسا -أوكتانويك، $NH_2(CH_2)_2O(CH_2)_2OCH_2CO_2H$.

"2x" و"3x"يعني أن الوحدات البنائية التالي يتم تكرارها مرتين، على التوالي، 3 مرات.

مثلا، يسمى مشتق الإنسولين وفقا للمثال 1 "A22K(eps)N-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري" للإشارة إلى أن السلسلة A، التي تحتوي على 21 وحدة حمض أميني بنائية في إنسولين بشري، قد تم مدها بواسطة 1 حمض أميني (الموضع A22)، مع ليسين lysine (K)، الذي يتم تعديله بواسطة المعالجة بأسيل على نيتروجين إيبسلون epsilon nitrogen في وحدة الليسين البنائية لـ A22، المسماة N^{ε} ((eps)N or) بواسطة الشق تترا ديكان داي ول-4xgGlu، وقد تم حذف الحمض الأميني في الموضع B27، T في إنسولين بشري، وتم استبدال الحمض الأميني في الموضع B29، K في إنسولين بشري، بأرجينين arginine، R، تم حذف الحمض الأميني في الموضع B30، ثريونين threonine، ثيوفلافين T Thioflavin، في إنسولين بشري. تشير مركبات Asterisks في الصيغة أدناه إلى أن الوحدة البنائية محل الاستفهام مختلفة (أي مستبدلة) مقارنة بإنسولين بشري.

خلال هذا الطلب، يتم تحديد كل من الصيغة وأسماء المركبات المفضلة من إنسولين وفقا للاختراع.

علاوة على ذلك، تتم تسمية مركبات إنسولين وفقا للاختراع وفقا لتسميات IUPAC (OpenEye، طريقة IUPAC). وفقا لهذه الطريقة، تتسم تسمية مشتق الإنسولين وفقا للمثال 1 الاسم التالي: N{ألفا}([ArgB29] [ArgB29])N{Alpha}، des-ThrB27،ThrB30-إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [(S4)-4-كربوكسي -4-] [(S4)-4-كربوكسي -4-] [(S4)-4-كربوكسي -4-] [(S4)-4-كربوكسي-13-(4-كربوكسي [(S4)-] أمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] Lys -(human)Insulin-des-ThrB27,ThrB30 [(4S)-4-carboxy-4-[[(4S)-4-carboxy-4-[[(4S)-4-carboxy-4-[[(4S)-4-carboxy-4-(13-carboxytridecanoylamino)butanoyl]-(A)-peptidyl)-N{Epsilon} amino]butanoyl]amino]butanoyl]amino]butanoyl]Lys ببتيد-(B)،amino]butanoyl]amino]butanoyl]amino]butanoyl]Lys-(B)-peptide.

يجب ملاحظة أن الصيغ يمكن كتابتها مع وحدة الليسين البنائية lysine residue (التي يتم تعديلها بواسطة المعالجة بأسيل) إما مرسومة مع وحدة الليسين البنائية ممتدة (كما هو مبين مثلا في المثال 23) أو مرسومة مع وحدة الليسين البنائية المتصلة (كما هو مبين مثلا في المثال 1). في كل الحالات يتم إلحاق مجموعة الأسيل بنيتروجين إيبسلون من وحدة الليسين البنائية.

للاكتمال، يمكن ذكر أن حذف الوحدة البنائية في الموضع B27 (desB27) يؤدي إلى حركة (شكلية) في وحدات الحمض الأميني البنائية المتبقية تجاه الطرف N- بواسطة وحدة بنائية واحدة. بالتالي، يمكن تسمية هذا النظير B27P، B28R، desB29-30، حيث أن الوحدة البنائية في الموضع B28 عبارة عن برولين proline والوحدة البنائية في الموضع B29 عبارة عن أرجينين (انظر مثلا المركب وفقا للمثال 1). وهذا بسبب حذف B27، بعد ذلك يقوم الحمض الأميني التالي في المتوالية بإزاحة المكان وبالتالي تتم إزاحة الحمض الأميني في الموضع B28 (برولين) إلى الموضع B27.

الثبات الفيزيائي

يشير المصطلح "الثبات الفيزيائي" لمستحضر الانسولين insulin preparation المستخدم هنا إلى ميل البروتين إلى تكوين رواكم غير نشطة بيولوجيا و/أو غير قابلة للذوبان من البروتين كنتيجة

لتعرض البروتين إلى ضغوط ميكانيكية حرارية thermo-mechanical stresses و/أو التفاعل مع الواجهات البينية interfaces والأسطح التي تكون غير مستقرة، مثل الأسطح الكارهة للماء hydrophobic surfaces والأسطح البينية. يتم تقييم الثبات الفيزيائي لمستحضرات البروتين المائية aqueous protein preparations بواسطة الفحص البصري و/أو قياسات العكارة بعد تعريض المستحضر المملوء في حاويات مناسبة (مثلا الخراطيش cartridges أو الأوعية) للضغط الميكانيكي/الفيزيائي mechanical/physical stress (مثلا الإثارة) عند درجات حرارة مختلفة لفترات زمنية مختلفة. يتم تنفيذ الفحص البصري للمستحضرات في صورة ضوء حادة مركز sharp focused light مع خلفية داكنة. يتم تصنيف المستحضر بكونه غير مستقر فيزيائيا نسبة إلى تراكمات بروتين protein aggregation، عندما تبدي عكارة بصرية في ضوء النهار. بشكل بديل، يمكن تقييم عكارة المستحضر بواسطة قياسات العكارة البسيطة المعروفة للشخص الخبير. يمكن أيضا تقييم الثبات الفيزيائي لمستحضرات البروتين المائية باستخدام عامل طيفي spectroscopic agent أو مسبار probe للحالة التوافقية للبروتين. بشكل مفضل يفضل أن يكون المسبار بشكل مفضل عبارة عن جزيء صغير يرتبط بشكل مفضل بجزيء متوافق غير أصلي للبروتين non-native conformer of protein. ثمة مثال واحد لمسبار الجزيء الصغير الطيفي small molecular spectroscopic probe لبنية البروتين protein structure عبارة عن ثيوفلافين T. ثيوفلافين T عبارة عن صبغة متألقة fluorescent dye والتي تم استخدامها بشكل شائع للكشف عن الألياف النشوانية amyloid fibrils. في وجود الشعيرات fibrils، ويمكن أن تكون هناك تهيئات بروتينية protein configurations أخرى أيضا، ينتج ثيوفلافين T عن إثارة جديدة قصوى عند حوالي 450 نانومتر وانبعاث محسن enhanced emission عند حوالي 482 نانومتر عند الارتباط بصورة بروتين ليفي fibril protein. ثيوفلافين T غير المربوط بشكل أساسي غير متألق في الأطوال الموجية wavelengths.

الثبات الكيماوي

المصطلح "الثبات الكيماوي chemical stability" للمستحضر البروتيني protein preparation المستخدم هنا يشير إلى التغيرات في بنية البروتين التساهمية covalent protein structure التي

تؤدي إلى تكوين منتجات تدهور كيماوي chemical degradation products لها قدرة بيولوجية biological potency أقل و/أو خواص مناعية متزايدة محتملة مقارنة ببنية البروتين الأصلي native protein structure. هناك العديد من منتجات التدهور الكيماوي المختلفة التي يمكن أن يتم تكوينها بناء على نوع وطبيعة البروتين الأصلي والبيئة التي يتعرضها لها البروتين. غالبا ما تتم رؤية كميات متزاية من منتجات التدهور الكيماوي أثناء التخزين واستخدام المستحضر البروتيني. أغلب البروتينات عرضة لنزع الأميد deamidation، هناك عملية حيث مجموعة أميد السلسلة الجانبية side chain amide group في وحدات بنائية من جلوتامينيل glutaminyl أو أسباراجينيل asparaginyl تتم هدرلتها لتكوين حمض كربوكسيلي حر free carboxylic acid أو وحدات أسباراجينيل بنائية asparaginyl residues لتكوين مشتق isoAsp. تتضمن مسارات تدهور degradations pathways أخرى لمنتجات ذات وزن جزيئي عالي حيث يرتبط اثنين من أو أكثر الجزيئات البروتينية protein molecules بشكل تساهمي ببعضها البعض خلال عمليات المعالجة بأميد الانتقالية و/أو تفاعلات داي سلفيد disulfide interactions التي تؤدي إلى تكوين دايمر وأوليجومر oligomer وبوليمر مرتبط تساهميا (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern TJ & Manning MG, Plenum Press, New York 1992). يمكن ذكر الأكسدة Oxidation (مثلا لوحدات بنائية من ميثيونين methionine residues) كصورة مغايرة للتدهور الكيماوي. يمكن تقييم عملية الثبات الكيماوي للمستحضر البروتيني بواسطة قياس كمية منتجات التدهور الكيماوي عند نقاط زمنية مختلفة بعد التعرض للحالات البنائية المختلفة (يمكن تسارع عمليات تكوين منتجات التدهور غالبا بواسطة زيادة درجة الحرارة). غالبا ما يتم تحديد كمية كل منتج تدهور فردي بواسطة فصل منتجات التدهور التي تعتمد على حجم الجزيء و/أو الكراهية للماء و/أو الشحن باستخدام تقنيات كروماتوجراف chromatography techniques (مثلا SEC-HPLC و/أو RP-HPLC). حيث تكون منتجات بروتين ذو وزن وزن جزيئي عالي high molecular weight protein (HMWP) مستمنعة وليست نشطة حيويا، وهناك مستويات منخفضة مفيدة من بروتين ذو وزن وزن جزيئي عالي .

طرق التخليق

يمكن الحصول على مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع بواسطة طرق تقليدية لمستحضر من إنسولين، نظائر إنسولين ومشتقات إنسولين، وتحديدا الطرق الموضحة في أمثلة التشغيل.

في أحد النماذج، يتم الحصول على مشتق الإنسولين وفقا للاختراع بواسطة معالجة مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية بأسيل عند الموضع A22 مع مجموعة من الصيغة II والتي هي عن تترا ديكان داي ول-4xgGlu.

في نموذج آخر، يتم الحصول على مشتق الإنسولين وفقا للاختراع بواسطة معالجة مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية بأسيل عند الموضع A22 عند رقم هيدروجيني عالي، وتحديدا عند رقم هيدروجيني في نطاق من 9.5 إلى 13، مع مجموعة من الصيغة II والتي هي عبارة عن تترا ديكان داي ول-4xgGlu.

بشكل أكثر تحديدا يتم الحصول على مشتق الإنسولين وفقا للاختراع بواسطة معالجة مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية بأسيل عند الموضع A22 مع المركب حمض (S)-2-((S)-4-كربوكسي -4-{(S)-4-كربوكسي -4- [(S)-4-كربوكسي -4-(13-كربوكسي -تراي ديكانويل أمينو)-بيوتيريل أمينو] -بيوتيريل أمينو}-بيوتيريل أمينو)-بنتان داي ويك 5-(2،5-داي أوكسو -بيروليدين-1-يل) إستر (S)-4-[(S)-4-carboxy-4-{(S)-4-Carboxy-4-((S)-2-(S)-carboxy-4-(13-carboxy-tridecanoylamino)-butyrylamino]-butyrylamino}-butyrylamino)-pentanedioic acid 5-(2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl) ester (أو المسماة بشكل بديل تترا ديكان داي ول-OSu-4xgGlu) (Chem.4).

في نموذج آخر يتم الحصول على مشتق الإنسولين وفقا للاختراع بواسطة معالجة مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية بأسيل عند الموضع A22 مع المركب حمض 14- [[(S1)-1-كربوكسي -4- [2- [2- [2- [2- [2-(2،5-داي أوكسو بيروليدين-1-يل)أوكسي -2-أوكسو إيثوكسي] إيثوكسي] إيثيل أمينو] -2-أوكسو إيثوكسي] إيثوكسي] إيثيل أمينو] -4-أوكسو بيوتيل] أمينو] -14-أوكسو تترا ديكانويك -2]-2]-2]-2]-2]-2]-4-carboxy-1-(1S)]]-14-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy-2-oxoethoxy]ethoxy]ethylamino]-2-oxoethoxy]ethoxy]ethylamino]-4-oxobutyl]amino]-14-oxotetradecanoic acid (أو المسماة بشكل بديل تترا ديكان داي ول-OSu-gGlu-2xOEG) (Chem.5).

الخواص المفضلة لتخليق مركبات الاختراع

يمكن وصف الاختراع الحالي بواسطة بالإشارة إلى واحد أو أكثر من الخواص التالية:

1. المركب حمض (S)-2-((S)-4-كربوكسي -4-{(S)-4-كربوكسي -4- [(S)-4-كربوكسي -4-(13-كربوكسي -تراي ديكانويل أمينو)-بيوتيريل أمينو] -بيوتيريل أمينو}-بيوتيريل أمينو)-بنتان داي ويك 5-(2،5-داي أوكسو -بيروليدين-1-يل) إستر (أو المسماة بشكل بديل تترا ديكان داي ول-OSu-4xgGlu) (Chem.4)، للاستخدام في عملية المعالجة بأسيل acylation process كمركب وسيط intermediate في عملية التخليق من مشتق الإنسولين وفقا للاختراع.

2. المركب حمض 14- [[(S1)-1-كربوكسي -4- [2- [2- [2- [2- [2-(2،5-داي أوكسو بيروليدين-1-يل)أوكسي -2-أوكسو إيثوكسي] إيثوكسي] إيثيل أمينو] -2-أوكسو إيثوكسي] إيثوكسي] إيثيل أمينو] -4-أوكسو بيوتيل] أمينو] -14-أوكسو تترا ديكانويك (أو المسماة بشكل بديل تترا ديكان داي ول-OSu-gGlu-2xOEG) (Chem.5)، للاستخدام في عملية المعالجة بأسيل كمركب وسيط في عملية التخليق من مشتق الإنسولين وفقا للاختراع.

3. مركب وفقا لأي من العبارات 1-2 للاستخدام كمركب وسيط مركب في عملية التخليق من مشتق إنسولين، مشتق الإنسولين هذا عبارة عن نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري، هذا النظير يحمل التطفر A22K نسبة إلى إنسولين بشري، وعند هذا الموضع يتم معالجة المركب وفقا لأي من العبارات 1-2 بأسيل.

4. مركب وفقا لأي من العبارات 1-2 للاستخدام كمركب وسيط مركب في عملية التخليق من مشتق إنسولين، مشتق الإنسولين هذا عبارة عن نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري، هذا النظير عبارة عن [A22K، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري، وهذا النظير معالج بأسيل في الموضع A22K مع مركب وفقا لأي من العبارات 1-2.

5. مركب وفقا لأي من العبارات 1-2 للاستخدام كمركب وسيط مركب في عملية التخليق من مشتق إنسولين، مشتق الإنسولين هذا عبارة عن نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري، هذا النظير عبارة عن [A22K، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري، وهذا النظير المعالج بأسيل

يمكن أن يتضمن بشكل إضافي مجموعات الاستبدال A14E، و/أو B3E أو B3Q، وهذا النظير معالج بأسيل في الموضع A22K مع مركب وفقا لأي من العبارات 1-2.

6. المركب وفقا للعبارة 1 للاستخدام كمركب وسيط مركب في عملية تخليق

A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A14E، A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-4xgGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-4xgGlu-2xOEG)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-4xgGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛ *أو*

A14E، A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري.

النشاط البيولوجي

في جانب آخر يقدم الاختراع مشتقات إنسولين جديدة للاستخدام كأدوية، أو للاستخدام في تصنيع أدوية أو تركيبات صيدلانية.

وقد وجد أن مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع عبارة عن مشتقات إنسولين قصيرة وسريعة الأثر التي يتم اعتبارها مناسبة للاستخدام قبل الأكل.

تضمنت مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع قيم ألفة مستقبل إنسولين insulin receptor affinities مناسبة لتنشيط مستقبل الإنسولين لإعطاء الاستجابة الخاصة بالسيطرة على سكر الدم المطلوبة، أي المعين بكونه قادر على تقليل جلوكوز الدم blood glucose في الحيوانات والبشر.

وقد وجد أن مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع تتضمن مستقبل إنسولين متوازن balanced insulin receptor (IR) إلى نسبة ألفة (مستقبل إنسولين/لمستقبل 1 لعامل النمو الشبيه بإنسولين) لمستقبل 1 لعامل النمو الشبيه بإنسولين insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R).

في أحد الجوانب، إنسولين A22K المعالج بأسيل وفقا للاختراع لها نسبة مستقبل إنسولين/لمستقبل 1 لعامل النمو الشبيه بإنسولين أكبر من 0.3؛ أكبر من 0.4؛ أكبر من 0.5؛ أكبر من 0.6؛ أكبر من 0.7؛ أكبر من 0.8؛ أكبر من 0.9؛ أكبر من 1؛ أكبر من 1.5؛ أو أكبر من 2.

في جانب آخر، نظير الإنسولين A22K المعالج بأسيل عبارة عن مركب وفقا للاختراع، حيث مجموعة الأسيل من الصيغة II عبارة عن مشتق من حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك، وحيث نظير الإنسولين المعالج بأسيل له متوسط وقت بقاء أقل من 250 دقيقة؛ أقل من 200 دقيقة؛ أقل من 175 دقيقة؛ أقل من 150 دقيقة؛ أقل من 125 دقيقة؛ بعد حقن تحت الجلد subcutaneous injection بمقدار 600 ميكرومولار (تقريبا) صياغة نظير الإنسولين المعالج بأسيل وفقا للاختراع، تحتوي على 1.6% (وزن/حجم، تقريبا) جليسرول glycerol و30 مل مولار فينول/m-كريسول phenol/m-cresol، رقم هيدروجيني 7.4، إلى الخنازير.

في نموذج آخر، نظير الإنسولين A22K المعالج بأسيل عبارة عن مركب وفقا للاختراع، حيث مجموعة الأسيل من الصيغة II عبارة عن مشتق من حمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك، وحيث نظير الإنسولين المعالج بأسيل له متوسط وقت بقاء أقل من 700 دقيقة؛ أقل من 600 دقيقة؛ أقل من 500 دقيقة؛ أقل من 400 دقيقة؛ أقل من 300 دقيقة؛ بعد حقن تحت الجلد بمقدار 600 ميكرومولار (تقريبا) صياغة نظير الإنسولين المعالج بأسيل وفقا للاختراع، تحتوي على 1.6% (وزن/حجم، تقريبا) جليسرول و30 مل مولار فينول/m-كريسول، رقم هيدروجيني 7.4، إلى الخنازير.

في جانب آخر، يتعلق الاختراع بالاستخدام الطبي لنظير الإنسولين المعالج بأسيل وفقا للاختراع، وتحديدا باستخدام هذه مشتقات الإنسولين لعلاج، الوقاية من أو تخفيف أمرض، اضطرابات أو حالات المرتبطة بالسكري، السكري من النوع الأول، السكري من النوع الثاني، ضعف تحمل الجلوكوز، فرط السكر في الدم، فرط الدهون في الدم، السمنة، متلازمة أيضبة (متلازمة أيضبة X، متلازمة مقاومة الإنسولين)، فرط الضغط، الاضطرابات الإدراكية، تصلب الشرايين، ذبحة قلبية، أزمة قلبية، اضطرابات قلبية وعائية، أمراض القلب التاجية، متلازمة المعدة الالتهابية، عسر الهضم، أو

قرحة المعدة، والتي تتضمن الطريقة إعطاء إلى خاضع في حاجة إليه كمية فعالة علاجيا من مشتق الإنسولين وفقا للاختراع.

في نموذج آخر، يتعلق الاختراع باستخدام هذه مشتقات الإنسولين لعلاج، الوقاية من أو تخفيف أمرض، اضطرابات أو حالات المرتبطة بالسكري، السكري من النوع الأول، السكري من النوع الثاني، أو ضعف تحمل الجلوكوز، والتي تتضمن الطريقة إعطاء إلى خاضع في حاجة إليه كمية فعالة علاجيا من مشتق الإنسولين وفقا للاختراع.

في نموذج ثالث، يتعلق الاختراع باستخدام هذه مشتقات الإنسولين لعلاج، الوقاية من أو تخفيف أمرض، اضطرابات أو حالات المرتبطة بالسكري، وتحديدا السكري من النوع الأول أو السكري من النوع الثاني.

تركيبات صيدلانية

يتعلق الاختراع الحالي بنظائر إنسولين معالج بأسيل مفيدة كأدوية.

بالتالي، في جانب آخر، يقدم الاختراع تركيبات صيدلانية جديدة تتضمن كمية فعالة علاجيا من مشتق إنسولين وفقا للاختراع الحالي.

التركيبة الصيدلانية pharmaceutical composition وفقا للاختراع اختياريا تتضمن واحد أو أكثر من مواد حاملة مقبولة صيدلانيا pharmaceutically acceptable carriers و/أو مخففات diluents.

يمكن أن تتضمن التركيبة الصيدلانية وفقا للاختراع الحالي أيضا سواغات أخرى مستخدمة بشكل مشترك في تركيبات صيدلانية مثلا مواد حافظة preservatives، عوامل خالبة chelating agents، عوامل مقوية tonicity agents، محسنات امتصاص absorption enhancers، مثبتات stabilizers، مضادات أكسدة antioxidants، بوليمرات polymers، مواد خافضة للتوتر السطحي surfactants، *أيونات معدنية* metal ions، مواد حاملة زيتية oleaginous vehicles وبروتينات (مثلا، مصل ألبومين بشري، جيلاتين gelatine أو بروتينات).

في أحد النماذج وفقا للاختراع التركيبة الصيدلانية وفقا للاختراع عبارة عن مستحضر مائي aqueous preparation، أي مستحضر يتضمن ماء. هذا المستحضر بشكل مثالي عبارة عن

محلول أو معلق suspension. في نموذج آخر وفقا للاختراع التركيبة الصيدلانية عبارة عن محلول مائي aqueous solution.

يتم تحديد المصطلح "مستحضر مائي" بمستحضر يتضمن على الأقل 50% وزن/وزن من ماء. بالمثل، يتم تحديد المصطلح "محلول مائي" بمحلول يتضمن على الأقل 50% وزن/وزن ماء، ويتم تحديد المصطلح "معلق مائي" بمعلق يتضمن على الأقل 50% وزن/وزن ماء. يمكن أن تحتوي المعلقات المائية Aqueous suspensions على المركبات النشطة active compounds في خليط مع سواغات مناسبة لتصنيع معلقات مائية.

في أحد النماذج وفقا للاختراع يتضمن مستحضر المحلول إنسولين مائي من مشتق إنسولين وفقا للاختراع الحالي، حيث مركب إنسولين موجود بتركيز من حوالي 0.1 مل مولار إلى حوالي 20.0 مل مولار؛ بشكل أكثر تحديدا من حوالي 0.2 مل مولار إلى حوالي 4.0 مل مولار؛ من حوالي 0.3 مل مولار إلى حوالي 2.5 مل مولار؛ من حوالي 0.5 مل مولار إلى حوالي 2.5 مل مولار؛ من حوالي 0.6 مل مولار إلى حوالي 2.0 مل مولار؛ أو من حوالي 0.6 مل مولار إلى حوالي 1.2 مل مولار.

في نموذج آخر وفقا للاختراع مستحضر الانسولين تتضمن محلول مائي من مشتق إنسولين وفقا للاختراع الحالي، حيث مركب الإنسولين المذكور موجود بتركيز حوالي 0.1 مل مولار، حوالي 0.3 مل مولار، حوالي 0.4 مل مولار، حوالي 0.6 مل مولار، حوالي 0.9 مل مولار، حوالي 1.2 مل مولار، حوالي 1.5 مل مولار، أو حوالي 1.8 مل مولار

يمكن أن تتضمن التركيبة الصيدلانية وفقا للاختراع الحالي أيضا نظام محلول منظم buffer system. يمكن اختيار المحلول المنظم من المجموعة المكونة من، على سبيل المثال لا الحصر، أسيتات صوديوم sodium acetate، كربونات صوديوم sodium carbonate، فوسفات داي هيدروجين صوديوم sodium dihydrogen phosphate، فوسفات هيدروجين داي صوديوم disodium hydrogen phosphate، فوسفات صوديوم sodium phosphate، وتريس(هيدروكسي ميثيل)-أمينو ميثان tris(hydroxymethyl)-aminomethan، بيسين bicine، ترايسين tricine، حمض ماليك malic acid، جليسيل-جليسين glycyl-glycine، إيثيلين داي أمين ethylene diamine، حمض سكسينيك succinic acid، حمض ماليك، حمض

فيوماريك fumaric acid، حمض طرطريك tartaric acid، حمض أسبارتيك aspartic acid أو خلطات مما سبق. كل من هذه المحاليل المنظمة buffers تشكل نموذج بديل للاختراع.

في أحد النماذج المحلول المنظم عبارة عن محلول فوسفات منظم phosphate buffer. في نموذج آخر أيضا، تركيز محلول الفوسفات المنظم المذكور موجود في النطاق من حوالي 0.1 مل مولار إلى 20 مل مولار، في نموذج آخر أيضا تركيز محلول فوسفات المنظم المذكور يبلغ في النطاق من 0.1 مل مولار إلى حوالي 10 مل مولار، أو من حوالي 0.1 مل مولار إلى حوالي 8 مل مولار، من حوالي 1 مل مولار إلى حوالي 8 مل مولار، أو من حوالي 2 مل مولار إلى حوالي 8 مل مولار، أو من 6 مل مولار إلى 8 مل مولار.

الرقم الهيدروجيني للتركيبة الصيدلانية القابلة للحقن injectable pharmaceutical composition وفقا للاختراع في نطاق من 3 إلى 8.5. بشكل مفضل، التركيبة الصيدلانية القابلة للحقن وفقا للاختراع له رقم هيدروجيني في النطاق من حوالي 6.8 إلى حوالي 7.8.

في أحد النماذج الرقم الهيدروجيني موجود في النطاق من حوالي 7.0 إلى حوالي 7.8، أو من 7.2 إلى 7.6.

يمكن أن تتضمن مستحضرات الأنسولين insulin preparations وفقا للاختراع الحالي عامل توترية. يمكن اختيار عامل التوترية tonicity agent من المجموعة التي تتكون من ملح (مثلا كلوريد صوديوم sodium chloride)، سكر أو كحول سكر sugar alcohol، حمض أميني amino acid (مثلا L-جليسين L-glycine، L-هيستيدين L-histidine، أرجينين arginine، ليسين lysine، أيزوليوسين isoleucine، حمض أسبارتيك، تريبتوفان tryptophan، ثريونين threonine)، ألديتول alditol (مثلا جليسرول glycerol (جليسرين glycerine)، 1،2-بروبان داي ول 1,2-propanediol (بروبيلين جليكول propyleneglycol)، 1،3-بروبان داي ول 1,3-propanediol، 1،3-بيوتان داي ول 1,3-butanediol) بولي إيثيلين جليكول polyethyleneglycol (مثلا PEG400)، أو خلطات مما سبق. يمكن استخدام أي سكر مثل مركبات مونو-، داي-، أو بولي سكاريد polysaccharides، أو مركبات جلوكان قابلة للذوبان في الماء water-soluble glucans، شاملة مثلا فركتوز fructose، جلوكوز، مانوز mannose، سوربوز sorbose، زيلوز xylose، مالتوز maltose، لاكتوز lactose، سكروز sucrose، تريهالوز trehalose، دكستران dextran، بولولان pullulan، ديكسترين dextrin، سيكلو دكسترين

cyclodextrin، نشا قابل للذوبان soluble starch، نشا هيدروكسي إيثيل hydroxyethyl starch وكربوكسي ميثيل سيليلوز-carboxymethylcellulose-Na Na. في أحد النماذج المادة السكرية المضافة sugar additive عبارة عن سكروز sucrose. يتضمن سكر الكحول Sugar alcohol، مثلا، مانيتول mannitol، سوربيتول sorbitol، إينوسيتول inositol، جالاكتيتول galactitol، دولسيتول dulcitol، زليتول xylitol، وأرابيتول arabitol. في أحد النماذج مادة سكر الكحول المضافة sugar alcohol additive عبارة عن مانيتول. يمكن استخدام السكريات أو سكريات الكحول sugar alcohols المذكورة أعلاه بشكل فردي أو في توليفة. كل من هذه العوامل المقوية tonicity agents المعينة أو خلطات منها تشكل نموذج بديل للاختراع.

في أحد النماذج وفقا للاختراع، يمكن أن يوجد جليسرول و/أو مانيتول و/أو كلوريد صوديوم sodium chloride يمكن أن بأي كمية تناظر تركيز من صفر إلى 250 مل مولار، من صفر إلى 200 مل مولار، أو من صفر إلى 100 مل مولار.

يمكن أن تتضمن مستحضرات الأنسولين وفقا للاختراع الحالي مادة حافظة مقبولة صيدلانيا pharmaceutically acceptable preservative. المادة الحافظة يمكن أن تتواجد بكمية كافية للحصول على أثر واقي. يمكن تحديد كمية المادة الحافظة في التركيبة الصيدلانية وفقا للاختراع من مثلا منشور في االمجال و/أو الكميات المعروفة من المادة الحافظة في المنتجات التجارية مثلا. كل من هذه المواد الحافظة المعينة أو خلطات منها تشكل نموذج بديل وفقا للاختراع. وقد تم وصف استخدام مادة حافظة في مستحضرات صيدلانية pharmaceutical preparations، مثلا في Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995.

في أحد النماذج، التركيبة الصيدلانية القابلة للحقن تتضمن على الأقل مركب فينولي phenolic compound واحد كعامل حافظ preservative agent.

في نموذج آخر المركب الفينولي للاستخدام وفقا للاختراع يمكن أن تتواجد في ما يصل إلى حوالي 6 ملجم/ملل لتركيبة صيدلانية نهائية قابلة للحقن، تحديدا بما يصل إلى حوالي 4 ملجم/ملل من تركيبة صيدلانية نهائية قابلة للحقن.

في نموذج آخر المركب الفينولي للاستخدام وفقا للاختراع يمكن أن تتواجد بكمية بما يصل إلى حوالي 4.0 ملجم/ملل من تركيبة صيدلانية نهائية قابلة للحقن؛ تحديدا من حوالي 0.5 ملجم/ملل إلى حوالي 4.0 ملجم/ملل؛ أو من حوالي 0.6 ملجم/ملل إلى حوالي 4.0 ملجم/ملل.

في نموذج آخر المادة الحافظة عبارة عن فينول phenol.

في نموذج آخر، التركيبة الصيدلانية القابلة للحقن تتضمن خليط من فينول و*m*-كريسول كعامل مادة حافظة.

في نموذج آخر، التركيبة الصيدلانية القابلة للحقن تتضمن حوالي 16 مل مولار فينول (1.5 ملجم/ملل) وحوالي 16 مل مولار *m*-كريسول (1.72 ملجم/ملل).

يمكن أن تتضمن التركيبة الصيدلانية وفقا للاختراع الحالي أيضا عامل خالب. عملية استخدام عامل خالب في مستحضرات صيدلانية معروفة للشخص الخبير. تتم الإشارة الملائمة إلى Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995.

يمكن أن تتضمن التركيبة الصيدلانية وفقا للاختراع الحالي أيضا محسن امتصاص absorption enhancer. يمكن أن تتضمن المجموعة من محسنات الامتصاص absorption enhancers ولكنها لا تقتصر على مركبات نيكوتينية nicotinic compounds. يتضمن المصطلح مركب نيكوتيني nicotinic compound نيكوتيناميد nicotinamide، حمض نيكوتيني nicotinic acid، نياسين niacin، أميد نياسين niacin amide وفيتامين B3 و/أو أملاح منها و/أو أي توليفة مما سبق.

في أحد النماذج، المركب النيكوتيني عبارة عن نيكوتيناميد، و/أو حمض نيكوتيني، و/أو ملح منه. في نموذج آخر المركب النيكوتيني عبارة عن نيكوتيناميد. يمكن تحديدا المركب النيكوتيني للاستخدام وفقا للاختراع أن يكون عبارة عن *N*-ميثيل نيكوتيناميد *N*-methyl nicotinamide، *N*،*N*-داي إيثيل نيكوتيناميد *N*،*N*-diethylnicotinamide، *N*-إيثيل نيكوتيناميد *N*-ethylnicotinamide، *N*،*N*-داي ميثيل نيكوتيناميد *N*,*N*-dimethylnicotinamide، *N*-بروبيل نيكوتيناميد *N*-propyl nicotinamide أو *N*-بيوتيل نيكوتيناميد *N*-butyl nicotinamide.

في نموذج آخر، المركب النيكوتيني موجود بكمية من حوالي 5 مل مولار إلى حوالي 200 مل مولار؛ تحديدا بكمية من حوالي 20 مل مولار إلى حوالي 200 مل مولار؛ بكمية من حوالي 100 مل مولار إلى حوالي 170 مل مولار؛ أو بكمية من حوالي 130 مل مولار إلى حوالي 170 مل مولار، مثل حوالي 130 مل مولار، حوالي 140 مل مولار، حوالي 150 مل مولار، حوالي 160 مل مولار أو حوالي 170 مل مولار.

يمكن أن تتضمن التركيبة الصيدلانية وفقا للاختراع الحالي أيضا مثبت stabilizer. المصطلح "مثبت" المستخدم هنا يشير إلى مواد كيماوية chemicals مضافة إلى بولي ببتيد polypeptide يحتوي على مستحضرات صيدلانية بالإضافة إلى تثبيت الببتيد، أي لزيادة عمر التخزين و/أو الاستخدام وقت الحاجة لهذه المستحضرات. للملائمة يمكن الإشارة إلى Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995.

يمكن أن تتضمن التركيبة الصيدلانية وفقا للاختراع أيضا كمية من قاعدة حمض أميني amino acid base مناسبة لتقليل عملية تكوين بواسطة بولي ببتيد أو البروتين أثناء تخزين التركيبة. يشير المصطلح "قاعدة حمض أميني" يشير إلى حمض أميني أو توليفة من أحماض أمينية amino acids، حيث يمكن أن تكون هناك أي هناك أي حمض أميني موجود في صورة قاعدة حرة free base أو ملح منها. يمكن تحديدا الأحماض الأمينية amino acids أن تكون بارة عن أرجينين، ليسين، حمض أسبارتيك، حمض جلوتاميك، أمينو جوانيدين aminoguanidine، أورنيثين ornithine أو *N*-مونو إيثيل L-أرجينين *N*-monoethyl L-arginine، إيثيونين ethionine أو بيوثيونين buthionine، أو S-ميثيل -L سيستين S-methyl-L cysteine. في أحد النماذج وفقا للاختراع يمكن أن تتواجد قاعدة حمض أميني بكمية تناظر تركيز من 1 إلى 100 مل مولار؛ من 1 إلى 50 مل مولار؛ أو من 1 إلى 30 مل مولار.

في أحد النماذج، يمكن أن تتضمن التركيبة الصيدلانية وفقا للاختراع الحالي أيضا مادة خافضة للتوتر السطحي. يشير المصطلح "مادة خافضة للتوتر السطحي" المستخدم هنا إلى أي جزيئات أو أيونات مكونة من جزء قابل للذوبان في الماء (كارهة للماء)، الرأس، وقطاع قابل للذوبان في الدهون (آلف للدهون) fat-soluble (lipophilic) segment. تتراكم المواد الخافضة للتوتر السطحي بشكل مفضل عند الأسطح البينية، والتي هي عبارة عن الجزء الكاره للماء hydrophilic part الموجه تجاه الماء (طور كاره للماء hydrophilic phase) والجزء الآلف للدهون lipophilic part تجاه الطور الزيتي أو الطور الكاره للماء (أي زجاج أو هواء أو زيت إلخ.). يبدأ تركيز بدء المواد الخافضة للتوتر السطحي في تكوين مواد مختلطة كتركيز مادة خطرة مختلطة أو سى أم سى CMC. علاوة على ذلك، تقوم المواد الخافضة للتوتر السطحي بتقليل التوتر السطحي للسائل. أيضا المواد الخافضة للتوتر السطحي أيضا عبارة عن مركبات أمفيتامينية amphipathic compounds. أيضا يقوم استخدام مادة خافضة للتوتر السطحي في مستحضرات صيدلانية معروفة للشخص الخبير.

للملائمة سوف تتم الإشارة إلى Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995.

يتعلق الاختراع أيضا بطريقة لتحضير مستحضرات الانسولين. يمكن تحضير مستحضرات الأنسولين وفقا لهذا الاختراع باستخدام أي عدد من الطرق المعروفة. مثلا، يمكن تحضير المستحضرات بواسطة خلط محلول مائي من سواغات مع محلول مائي aqueous solution of excipients من مشتق الإنسولين، بعد ذلك يتم تعديل هذا الرقم الهيدروجيني إلى مستوى مطلوب ويتم تصنيع الخليط بما يصل إلى الحجم النهائي مع الماء متبوعا بواسطة الترشيح المعقم sterile filtration.

تركيبات صيدلانية خالية من الزنك

عادة ما تتضمن مستحضرات الانسولين زنك مضافة مثلا مثل ملح الكلوريد أو أسيتات acetate للحصول على ثبات مقبول لمستحضر صيدلاني pharmaceutical preparation. مع ذلك، وقد وجد أن هناك مشتقات إنسولين معينة وفقا للاختراع، بينما يتم الحفاظ على الثبات الكيميائي والفيزيائي المناسب، ويمكن صياغتها في تركيبات صيدلانية بدون إضافة زنك، وبالتالي تعطي بداية أسرع للأثر من نظائر الإنسولين المقارنة التي تحتاج إلى أيونات Zn^{2+} للحفاظ على الثبات الكيميائي والفيزيائي المناسب. يتم امتصاص الصيغ الخالية من الزنك بشكل أسرع من نقطة تحت الجلد، وبالتالي يتم السماح بالاستخدام قبل الأكل.

في هذا الجانب يجب ذكر، أن تركيبة الإنسولين الخالي من الزنك الصيدلانية صعبة في الحصول عليها، كآثار الزنك، بمقدار أكبر أو أقل، يمكن أن تتواجد في السواغات المستخدمة بشكل تقليدي لتصنيع تركيبات صيدلانية، وتحديدا في المواد المطاطية rubber materials المستخدمة في الحاويات الطبية medical containers.

بالتالي، في أحد الجوانب، يقدم الاختراع تركيبات صيدلانية تتضمن مشتق إنسولين وفقا للاختراع، مصاغة كتركيبة ذات محتوى زنك منخفض، أي بدون إضافة منفصلة من الزنك إلى المستحضر. عادة ما تتم الإشارة إلى هذه التركيبات الصيدلانية بشكل معتاد إلى "تركيبات خالية من الزنك"، على الرغم من أنها يمكن اعتبارها في الحقيقة على أنها "تركيبات ذات محتوى زنك منخفض".

مع ذلك، يمكن توفير سواغات خالية من الزنك zinc-free excipients، مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع الحالي في الواقع تسمح بتحضير تركيبات صيدلانية خالية من الزنك. بالتالي، في جانب آخر، يقدم الاختراع تركيبات صيدلانية خالية من الزنك تتضمن مشتق إنسولين وفقا للاختراع، وواحد أو أكثر من مواد حاملة مقبولة صيدلانيا أو مخففات، خالية من أي زنك.

علاوة على ذلك اكتشفنا أن هناك مجموعة فرعية لمشتقات الإنسولين المعالجة بأسيل A22K وفقا للاختراع، الذي يحمل مجموعة استبدال في الموضع B3، مضافة إلى كل من الثبات الكيميائي والفيزيائي للتركيبات الصيدلانية المصاغة بدون الإضافة وفقا لأيونات زنك وبدون إضافة مواد خافضة للتوتر السطحي. بالتالي، في جانب آخر، يقدم الاختراع تركيبة صيدلانية منخفضة الزنك أو خالية من الزنك كما هو مبين أعلاه، يتضمن مشتق إنسولين وفقا للاختراع تتضمن استبدال إضافية في الموضع B3 (أي B3E أو B3Q)، وواحد أو أكثر من مواد حاملة مقبولة صيدلانيا أو مخففات، حيث في التركيبة الصيدلانية، مع ذلك، لم تتم إضافة أي مادة خافضة للتوتر السطحي.

في أحد النماذج يقدم الاختراع تركيبة صيدلانية مصاغة كتركيبة ذات محتوى زنك منخفض، بدون أيونات زنك مضافة، تتضمن مشتق إنسولين وواحد أو أكثر من مواد حاملة مقبولة صيدلانيا أو مخففات، حيث مشتق الإنسولين عبارة عن نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري، هذا النظير عبارة عن

[A22K، B3E أو B3Q، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري؛

ونظير الإنسولين هذا مشتق بواسطة معالجة مجموعة الأمينو إيبسلون من وحدة الليسين البنائية بأسيل عند الموضع A22 مع مجموعة من الصيغة II

[أسيل] - [رابط] -

حيث المجموعة الرابطة عبارة عن سلسلة حمض أميني مكونة من 1 إلى 10 وحدات حمض أميني بنائية تم اختيارها من -حمض جاما جلوتاميك- و-[2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل-؛ حيث

حمض جاما جلوتاميك تمثل وحدة حمض جاما جلوتاميك بنائية؛

[2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل تمثل الوحدة البنائية حمض 8-أمينو -3،6-داي أوكسا أوكتانويك (أي مجموعة من الصيغة $-NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-CO-$)؛

حيث وحدات الحمض الأميني البنائية يمكن أن تتواجد في أي ترتيب؛ و

حيث تتضمن سلسلة الحمض الأميني وحدة حمض جاما جلوتاميك بنائية واحدة على الأقل؛ و

حيث مجموعة الأسيل عبارة عن وحدة بنائية من حمض α،ω-داي -كربوكسيلي تم اختيارها من

حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك؛

حمض 1،15-بنتا ديكان داي ويك؛ و

حمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك؛

هذا النظير المعالج بأسيل، يمكن أن يتضمن بشكل إضافي مجموعة الاستبدال A14E.

في نموذج آخر، مجموعة الاستبدال الإضافي في الموضع B3 عبارة عن B3E.

في نموذج ثالث، مجموعة الاستبدال الإضافي في الموضع B3 عبارة عن B3Q.

في نموذج رابع يقدم الاختراع تركيبة صيدلانية، مصاغة كتركيبة ذات محتوى زنك منخفض، بدون أيونات زنك مضافة، تتضمن نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري تم اختيارها من:

A22K(M)(eps)-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(M)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(M)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(M)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-3x(gGlu-OEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(M)(eps)-تترا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(M)(eps)-بنتا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(M)(eps)-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(M)(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)M-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-3x(gGlu-OEG)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)M-تترا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)M-هكسا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A14E، A22K(eps)M-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A14E، A22K(eps)M-تترا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)M-تترا ديكان داي ول-(2xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)M-تترا ديكان داي ول-(3xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)M-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛ و

A22K(eps)M-تترا ديكان داي ول-حمض جاما جلوتاميك)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري.

في نموذج آخر أيضا، يقدم الاختراع تركيبة ذات محتوى زنك منخفض صيدلانية كما هو مبين أعلاه، حيث أيونات الزنك يمكن أن تتواجد بكمية تناظر تركيز أقل من 0.2 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين insulin molecules؛ أقل من 0.15 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين؛ أقل من 0.12 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين؛ 0.1 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين؛ أقل من 0.09 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين؛ أقل من 0.08 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين؛ أقل من 0.07 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين؛ أقل من 0.06 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين؛ أقل من 0.05 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين؛ أقل من 0.04 أيونات Zn^{2+} لكل 6

جزيئات إنسولين؛ أقل من 0.03 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين؛ أقل من 0.02 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين؛ أو أقل من 0.01 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين.

في نموذج آخر، يقدم الاختراع تركيبة صيدلانية ذات محتوى زنك منخفض أو خالية من الزنك كما هو مبين أعلاه، مصاغة كتركيبة قابلة للحقن injectable composition. يمكن الحصول على التركيبة الصيدلانية وفقا لهذا الاختراع باستخدام طرق تقليدية معروفة في المجال. مثلا، يمكن خلط المكونات معا في صورة محاليل مائية aqueous solutions، وبعدها يتم تعديل الرقم الهيدروجيني إلى المستوى المطلوبة ويتم صنع الخليط بالحجم النهائي بماء متبوع بالترشيح المعقم.

يمكن تنفيذ عملية الإعطاء بالحقن بواسطة الحقن تحت الجلد، في العضل intramuscular، في الغشاء البريتوني intraperitoneal أو عبر الوريد intravenous بواسطة سرنجة syringe، اختياريا سرنجة شبيهة بقلم pen-like syringe. بشكل بديل، يمكن تنفيذ الإعطاء بالحقن بواسطة مضخة تسريب infusion pump. كاختيار آخر، تحتوي مستحضرات الأنسولين على مركب إنسولين وفقا للاختراع يمكن تهيئته للإعطاء عبر الجلد، مثلا بواسطة حقنة خالية من الإبر needle-free injection أو من دفعة ذات إبرة دقيقة microneedle patch، اختياريا دفعة ذات ارتحال أيوني iontophoretic patch، أو عبر الغشاء المخاطي transmucosal، مثلا الإعطاء عبر الشدق buccal.

يمكن إعطاء مستحضرات الانسولين وفقا للاختراع الحالي إلى المريض المحتاج إلى هذا العلاج عند مواقع مختلفة، مثلا، عند مواقع موضعية، مثلا، المواقع الجلدية والمخاطية mucosal، عند المواقع التي تتخطي الامتصاص، مثلا، الإعطاء في شريان artery، في وريد vein، في القلب، ومواقع أخرى تتضمن الامتصاص، مثلا، إعطاء في الجلد أو تحت الجلد أو في العضل أو في الجذع.

في أحد النماذج، مستحضرات الأنسولين وفقا لهذا الاختراع مناسبة جدا للإعطاء في أجهزة شبيهة بقلم pen-like devices مستخدم لدواء الإنسولين بواسطة الحقن.

يمكن استخدام التركيبة الصيدلانية وفقا للاختراع في علاج السكري بواسطة الإعطاء بالحقن.

في نموذج آخر يمكن أيضا تحضير مستحضرات الأنسولين وفقا للاختراع الحالي للاستخدام في العديد من الأجهزة الطبية medical devices المستخدمة عادة لإعطاء إنسولين، شاملة العلاج بالتسريب المستمر تحت الجلد بإنسولين بواسطة استخدام مضخات pumps، و/أو للاستخدام في دواء الإنسولين الأساسي basal insulin therapy.

يوصى بأن تكون جرعة مستحضرات الأنسولين وفقا لهذا الاختراع التي يتم إعطاؤها إلى المريض مختارة بواسطة طبيب. وقد تمت الإشارة إلى أن مشتق الإنسولين وفقا للاختراع سوف يكون موجودا في التركيبة الصيدلانية النهائية بكمية من حوالي 0.1 مل مولار إلى حوالي 20.0 مل مولار؛ بشكل أكثر تحديدا من حوالي 0.2 مل مولار إلى حوالي 4.0 مل مولار؛ من حوالي 0.3 مل مولار إلى حوالي 2.5 مل مولار؛ من حوالي 0.5 مل مولار إلى حوالي 2.5 مل مولار؛ من حوالي 0.6 مل مولار إلى حوالي 2.0 مل مولار؛ أو من حوالي 0.6 مل مولار إلى حوالي 1.2 مل مولار.

الخواص المفضلة للتركيبة الصيدلانية وفقا للاختراع

يمكن وصف الاختراع الحالي بواسطة بالإشارة إلى واحد أو أكثر من الخواص التالية:

1. تركيبة صيدلانية تتضمن النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للاختراع، وواحد أو أكثر من سواغات مقبولة صيدلانيا.

2. التركيبة الصيدلانية وفقا للعبارة 1، مصاغة كتركيبة ذات محتوى زنك منخفض، بدون أيونات زنك مضافة.

3. التركيبة الصيدلانية وفقا للعبارة 1، مصاغة كتركيبة ذات محتوى زنك منخفض، بدون أيونات زنك مضافة، تتضمن نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري الذي يحمل مجموعة استبدال في الموضع B3.

4. التركيبة الصيدلانية وفقا للعبارة 1، مصاغة كتركيبة ذات محتوى زنك منخفض، بدون أيونات زنك مضافة، تتضمن نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري الذي يحمل مجموعة الاستبدال B3E أو B3Q.

5. التركيبة الصيدلانية وفقا للعبارة 1، مصاغة كتركيبة ذات محتوى زنك منخفض، بدون أيونات زنك مضافة، تتضمن نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري الذي يحمل مجموعة الاستبدال B3E.

6. التركيبة الصيدلانية وفقا للعبارة 1، مصاغة كتركيبة ذات محتوى زنك منخفض، بدون أيونات زنك مضافة، تتضمن نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري الذي يحمل مجموعة الاستبدال B3Q.

7. التركيبة الصيدلانية وفقا للعبارة 1، مصاغة كتركيبة ذات محتوى زنك منخفض، بدون أيونات زنك مضافة، تتضمن نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري تم اختيارها من:

A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-هكسا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-3x(gGlu-OEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-بنتا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A14E، A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A14E، A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-(2xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-حمض جاما جلوتاميك)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛ و

A22K(eps)-تترا ديكان داي ول-(3xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري.

8. التركيبة الصيدلانية وفقا للعبارة 1، مصاغة كتركيبة ذات محتوى زنك منخفض، بدون أيونات زنك مضافة، تتضمن نظير معالج بأسيل من إنسولين بشري تم اختيارها من:

A22K(eps)M-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)M-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)M-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-3x(gGlu-OEG))، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

A22K(eps)M-تترا ديكان داي ول-(gGlu-2xOEG)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛ و

A22K(eps)M-هكسا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري.

9. التركيبة الصيدلانية وفقا لأي من العبارات 7-8، تتضمن أقل من 0.2 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين.

10. التركيبة ذات محتوى زنك منخفض صيدلانية وفقا لأي من العبارات 7-8، حيث لم تتم إضافة أي مادة خافضة للتوتر السطحي.

11. التركيبة الصيدلانية وفقا لأي من العبارات 7-8، تتضمن مركب نيكوتيني.

12. التركيبة الصيدلانية وفقا لأي من العبارات 7-8، تتضمن مركب نيكوتيني، فينيل ألانين phenylalanine، و/أو ملح منه، بتركيز كلي من حوالي 20 مل مولار إلى حوالي 170 مل مولار.

13. التركيبة الصيدلانية وفقا لأي من العبارات 7-8، تتضمن مركب نيكوتيني، فينيل ألانين و/أو ملح منه، بتركيز كلي من حوالي 130 مل مولار إلى حوالي 170 مل مولار.

14. التركيبة الصيدلانية وفقا لأي من العبارات 7-8، تتضمن سواغ مقبولة صيدلانيا، مخفف diluent و/أو مترافق.

طرق العلاج

يتعلق الاختراع الحالي بعقاقير للاستخدام العلاجي. بشكل أكثر تحديدا يتعلق الاختراع باستخدام مشتقات معالجة بأسيل لنظائر إنسولين بشري وفقا للاختراع لعلاج أو الوقاية من الحالات الطبية المرتبطة بالسكري.

بالتالي، في جانب آخر، يقدم الاختراع طريقة لعلاج أو تخفيف مرض أو اضطراب أو حالة جسم حيوان حي، شاملة كائن بشري، يمكن اختيار هذا المرض أو الاضطراب أو الحالة من مرض، اضطراب أو حالة المرتبطة بالسكري، السكري من النوع الأول، السكري من النوع الثاني، ضعف تحمل الجلوكوز، فرط السكر في الدم، فرط الدهون في الدم، السمنة، متلازمة أيضية (متلازمة أيضية X، متلازمة مقاومة الإنسولين)، فرط الضغط، الاضطرابات الإدراكية، تصلب الشرايين، ذبحة قلبية، أزمة قلبية، اضطرابات قلبية وعائية، أمراض القلب التاجية، متلازمة المعدة الالتهابية، عسر الهضم، أو قرحة المعدة، تتضمن هذه الطريقة خطوة إعطاء خاضع في حاجة إليه كمية فعالة علاجيا من النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للاختراع.

في نموذج آخر يقدم الاختراع طريقة لعلاج أو تخفيف مرض أو اضطراب أو حالة جسم حيوان حي، شاملة إنسان، يمكن اختيار هذا المرض أو الاضطراب أو الحالة من مرض، اضطراب أو حالة المرتبطة بالسكري، السكري من النوع الأول، السكري من النوع الثاني، ضعف تحمل الجلوكوز، فرط السكر في الدم، فرط الدهون في الدم، السمنة، متلازمة أيضية (متلازمة أيضية X، متلازمة مقاومة الإنسولين)، فرط الضغط، الاضطرابات الإدراكية، تصلب الشرايين، ذبحة قلبية، أزمة قلبية، اضطرابات قلبية وعائية، أمراض القلب التاجية، متلازمة المعدة الالتهابية، عسر الهضم، أو قرحة المعدة، تتضمن هذه الطريقة إعطاء إلى خاضع في حاجة إليه كمية فعالة علاجيا من النظير المعالج بأسيل من إنسولين بشري وفقا للاختراع.

في نموذج ثالث يقدم الاختراع طريقة لعلاج أو تخفيف مرض أو اضطراب أو حالة جسم حيوان حي، شاملة إنسان، يمكن اختيار هذا المرض أو الاضطراب أو الحالة من مرض، اضطراب أو حالة المرتبطة بالسكري، السكري من النوع الأول، السكري من النوع الثاني، ضعف تحمل الجلوكوز، فرط السكر في الدم، فرط الدهون في الدم، السمنة، أو متلازمة أيضية (متلازمة أيضية X، متلازمة مقاومة الإنسولين).

في نموذج رابع يقدم الاختراع طريقة لعلاج أو تخفيف مرض أو اضطراب أو حالة جسم حيوان حي، شاملة إنسان، يمكن اختيار هذا المرض أو الاضطراب أو الحالة من مرض، اضطراب أو حالة المرتبطة بالسكري، تحديدا السكري من النوع الأول، أو السكري من النوع الثاني.

سوف يتم توضيح الاختراع أكثر بالإشارة إلى الأمثلة التالية، والتي لا يقصد بها أن تكون مقيدة بأي طريقة لمنظور الاختراع المطلوب حمايته.

التعبير عن وتنقية نظير الإنسولين

التعبير عن نظير الإنسولين

يتم إنتاج نظير الإنسولين، أي نظائر إنسولين ثنائية السلسلة غير المعالجة بأسيل، للاستخدام وفقا للاختراع بشكل ناتج عودة الارتباط الجيني بواسطة التعبير عن متوالية دنا DNA تقوم بترميز نظير الإنسولين محل الاستفهام في خلية عائلة host cell مناسبة بواسطة التقنيات المعروفة، مثلا كما هو مكشوف عنه في البراءة الامريكية 6500645[US-5930.500]. يتم التعبير عن نظير الإنسولين بشكل مباشر أو جزيء كاشف والذي يمكن أن يتضمن امتداد طرفي-N N-terminal extension على السلسلة-B و/أو ببتيد موصل connecting peptide (ببتيد-C) بين السلسلة-B والسلسلة-A. يتم شق هذا الامتداد الطرفي-N والببتيد-C ببتيد في المعمل بواسطة بروتياز مناسب، مثلا بروتياز الجرثومة المنتصلة Achromobactor lyticus protease (ALP) أو تريبسين trypsin، وبالتالي سوف تتضمن موقع شق cleavage site مجاور للموضع B1 وA1، على التوالي. يتم الكشف عن الامتدادات الطرفية-N N-terminal extensions والببتيدات-C من النوع المناسبة للاستخدام وفقا لهذا الاختراع في مثلا البراءة الامريكية 5395922، البراءة الاوروبية 765395 و البراءة الدولية 9828429.

يمكن تحضير متوالية بولي نيكلوتيد polynucleotide sequence التي ترمز المادة الكاشفة لنظير الإنسولين للاستخدام وفقا للاختراع بشكل تخليقي بواسطة الطرق المعروفة، مثلا طريقة الفوسفو أميديت phosphoamidite الموضحة بواسطة Beaucage et al. (1981) Tetrahedron Letters 22 1859-1869، أو الطريقة الموضحة بواسطة Matthes et al. (1984) EMBO Journal 3 801-805. وفقا لطريقة الفوسفو أميديت، يتم تخليك أوليجو نيكلوتيدات oligonucleotides مثلا في وسيلة تخليق DNA synthesiser ذاتية، منقاة ومضاعفة ومربوطة

لتكوين البنية التخليقية DNA. ثمة طريقة مفضلة حالية لتحضير بنية DNA بواسطة تفاعل سلسلة بوليمراز polymerase chain reaction (PCR).

سوف تقوم طريقة ناتج عودة الارتباط الجيني recombinant method بشكل مثالي باستخدام ناقل vector قادرة على المضاعفة في الكائن الدقيق المختار أو الخلية العائلة والتي تحمل متوالية بولي نيكلوتيد polynucleotide sequence يقوم بترميز المركب الأولي لنظير الإنسولين للاستخدام وفقا للاختراع الحالي. يمكن أن يكون ناتج عودة الارتباط الجيني ناقل عبارة عن ناقل ذاتي التكاثر autonomously replicating vector، أي، ناقل موجود ككيان كروموسومي خارجي extra-chromosomal entity، ولا يعتمد تكاثره على التكاثر الكروموسومي chromosomal replication، مثلا بلازميد plasmid، عنصر خارج كروموسومي extra-chromosomal element، كروموسوم صغير mini-chromosome، أو كروموسوم صناعي artificial chromosome. يمكن أن يحتوي الناقل على أس وسائل لضمان التكاثر الذاتي. بشكل بديل، يمكن أن يكون الناقل عبارة عن ناقل، عند إدخاله في الخلية المضيفة، يتم دمجه في الجينوم genome ويتم تكاثره مع الكروموسوم الذي يتم دمجه فيه. علاوة على ذلك، هناك ناقل أو بلازميد أو اثنين من أو أكثر نواقل vectors أو بلازميدات plasmids والتي تحتوي معا على الـ DNA الكلي الذي سيتم إدخاله في جينوم الخلية العائلة genome of host cell، أو يمكن استخدام ترانسبوسون transposon. يمكن أن يكون الناقل خطيا أو على شكل بلازميدات دائرية مغلقة closed circular plasmids وسوف تحتوي بشكل مفضل على عنصر تسمح بالدمج المستقر للناقل في جينوم الخلية العائلة التكاثر الذاتي للناقل autonomous replication of vector في الخلية دون اعتماد على الجينوم.

يمكن أن يكون ناقل التعبير عن ناتج عودة الارتباط الجيني recombinant expression vector عبارة عن ناقل قادر على التكاثر في الخميرة yeast. تتضمن أمثلة المتواليات التي تسمح للناقل بالتكاثر في الخميرة هي جينات تكاثر replication genes بلازميد الخميرة 2 yeast plasmid ميكرومتر 3-1 REP وأصل التكاثر.

يمكن أن يحتوي الناقل على واحد أو أكثر من المرقمات markers القابلة للاختيار، والتي تسمح بالاختيار السهل للخلايا المكونة الانتقالية trans-formed cells. المرقم القابل للاختيار عبارة عن الجين المنتج، والذي يقدم مقاومة للمبيد الحيوي biocide أو مقاومة فيروسية viral resistance،

مقاومة للمعادن الثقيلة heavy metals، من أجل إضفاء نفس الصفات التغذوية على كائنات دقيقة مطفرة auxotrophs، وما شابه. تتضمن أمثلة المرقمات البكتيرية التي يمكن اختيارها bacterial selectable markers جينات dal من العصوية الرقيقة Bacillus subtilis أو العصوية المحززة Bacillus licheniformis، أو مرقمات تضفي مقاومة حيوية antibiotic resistance مثل أمبيسيللين ampicillin، كاناميسين kanamycin، كلورامفينيكول chloramphenicol أو مقاومة تترا سيكلين tetracycline. تتضمن المرقمات القابلة للاختيار للاستخدام في خلية عائلة فطرية خيطية filamentous fungal host cell تتضمن amdS (أسيتاميداز acetamidase)، argB (أورني-ثين كربا مويل ترانسفيراز orni-thine carbamoyltransferase)، pyrG (أورتيدين-5'-فوسفات ديكربوكسيلاز orotidine-5'-phosphate decarboxylase) وtrpC (أنثرانيلات سين-ثاز anthranilate syn-thase. تتضمن المرقمات المناسبة لخلايا خميرة عائلة yeast host cells ADE2، HIS3، LEU2، LYS2، MET3، TRP1، وURA3. ثمة مرقم مناسب قابل للاختيار للخميرة هو جين Schizosaccharomyces pompe TPI (Russell (1985) Gene 40 125-130).

في الناقل، يتم توصيل متوالية بولي نيكلوتيد polynucleotide sequence تشغيليا بمعزز promoter مناسب. يمكن أن يكون المعزز عبارة عن أي متوالية حمض نووي nucleic acid sequence والتي تبين نشاط تحويلي transcriptional activity في الخلية العائلة المختارة شاملة المعززات promoters المتطفرة والمقطوعة والهجينة، ويمكن الحصول عليها من الجينات التي تقوم بترميز بولي ببتيدات polypeptides خارج الخلايا أو داخل الخلايا إما بشكل متجانس أو غير متجانس للخلية العائلة.

تتضمن الأمثلة المناسبة للمعززات الخاصة بتوجيه عملية التحويل في الخلية العائلة البكتيري bacterial host cell، المعززات التي يتم الحصول عليها من lac operon للإشريكية القولونية، جين أجاراز للمتسلسلة Streptomyces coelicolor agarase gene coelicolor (dagA)، جين ليفانسوكراز العصوية الرقيقة Bacillus subtilis levansucrase gene (sacB)، جين أميلاز ألفا العصوية المحززة Bacillus licheniformis alpha-amylase gene (amyL)، جين أميلاز العصوية stearothermophilus مولد للمالتوز Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene (amyM)، جين أميلاز ألفا للبكتيريا العصوية

(amyQ) Bacillus amyloliquefaciens alpha-amylase gene amyloliquefaciens، وجين بينيسيليناز للبكتيريا العصوية المحززة Bacillus licheniformis penicillinase gene (penP). تتضمن الأمثلة المناسبة للمعززات لتوجيه عملية التحويل في خلية عائلة فطرية خيطية filamentous fungal host cell معززات يتم الحصول عليها من الجينات لأميلاز الرشاشية الرزية Aspergillus oryzae TAKA، بروتياز أسبارتيك المتجفنة Rhizomucor miehei miehei aspartic proteinase، أميلاز ألفا للرشاشية السوداء المحايدة Aspergillus niger neutral alpha-amylase، وأميلاز ألفا المستقر لحمض الرشاشية السوداء Aspergillus niger acid stable alpha-amylase. في عائل فطري yeast host، المعززات المفيدة التي هي عبارة عن معززات السكيراء الجعوية Saccharomyces cerevisiae MA1، TPI، أيه دى اتش ADH، TDH3 أو بى جى كيه PGK.

متوالية البولي نيكلوتيد التي ترمز ببتيد الإنسولين الأساسي للاستخدام وفقا للاختراع أيضا متصلة تشغيليا بوسيلة إنهاء terminator مناسبة. في خميرة، وسيلة الإنهاء المناسبة عبارة عن وسيلة الإنهاء تى بى آى TPI (Alber et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1 419-434).

الإجراءات المستخدمة لدمج متوالية البولي نيكلوتيد التي تقوم بترميز نظير الإنسولين للاستخدام وفقا للاختراع، المعزز ووسيلة الإنهاء، على التوالي، ولإدخالها في ناقل مناسب يحتوي على المعلومات اللازمة من أجل التكاثر في العائل المختار، والمعروفة للخبير في المجال. سوف يتم فهم أن الناقل يمكن تكوينه إما بواسطة التحضير الأول لبنية DNA تحتوي على متوالية DNA الكلية التي ترمز أساسات الإنسولين insulin backbones للاستخدام وفقا للاختراع، وبالتالي يتم إدخال هذه الشظية fragment في ناقل التعبير expression vector المناسب، أو بواسطة الإدخال المتتابع لشظايا DNA fragments تحتوي على معلومات جينية genetic information للعناصر الفردية (مثل الإشارة والإمتداد المعزز للببتيد (المتداد الطرفي عند الطرف-N للسلسلة B)، ببتيد C، السلاسل A-و B-)، المتبوعة بالارتباط.

يتم إدخال الناقل الذي يتضمن متوالية البولي نيكلوتيد التي ترمز نظير الإنسولين للاستخدام وفقا للاختراع في خلية عائلة، بحيث يتم الحصول على الناقل كمتمم كروموسومي chromosomal integrant، أو كناقل خارج كروموسومي ذاتي التكاثر self-replicating extra-chromosomal vector. المصطلح "خلية عائلة" يتضمن أي سلالة من أي خلية أساسية ليست

مطابقة للخلية الأساسية بسبب التطفرات mutations التي تتم أثناء التكاثر. يمكن أن تكون الخلية العائلة عبارة عن كائن دقيق أحادي الخلية unicellular microorganism، مثلا خلية بدائية النواة prokaryote، أو كائن دقيق غير أحادي الخلية non-unicellular microorganism، مثلا خلية حقيقية النواة eukaryote. تتضمن الخلايا أحادية الخلية unicellular cells المفيدة الخلايا البكتيرية bacterial cells مثل البكتيريا التي يزيد وزنها عن جرام شاملة، على سبيل المثال لا الحصر، خلية Bacillus cell عضوية أو خلية سكيراء Streptomyces cell أو بكتريا وزنها أقل من جرام gram negative bacteria مثل الإشريكية القولونية والزائفة ويمكن أن تكون الخلايا حقيقية النواة Eukaryote cells ثديية أو لحضرات أو نبات أو خلايا فطرية fungal cells.

يمكن تحديدا أن تكون الخلية العائلة عبارة عن خلية فطرية. يمكن أن يكون كائن الخميرة yeast organism عبارة عن أي كائن فطري مناسب والذي، عند الزراعة، سوف تفرز ببتيد الإنسولين الأساسي أو المواد البادئة منه في وسط المزرعة culture medium. تتضمن أمثلة الكائنات الفطرية yeast organisms المناسبة سلالات strains تم اختيارها من السكيراء الجعوية Saccharomyces cerevisiae، الفطر السكري الكلوفري Saccharomyces kluyveri، السكيراء Schizosaccharomyces pombe pombe، السكيراء Sacchoromyces uvarum uvarum، اللبنية الكلوفرية Kluyveromyces lactis، الهانسنيولا متعددة الشكل Hansenula polymorpha، البستورية بيكيا Pichia pastoris، بيكيا ميثانوليكا Pichia methanolica، بيكيا كلوفرية Pichia kluyveri، Yarrowia lipolytica، الكانديدا Candida، الكانديدا المفيدة Candida utilis، الكانديدا cacaoi، التيربية Geotrichum، والتيربية الفطرية Geotrichum fermentans.

يمكن مثلا التأثير على تحويل خلايا الخميرة yeast cells بواسطة تكوين بروتوبلاست protoplast formation متبوع بعملية تحويل بواسطة الطرق المعروفة. الوسط المستخدم لزراعة الخلايا يمكن أن يكون عبارة عن أي وسط تقليدي مناسب لتنمية الكائنات الفطرية.

تنقية نظير الإنسولين

يمكن استخلاص نظير الإنسولين الذي يتم إفرازه أو المادة البادئة الخاصة بها من الوسط بواسطة الإجراءات التقليدية شاملة فصل خلايا الخميرة من الوسط بواسطة الطرد المركزي centrifugation،

بواسطة الترشيح أو بواسطة احتجاز أو امتصاص نظير الإنسولين أو المادة البادئة وبالتالي على مصفوفة تبادل أيوني ion exchange matrix أو على مصفوفة امتصاص طور عكسي reverse phase absorption matrix، الترسيب البروتيني لمكونات المادة الطافية supernatant، أو بواسطة الترشيح بواسطة ملح، مثلا سلفات أمونيوم ammonium sulphate متبوعة بتنقية بواسطة تشكيلة من الإجراءات الكروماتوجرافية، مثلا كروماتوجراف التبادل الأيوني ion exchange chromatography وكروماتوجراف الألفة affinity chromatography، إلخ.

يتم تنفيذ عملية تنقية واهتضام ببتيدات الإنسولين الأساسية وفقا لهذا الاختراع كما يلي:

تتم تنقية وتركيز المركب الأولي لنظير الإنسولين أحادي السلسلة single-chain insulin analogue، الذي يمكن أن يحتوي على امتداد-N طرفي للسلسلة-B وببتيد-C معدل بين السلسلة-B والسلسلة -A، من الجسم الطافي لمزرعة الخميرة yeast culture supernatant بواسطة مبادلة الكاتيون cation (Kjeldsen et al. (1998) Prot. Expr. Pur. 14 309-316).

يتم تطفر المركب الأولي لنظير الإنسولين أحادي السلسلة إلى ببتيد إنسولين الأساسي ثنائي السلسلة بواسطة الاهتضام مع بروتياز الجرثومة المنتصلة ثابت انتقائي لليسين (Kristensen et al. J. Biol. Chem. 20 12978-12983 (1997)) أو بواسطة استخدام تريبسين لشق الامتداد-N الطرفي للسلسلة-B، عند وجوده، والببتيد-C.

اهتضام تريبسين Trypsin digestion

يتم تخفيف ناتج الشطف eluate من خطوة كروماتوجراف تبادل الكاتيون cation exchange chromatography الذي يحتوي على المركب الأولي لنظير الإنسولين بالماء إلى تركيز إيثانول ethanol بمقدار 15-20٪. تتم إضافة جليسين Glycine إلى تركيز 50 مل مولار ويتم تعديل الرقم الهيدروجيني إلى 9.0-9.5 بواسطة NaOH. تتم إضافة تريبسين في نسبة 1:300 (وزن:وزن) ويتم السماح باكتمال الاهتضام عند 4 درجات. تتم مراقبة الاهتضام تحليليا كل 20 دقيقة لحين اكتمال الاهتضام. يتم إنهاء الاهتضام مع إضافة 1 مولار من حمض سيتريك citric acid بنسبة 3:100 (حجم:حجم).

يتم تحليل تفاعل الاهتضام digestion reaction بواسطة كروماتوجراف سائل liquid chromatography (LC) تحليلي على نظام كروماتوجراف سائل فائق الأداء Ultra-

Waters Acquity Performance Liquid Chromatography باستخدام العمود C18 ويتم تأكيد الوزن الجزيئي بواسطة طيف كتلي MS mass spectrometry زمن انتقال تأين امتزاز الليزر القائم على المصفوفة matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight MALDI-TOF (Bruker Daltonics Autoflex II TOF/TOF).

تتم تنقية نظير الإنسولين ثنائي السلسلة بواسطة طور كروماتوجراف سائل عالي الأداء العكسي (نظام Waters 600) على عمود C18 باستخدام تدريج أسيتونيتريل acetonitrile. يتم استخلاص نظير الإنسولين المطلوب، مثلا A22K، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري، A22K، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري، أو A22K، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري بواسطة التجفيف بالتجميد lyophilisation.

يتم تحديد النقاء بواسطة كروماتوجراف سائل التحليلي على نظام كروماتوجراف سائل فائق الأداء Waters Acquity باستخدام عمود C18، وتم تأكيد الوزن الجزيئي بواسطة زمن انتقال تأين امتزاز الليزر القائم على المصفوفة طيف كتلي.

الاختصارات

- ALP – بروتياز الجرثومة المنتصلة
- C-ببتيد – ببتيد توصيل
- HPLC – كروماتوجراف سائل عالي الأداء
- IR – مستقبل إنسولين
- IGF-1R مستقبل 1 لعامل نمو شبيه بإنسولين
- LC – كروماتوجراف سائل
- MALDI-TOF زمن انتقال تأين امتزاز الليزر القائم على المصفوفة
- MS – طيف كتلي
- PCR – تفاعل سلسلة بوليمراز
- PD – الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم)
- PG – جلوكوز البلازما

PK – الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)

tBu ترت-بيوتيل tert-butyl؛

DCM داي كلورو ميثان dichloromethane؛

DIC داي أيزو بروبيل كربو داي إيميد diisopropylcarbodiimide؛

DIEA = DIPEA N،N-داي أيزوز بروبيل إيثيل أمين N,N-disopropylethylamine؛

DMF N،N-داي ميثيل فورماميد N,N-dmethylformamide؛

DMSO داي ميثيل سلفوكسيد dimethyl sulphoxide؛

EtOAc إيثيل أسيتات؛

Fmoc 9-فلورينيل ميثيل أوكسي كربونيل 9-fluorenylmethyloxycarbonyl؛

γGlu (gGlu) جاما L-جلوتاميل gamma L-glutamyl؛

HCl حمض هيدروكلوريك hydrochloric acid؛

HOBt 1-هيدروكسي بنزو تراي أزول 1-hydroxybenzotriazole؛

NMP N-ميثيل بيروليدون N-methylpyrrolidone؛

MeCN أسيتونيتريل acetonitrile؛

OEG [2-(2-أمينو إيثوكسي)إيثوكسي] إيثيل كربونيل؛

Su سكسينيميديل-1-يل = 2،5-داي أوكسو -بيروليدين-1-يل succinimidyl-1-yl = 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl؛

OSu سكسينيميديل-1-يل أوكسي = 2،5-داي أوكسو -بيروليدين-1-يل أوكسي succinimidyl-1-yloxy = 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yloxy؛

RPC كروماتوجراف طور عكسي reverse phase chromatography؛

RT درجة حرارة الغرفة room temperature؛

TCTU O-(6-كلورو -بنزو تراي أزول -1-يل)-N،N،N'،N'-تترا ميثيل يورونيوم تترا فلورو بورات O-(6-chloro-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate؛

TFA عبارة عن حمض تراي فلورو أسيتيك trifluoroacetic acid؛

THF عبارة عن تترا هيدروفيوران tetrahydrofuran؛

TNBS حمض 2،4،6-تراي نيترو بنزين سلفونيك 2,4,6-trinitrobenzene-sulfonic acid؛

TRIS تريس(هيدروكسي ميثيل)أمينو ميثان tris(hydroxymethyl)aminomethane؛ و

TSTU O-(N-سكسينيميديل)-1،1،3،3-تترا ميثيل يورونيوم تترا فلورو بورات O-(N-succinimidyl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate.

ملحوظات عامة

تشير الأمثلة التالية والإجراءات العامة إلى مركبات وسيطة intermediate compounds ومنتجات نهائية محددة في الوصف في مخططة عملية التخليق. يتم وصف مستحضر مركبات الاختراع الحالي بالتفصيل باستخدام الأمثلة التالية، ولكن التفاعلات الكيماوية chemical reactions الموضحة تم الكشف عنها من حيث القدرة العامة على تحضير مركبات الاختراع.

أحيانا، يمكن ألا يمكن التفاعل قابلا للتنفيذ كما هو مبين مع كل مركب متضمن في المنظور المكشوف عنه في الاختراع. سوف يتم التعرف على المركبات التي يتم لها ذلك بواسطة الخبراء في المجال. في هذه الحالات يمكن أن يتم تنفيذ التفاعلات بشكل ناجح بواسطة التعديلات التقليدية المعروفة للخبراء في المجال، أي بواسطة الحماية المناسبة للمجموعة المتدخلة، بواسطة تغيير المواد العاملة التقليدية الأخرى، أو بواسطة التعديل الروتيني لحالات تفاعل.

بشكل بديل، سوف تكون هناك تفاعلات أخرى مكشوف عنها أو غيرها من التفاعلات التقليدية قابلة للتنفيذ لتحضير مركبات الاختراع. في كل الطرق التحضيرية، كل المواد البادئة starting materials معروفة أو يمكن تحضيرها بسهولة من المواد البادئة المعروفة. كل درجات الحرارة مذكورة بالدرجات المئوية وما لم تتم الإشارة إلى غير ذلك، كل الأجزاء والنسب مذكورة بالوزن عند الإشارة إلى النواتج وكل الأجزاء مذكورة بالحجم عند الإشارة إلى المذيبات solvents ومواد الشطف eluents.

يمكن تنقية مركبات الاختراع بواسطة استخدام واحد أو أكثر من الإجراءات التالية التي تتوافق مع هذا المجال. هذه الإجراءات يمكن تعديلها - عند الحاجة - نسبة إلى المواد المتدرجة gradients، رقم هيدروجيني، أملاح، تركيزات، التدفق، الأعمدة وما إلى ذلك. اعتمادا على عوامل مثل حالة الشوائب

impurity profile وذوبانية مركبات إنسولين محل الاستفهام إلخ، هذه التعديلات يمكن أن يتم التعرف عليها بشكل ملحوظ ويمكن تنفيذها بواسطة الخبير في المجال.

بعد كروماتوجراف سائل عالي الأداء حمضي أو نزع الملح، يتم عزل المركبات بواسطة التجفيف بالتجميد للأجزاء النقية pure fractions.

بعد كروماتوجراف سائل عالي الأداء المتعادل أو كروماتوجراف التبادل الأنيوني anion exchange chromatography، يتم نزع الملح من المركبات، ويتم الترسيب عند رقم هيدروجيني متسق الكهربية isoelectrical، أو منقى بواسطة كروماتوجراف سائل عالي الأداء حمضي.

إجراءات التنقية المثالية

نظام RP-HPLC:

نظام Gilson الذي يتكون مما يلي: Liquid handler Model 215، Pump Model 322-H2 و UV Detector Model 155 (أشعة فوق بنفسجية 215 نانومتر و280 نانومتر).

تبادل أنيوني ونظام نزع ملح desalting system:

يتكون نظام Äkta Explorer مما يلي: Pump Model P-900، UV detector Model UV-900 (UV 214، 254 و280 نانومتر)، نموذج كشف عن موصلية conductivity detector Model ورقم هيدروجيني /C-900، Fraction collector Model Frac-950.

RP-HPLC حمضي:

عمود: Phenomenex Gemini، 5 ميكرومولار 5 ميكرو C18 110آنجستروم، 250x30ملم

التدفق: 20 مل/دقيقة

المحلول المنظم A: 0.1٪ حمض تراي فلورو أسيتيك في ماء

المحلول المنظم B: 0.1٪ حمض تراي فلورو أسيتيك في أسيتونيتريل acetonitrile

RP-HPLC المتعادل:

عمود: Phenomenex Gemini، 5ميكرومولار 5 ميكرو C18 110آنجستروم، 250x30 ملم

التدفق: 20 مل/دقيقة

المحلول المنظم A: 10 مل مولار تريس، 15 مل مولار (NH4)2SO4، رقم هيدروجيني = 7.3، 20٪ أسيتونيتريل في milliQ

المحلول المنظم B: 20٪ milliQ في أسيتونيتريل

كروماتوجراف التبادل الأيوني:

عمود-مادة: Poros50HQ أو Source30Q

التدفق: معتمد على العمود

المحلول المنظم A: 15مل مولار تريس، 25 مل مولار OAc4NH، 50٪ EtOH، رقم هيدروجيني = 7.5.

المحلول المنظم B: 15 مل مولار تريس، 500 مل مولار OAc4NH، 50٪ EtOH، رقم هيدروجيني = 7.5.

نزع الملح:

عمود: HiPrep 26/10

التدفق: 20 مل/دقيقة

المحلول المنظم A: 0.1٪ حمض تراي فلورو أسيتيك في ماء

المحلول المنظم B: 0.1٪ حمض تراي فلورو أسيتيك في أسيتونيتريل

تم تخليق المواد الكاشفة للمعالجة بأسيل Acylation reagents إما في محلول (انظر أدناه) أو على طور صلب solid phase كما هو مبين مثلا في البراءة الدولية 115469/2009.

الإجراءات العامة لتخليق الطور الصلب للمواد الكاشفة الخاصة بالمعالجة بأسيل للصيغة العامة III

[أسيل] - [رابط] -Act

حيث تم تعريف الأسيل ومجموعات الربط أعلاه، وAct هو المجموعة التاركة لمركب إستر نشط active ester، مثل N-هيدروكسي سكسينيميد N-hydroxysuccinimide (سكسينيميديل-1-يل أوكسي = 2،5-داي أوكسو -بيروليدين-1-يل أوكسي)، أو 1-هيدروكسي بنزو تراي أزول -1 hydroxybenzotriazole، و

حيث يتم حماية الأحماض الكربوكسيلية carboxylic acids في أسيل وشقوق ربط Linker moieties لشق الأسيل acyl moiety كمركبات ترت-بيوتيل إستر tert-butyl esters.

يمكن أن يتم تخليق مركبات الصيغة العامة III على دعم صلب solid support باستخدام إجراءات في مجال تخليق ببتيد peptide synthesis في الطور الصلب معروفة للشخص الخبير.

تتضمن إحدى هذه الإجراءات إلحاق حمض أميني محمي protected amino acid 9-فلورينيل ¬ميثيل ¬أوكسي ¬كربونيل براتنج بولي ستيرين 2-كلورو تراي كلوريد polystyrene 2-chlorotri tylchloride resin. يمكن أن يتم الإلحاق باستخدام الحمض الأميني حرة عند الطرف N- free N-protected amino acid في وجود مركب أمين ثلاثي tertiary amine، مثل تراي إيثيل أمين triethyl amine أو N،N-داي أيزو بروبيل إيثيل أمين N,N-diisopropylethylamine (انظر المراجع أدناه). الطرف C- (الملحق بالراتنج) لهذا الحمض الأميني موجود عند نهاية المتوالية التخليقية الذي يقترن بمركبات إنسولين بادئة وفقا للاختراع.

بعد إلحاق حمض أميني 9-فلورينيل ¬ميثيل ¬أوكسي ¬كربونيل بالراتنج، يتم نزع حماية مجموعة 9-فلورينيل ¬ميثيل ¬أوكسي ¬كربونيل باستخدام، مثلا، مركبات أمين الثانوية secondary amines، مثل بيبيريدين piperidine أو داي إيثيل أمين diethyl amine، متبوعة بإقران حمض أميني آخر (أو هو نفسه) محمي بـ 9-فلورينيل ¬ميثيل ¬أوكسي ¬كربونيل ونزع الحماية. يتم إنهاء المتوالية التخليقية synthetic sequence بواسطة إقران الأحماض الثنائية الدهني المحمية بمونو-ترت-بيوتيل (α، ω) diacids mono-tert-butyl protected fatty (α, ω)، مثل هكسا ديكان داي ويك hexadecanedioic، بنتا ديكان داي ويك pentadecanedioic، أو مركبات حمض تترا ديكان داي ويك مونو-ترت-بيوتيل إستر tetradecanedioic acid mono-tert-butyl esters.

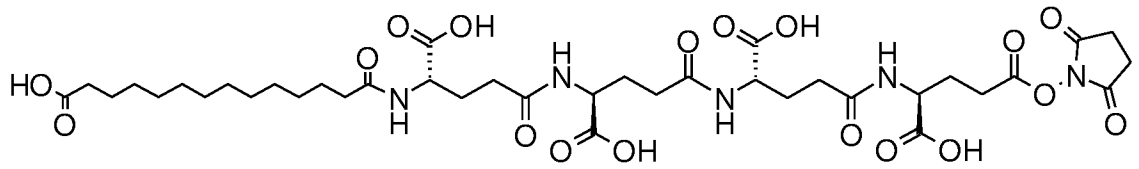
يتم تحقيق عملية شق المركبات من الراتنج باستخدام حمض مخفف diluted acid مثل 0.5-5٪ حمض تراي فلورو أسيتيك/داي كلورو ميثان (حمض تراي فلورو أسيتيك في داي كلورو ميثان)، حمض أسيتيك acetic acid (مثلا 10٪ في داي كلورو ميثان، أو اتش أوه أيه سى HOAc/تراي فلورو إيثانول/داي كلورو ميثان 1:1:8)، أو هكتا فلورو أيزو بروبانول hecafluoroisopropanol في داي كلورو ميثان (انظر مثلا F.Z. Dörwald: Organic Synthesis on Solid Phase; Wiley-VCH 2000, ISBN 3-527-29950-5; N. Sewald & H.-D. Jakubke: Peptides: Chemistry and Biology; Wiley-VCH, 2002, ISBN 3-527-30405-3; or The Combinatorial Cheemistry Catalog, 1999, Novabiochem AG، والمراجع

المذكورة فيها). وهذا يضمن أن مركبات ترت-بيوتيل إستر tert-butyl esters موجودة في المركبات كمجموعات حمض كربوكسي غير منزوعة الحماية.

أخيرا، يتم تنشيط مجموعة كربوكسي عند الطرف C-terminal carboxy group C (المحرر من الراتنج)، مثلا، مثل N-هيدروكسي سكسينيميد إستر N-hydroxysuccinimide ester (سكسينيميديل-1-يل أوكسي = 2،5-داي أوكسو -بيروليدين-1-يل أوكسي). يتم نزع حماية الإستر المنشط activated ester، مثلا باستخدام حمض تراي فلورو أسيتيك منسق، ويتم استخدامها إما بشكل مباشر أو بعد التنقية (التبلر) كعامل إقران في إلحاق بمركبات إنسولين أساسية وفقا للاختراع. هذا الإجراء موضح أدناه.

مثال يوضح إجراء عام لتخليق العامل الكاشف للمعالجة بأسيل acylation reagent على طور صلب:

تخليق تترا ديكان داي ول-OSu-4xgGlu (Chem.4)



تم ترك راتنج 2-كلورو تراي تيل 2-Chlorotrityl resin 100-200 مش 1.5 مل مول/جم (15.79 جم، 23.69 مل مول) لينتفخ في داي كلورو ميثان جاف dry dichloromethane (150 ملل) لمدة 20 دقيقة. تمت إضافة محلول من Fmoc-Glu-OtBu (6.72 جم، 15.79 مل مول) و N،N-داي أيزو بروبيل إيثيل أمين N,N-diisopropylethylamine (10.46 ملل، 60.01 مل مول) في داي كلورو ميثان جاف (120 ملل) إلى الراتنج وتم رج الخليط لمدة 16 ساعة. تم ترشيح الراتنج وتمت معالجته بمحلول من N،N-داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (5.5 ملل، 31.59 مل مول) في خليط ميثانول methanol/داي كلورو ميثان (1:9، 150 ملل، 5 دقائق). بعد ذلك تم غسل الراتنج مع N،N-داي ميثيل فورماميد N,N-dimethylformamide (2 x 150 ملل)، داي كلورو ميثان (2 x 150 ملل) و N،N-داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل).

تمت إزالة مجموعة 9-فلورينيل ¬ميثيل ¬أوكسي ¬كربونيل بواسطة العلاج بـ 20٪ بيبيريدين piperidine في N،N-داي ميثيل فورماميد N,N-dimethylformamide (2 x 150 ملل، 1 x

5 دقائق، 1 x 20 دقيقة). تم غسل الراتنج بـ N،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل)، 2–بروبانول 2–propanol (2 x 150 ملل)، داي كلورو ميثان (2 x 150 ملل) وN،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل). تمت إضافة محلول من Fmoc–Glu–OtBu (10.08 جم، 23.69 مل مول)، O–(6–كلورو –بنزو تراي أزول –1–يل)–N،N،N'،N'–تترا ميثيل يورونيوم تترا فلورو بورات (8.42 جم، 23.69 مل مول) وN،N–داي أيزو بروبيل إيثيل أمين N,N–diisopropylethylamine (7.43 ملل، 42.64 مل مول) في N،N–داي ميثيل فورماميد (120 ملل) إلى الراتنج وتم رج الخليط لمدة 16 ساعة. تم ترشيح الراتنج وتمت معالجته بمحلول من N،N–داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (5.5 ملل، 31.59 مل مول) في خليط ميثانول/داي كلورو ميثان (9:1، 150 ملل، 5 دقائق). بعد ذلك تم غسل الراتنج بـ N،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل)، داي كلورو ميثان (2 x 150 ملل) وN،N–داي ميثيل فورماميد (2 x150 ملل).

تمت إزالة مجموعة 9–فلورينيل ¬ميثيل ¬أوكسي ¬كربونيل بواسطة العلاج بـ 20٪ بيبيريدين في N،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل، 1 x 5 دقائق، 1 x 20 دقيقة). تم غسل الراتنج بـ N،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل)، 2–بروبانول (2 x 150 ملل)، داي كلورو ميثان (2 x 150 ملل) وN،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل). تمت إضافة محلول من Fmoc–Glu–OtBu (10.08 جم، 23.69 مل مول)، O–(6–كلورو –بنزو تراي أزول –1–يل)–N،N،N'،N'–تترا ميثيل يورونيوم تترا فلورو بورات (8.42 جم، 23.69 مل مول) وN،N–داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (7.43 ملل، 42.64 مل مول) في N،N–داي ميثيل فورماميد (120 ملل) إلى الراتنج وتم رج الخليط لمدة 16 ساعة. تم ترشيح الراتنج وتمت معالجته بمحلول من N،N–داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (5.5 ملل، 31.59 مل مول) في خليط ميثانول/داي كلورو ميثان (9:1، 150 ملل، 5 دقائق). بعد ذلك تم غسل الراتنج بـ N،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل)، داي كلورو ميثان (2 x 150 ملل) وN،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل).

تمت إزالة مجموعة 9–فلورينيل ¬ميثيل ¬أوكسي ¬كربونيل بواسطة العلاج بـ 20٪ بيبيريدين في N،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل، 1 x 5 دقائق، 1 x 20 دقيقة). تم غسل الراتنج بـ N،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل)، 2–بروبانول (2 x 150 ملل)، داي كلورو ميثان (2 x 150 ملل) وN،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل). تمت إضافة محلول من Fmoc–Glu–OtBu (10.08 جم، 23.69 مل مول)، O–(6–كلورو –بنزو تراي أزول –1–يل)–

N،N،N'،N'–تترا ميثيل يورونيوم تترا فلورو بورات (8.42 جم، 23.69 مل مول) وN،N–داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (7.43 ملل، 42.64 مل مول) في N،N–داي ميثيل فورماميد (120 ملل) إلى الراتنج وتم رج الخليط لمدة 16 ساعة. تم ترشيح الراتنج وتمت معالجته بمحلول من N،N–داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (5.5 ملل، 31.59 مل مول) في خليط ميثانول/داي كلورو ميثان (9:1، 150 ملل، 5 دقائق). بعد ذلك تم غسل الراتنج بـ N،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل)، داي كلورو ميثان (2 x 150 ملل) وN،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل).

تمت إزالة مجموعة 9–فلورينيل ¬ميثيل ¬أوكسي ¬كربونيل بواسطة العلاج بـ 20٪ بيبيريدين في N،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل، 1 x 5 دقائق، 1 x 20 دقيقة). تم غسل الراتنج بـ N،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل)، 2–بروبانول (2 x 150 ملل)، داي كلورو ميثان (2 x 150 ملل) وN،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل). تمت إضافة محلول من حمض تترا ديكان داي ويك مونو–ترت–بيوتيل إستر tetradecanedioic acid mono–tert–butyl ester (7.45 جم، 23.69 مل مول)، O–(6–كلورو –بنزو تراي أزول –1–يل)–N،N،N'،N'–تترا ميثيل يورونيوم تترا فلورو بورات (8.42 جم، 23.69 مل مول) وN،N–داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (7.43 ملل، 42.64 مل مول) في الخليط N،N of–داي ميثيل فورماميد (40 ملل) وداي كلورو ميثان (80 ملل) إلى الراتنج وتم رج الخليط لمدة 16 ساعة. تم ترشيح الراتنج وتم الغسل بداي كلورو ميثان (2 x 150 ملل)، N،N–داي ميثيل فورماميد (2 x 150 ملل)، ميثانول (2 x 150 ملل) وداي كلورو ميثان (10 x 150 ملل).

تم شق المنتج من الراتنج بواسطة المعالجة بتراي فلورو إيثانول trifluoroethanol (150 ملل) طوال الليل. تم ترشيح الراتنج وتم الغسل بداي كلورو ميثان (3 x 100 ملل). تمت إزالة المذيب تحت ضغط منخفض. تمت تنقية الوحدة البنائية بواسطة عمود كروماتوجراف column chromatography على جل سيليكا silica gel (شطف تدريجي داي كلورو ميثان gradient elution dichloromethane/ميثانول 100:0 إلى 95:5) لإعطاء المركب المذكور في العنوان كمادة صلبة بيضاء.

تم تجفيف المنتج في تفريغ لإعطاء حمض (S)–2–((S)–4–ترت–بيوتوكسي كربونيل–4–{(S)–4–ترت–بيوتوكسي كربونيل–4– [(S)–4–ترت–بيوتوكسي كربونيل–4–(13–ترت–بيوتوكسي كربونيل–تراي ديكانويل أمينو)–بيوتيريل أمينو] –بيوتيريل أمينو }–بيوتيريل أمينو)–بنتان داي ويك

1-ترت-بيوتيل إستر (S)-2-((S)-4-tert-Butoxycarbonyl-4-{(S)-4-tert-butoxycarbonyl-4-[(S)-4-tert-butoxycarbonyl-4-(13-tert-butoxycarbonyl-tridecanoylamino)-butyrylamino]-butyrylamino}-butyrylamino)-pentanedioic acid 1-tert-butyl ester.

الناتج: 14.77 g (89٪).

1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl3, δH): 7.22 (d, J=7.7 Hz, 1 H); 6.97 (d, J=7.9 Hz, 1 H); 6.72 (d, J=7.9 Hz, 1 H); 6.41 (d, J=7.9 Hz, 1 H); 4.59-4.43 (m, 4 H); 2.49-2.13 (m, 16 H); 2.06-1.72 (m, 4 H); 1.70-1.52 (m, 4 H); 1.52-1.38 (m, 45 H); 1.35-1.21 (m, 16 H).

نقاء كروماتوجراف سائل -طيف كتلي: 100٪ (إى أل أس دى ELSD).

كروماتوجراف سائل -طيف كتلي درجة حرارة الغرفة (Sunfire 4.6 ملم x 100 ملم، أسيتونيتريل/ماء 50:50 إلى 100:0 + 0.1٪ FA): 7.39 دقيقة.

كروماتوجراف سائل- طيف كتلي m/z: 791.0 (M+H)+.

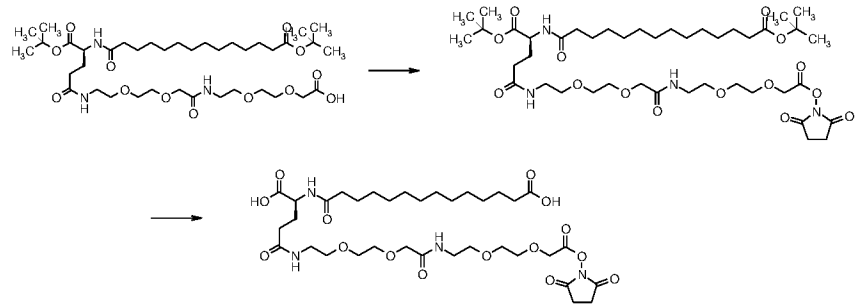
تمت إذابة حمض تترا ديكان داي ول-OH-4xgGlu ((S))-2-((S))-4-ترت-بيوتوكسي كربونيل-4-{(S)-4-ترت-بيوتوكسي كربونيل-4- [(S)-4-ترت-بيوتوكسي كربونيل-4-(13-ترت-بيوتوكسي كربونيل-تراي ديكانويل أمينو)-بيوتيريل أمينو] -بيوتيريل أمينو }-بيوتيريل أمينو)-بنتان داي ويك 1-ترت-بيوتيل إستر) المحمي بترت-بيوتيل tert-butyl protected tetradecanedioyl-4xgGlu-OH ((S)-2-((S)-4-tert-Butoxycarbonyl-4-{(S)-4-tert-butoxycarbonyl-4-[(S)-4-tert-butoxycarbonyl-4-(13-tert-butoxycarbonyl-tridecanoylamino)-butyrylamino]-butyrylamino}-butyrylamino)-pentanedioic acid 1-tert-butyl ester) الذي تم الحصول عليه في تترا هيدروفيوران tetrahydrofuran. تمت إضافة دى آى بى إى أيه DIPEA متبوعة بـ O-(N-سكسينيميديل)-1،1،3،3-تترا ميثيل ¬يورونيوم تترا فلورو بورات المذابة في أسيتونيتريل. تم تقليب خليط التفاعل لمدة 3 ساعات وبعد ذلك تم التبخير في تفريغ، تمت إعادة الإذابة في إيثيل أسيتات ethyl acetate، تم الغسل بـ 0.1 مولار حمض هيدروكلوريك (مائي)، تم التجفيف على MgSO4،

تم الترشيح وتم التبخير في تفريغ. كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (الترذيذ الكهربي electrospray): m/z = 1174.7 (M+Na+). Calc: 1175.4.

تمت إذابة المركب المحمي والمنشط بـ سكسينيميديل-1-يل أوكسي = 2،5-داي أوكسو -بيروليدين-1-يل أوكسي في 10 ملل حمض تراي فلورو أسيتيك وتم التقليب عند درجة حرارة الغرفة طوال الليل. تمت إضافة داي إيثيل إيثر Diethyl ether وتم ترشيح المادة المترسبة precipitate وتم التجفيف على تفريغ طوال الليل لإعطاء حمض (S)-2-((S)-4-كربوكسي -4-{(S)-4-كربوكسي -4-[(S)-4-كربوكسي -4-(13-كربوكسي -تراي ديكانويل أمينو)-بيوتيريل أمينو] -بيوتيريل أمينو }-بيوتيريل أمينو)-بنتان داي ويك 5-(2،5-داي أوكسو -بيروليدين-1-يل) إستر (تترا ديكان داي ول-OSu-4xgGlu). كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 872.2 (M+H+). Calc: 871.9.

المثال يوضح إجراء عام لتخليق عامل كاشف للمعالجة بأسيل على طور صلب:

تخليق تترا ديكان داي ول-OSu-gGlu-2xOEG (Chem.5)



حمض 13-{(S)-1-ترت-بيوتوكسي كربونيل-3- [2-(2- {2-(2-كربوكسي ميثوكسي -إيثوكسي)-إيثيل كرباموبل] -ميثوكسي }-إيثوكسي)-إيثيل كرباموبل] -بروبيل كرباموبل}-تراي ديكانويك ترت-بيوتيل إستر 13-{(S)-1-tert-Butoxycarbonyl-3-[2-(2-{[2-(2-carboxymethoxy-ethoxy)-ethylcarbamoyl]-methoxy}-ethoxy)-ethylcarbamoyl]-propylcarbamoyl}-tridecanoic acid tert-butyl ester

تم ترك راتنج 2-كلورو تراي تيل 100-200 مش 1.7 مل مول/جم (79.8 جم، 135.6 مل مول) لينتفخ في داي كلورو ميثان جاف (450 ملل) لمدة 20 دقيقة. تمت إضافة محلول من حمض {2-[2-(9H-فلورين-9-يل ميثوكسي كربونيل أمينو)-إيثوكسي] -إيثوكسي }-أسيتيك -9H)-2]-{2

-Fmoc) fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethoxy]-ethoxy}-acetic acid OH-OEG، 34.9 جم، 90.4 مل مول) وN،N-داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (59.9 ملل، 343،6 مل مول) في داي كلورو ميثان جاف (100 ملل) إلى الراتنج وتم رج الخليط لمدة 4 ساعات. تم ترشيح الراتنج وتمت معالجته بمحلول من N،N-داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (31.5 ملل، 180.8 مل مول) في خليط ميثانول/داي كلورو ميثان (4:1، 150 ملل، 2 x 5 دقائق). بعد ذلك تم غسل الراتنج بـ N،N-داي ميثيل فورماميد (2 x 300 ملل)، داي كلورو ميثان (2 x 300 ملل) وN،N-داي ميثيل فورماميد (3 x 300 ملل). تمت إزالة مجموعة 9-فلورينيل ¬ميثيل ¬أوكسي ¬كربونيل بواسطة العلاج بـ 20٪ بيبيريدين في داي ميثيل فورماميد (1 x 5 دقائق، 1 x 30 دقيقة، 2 x 300 ملل). تم غسل الراتنج بـ N،N-داي ميثيل فورماميد (3 x 300 ملل)، 2-بروبانول (2 x 300 ملل) وداي كلورو ميثان (350 ملل، 2 x 300 ملل).

تمت إضافة محلول من حمض {2- [2-(H9-فلورين-9-يل ميثوكسي كربونيل أمينو)-إيثوكسي] -إيثوكسي }-أسيتيك -[2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethoxy]-{2-[2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethoxy}-acetic acid (OH-OEG-Fmoc، 52.3 جم، 135.6 مل مول)، O-(6-كلورو -بنزو تراي أزول -1-يل)-N،N،N'،N'-تترا ميثيل يورونيوم تترا فلورو بورات (48.2 جم، 135.6 مل مول) وN،N-داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (42.5 ملل، 244.1 مل مول) في N،N-داي ميثيل فورماميد (250 ملل) إلى الراتنج وتم رج الخليط لمدة ساعتين. حيث كان اختبار نيهيدرين ninhydrin test إيجابيا، تم ترشيح الراتنج وتمت معالجته بنفس كميات العوامل الكاشفة reagents لمدة 30 دقيقة أخرى. تم ترشيح الراتنج وتم الغسل بN،N-داي ميثيل فورماميد (2 x 300 ملل)، داي كلورو ميثان (2 x 300 ملل) وN،N-داي ميثيل فورماميد (3 x 300 ملل). تمت إزالة مجموعة 9-فلورينيل ¬ميثيل ¬أوكسي ¬كربونيل بواسطة العلاج بـ 20٪ بيبيريدين في داي ميثيل فورماميد (1 x 5 دقائق، 1 x 30 دقيقة، 2 x 300 ملل). تم غسل الراتنج بـ N،N-داي ميثيل فورماميد (3 x 300 ملل)، 2-بروبانول (2 x 300 ملل) وداي كلورو ميثان (350 ملل، 2 x 300 ملل).

تمت إضافة محلول من حمض (s)-2-(H9-فلورين-9-يل ميثوكسي كربونيل أمينو)-بنتان داي ويك 1-ترت-بيوتيل إستر -(S)-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino) pentanedioic acid 1-tert-butyl ester (OtBu-LGlu-Fmoc، 57.7 جم، 135.6 مل

مول)، O-(6-كلورو -بنزو تراي أزول -1-يل)-N،N،N'،N'-تترا ميثيل يورونيوم تترا فلورو بورات (48.2 جم، 135.6 مل مول) وN،N-داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (42.5 ملل، 244.1 مل مول) في N،N-داي ميثيل فورماميد (250 ملل) إلى الراتنج وتم رج الخليط لمدة ساعة. تم ترشيح الراتنج وتم الغسل بـN،N-داي ميثيل فورماميد (2 x 300 ملل)، داي كلورو ميثان (2 x 300 ملل) وN،N-داي ميثيل فورماميد (2 x 300 ملل). تمت إزالة مجموعة 9-فلورينيل ¬ميثيل ¬أوكسي ¬كربونيل بواسطة العلاج بـ 20٪ بيبيريدين في داي ميثيل فورماميد (1 x 5 دقائق، 1 x 30 دقيقة، 2 x 300 ملل). تم غسل الراتنج بـ N،N-داي ميثيل فورماميد (3 x 300 ملل)، 2-بروبانول (2 x 300 ملل) وداي كلورو ميثان (350 ملل، 2 x 300 ملل).

تمت إضافة محلول من حمض تترا ديكان داي ويك مونو-ترت-بيوتيل إستر tetradecanedioic acid mono-tert-butyl ester (14C(OtBu)-OH، 42.7 جم، 135.6 مل مول)، O-(6-كلورو -بنزو تراي أزول -1-يل)-N،N،N'،N'-تترا ميثيل يورونيوم تترا فلورو بورات (48.2 جم، 135.6 مل مول) وN،N-داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (42.5 ملل، 244.1 مل مول) في خليط داي كلورو ميثان/N،N-داي ميثيل فورماميد (4:1، 300 ملل) إلى الراتنج وتم رج الخليط لمدة ساعة ونصف. تم ترشيح الراتنج وتم الغسل بـN،N-داي ميثيل فورماميد (6 x 300 ملل)، داي كلورو ميثان (4 x 300 ملل)، ميثانول (4 x 300 ملل) وداي كلورو ميثان (7 x 600 ملل). تم شق المنتج من الراتنج بواسطة العلاج بـ 2،2،2-تراي فلور إيثانول (600 ملل) لمدة 18 ساعة. تم ترشيح الراتنج وتم الغسل بداي كلورو ميثان (4 x 300 ملل)، خليط داي كلورو ميثان/2-بروبانول (1:1، 4 x 300 ملل)، 2-بروبانول (2 x 300 ملل) وداي كلورو ميثان (6 x 300 ملل). تم دمج المحاليل؛ تم تبخير المذيب وتمت تنقية المنتج الخام بواسطة عمود كروماتوجراف (جل سيليكا 60A، 0.060-0.200 ملم؛ شطافة eluent: داي كلورو ميثان/ميثانول 1:0-9:1).

تم تجفيف حمض 13-{(S)-1-ترت-بيوتوكسي كربونيل -3- [2-(2-{ [2-(2-كربوكسي ميثوكسي -إيثوكسي)-إيثيل كربامويل] -ميثوكسي }-إيثوكسي)-إيثيل كربامويل] -بروبيل كربامويل}-تراي ديكانويك ترت-بيوتيل إستر النقي Pure 13-{(S)-1-tert-Butoxycarbonyl-3-[2-(2-{[2-(2-carboxymethoxy-ethoxy)-ethylcarbamoyl]-methoxy}-ethoxy)-ethylcarbamoyl]-propylcarbamoyl}-tridecanoic acid tert-butyl ester في تفريغ وتم الحصول عليه كزيت برتقالي.

الناتج: 55.2 جم (77٪).

RF (SiO2، داي كلورو ميثان/ميثانول 9:1): 0.35.

1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl3, δH): 7.37 (bs, 1 H); 7.02 (bs, 1 H); 6.53 (d, J=7.9 Hz, 1 H); 4.54-4.38 (m, 1 H); 4.17 (s, 2 H); 4.02 (s, 2 H); 3.82-3.40 (m, 16 H); 2.37-2.12 (m, 7 H); 2.02-1.82 (m, 1 H); 1.71-1.51 (m, 4 H); 1.47 (s, 9 H); 1.43 (s, 9 H); 1.25 (bs, 16 H).

نقاء كروماتوجراف سائل -طيف كتلي: 100٪.

كروماتوجراف سائل -طيف كتلي درجة حرارة الغرفة (Sunfire 4.6 ملم x 100 ملم، أسيتونيتريل/ماء 70:30 إلى 100:0 + 0.1٪ FA): 3.93 دقيقة.

كروماتوجراف سائل -طيف كتلي m/z: 791.0 (M+H)+.

تمت إذابة حمض 13-{(S)-1-ترت-بيوتوكسي كربونيل -3- [2-(2-{ [2-(2-كربوكسي ميثوكسي -إيثوكسي)-إيثيل كربامويل] -ميثوكسي }-إيثوكسي)-إيثيل كربامويل] -بروبيل كربامويل}-تراي ديكانويك ترت-بيوتيل إستر (تترا ديكان داي ول-OH-gGlu-2xOEG، 8.89 جم، 11.3 مل مول)) في 100 ملل من أسيتونيتريل، وتمت إضافة N)-O-سكسينيميديل)-1،1،3،3-تترا ميثيل ¬يورونيوم تترا فلورو بورات (4.07 جم، 13.5 مل مول) وDIPEA (2.35 ملل، 13.5 مل مول) وتم تقليب المحلول والخليط عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة. تم تبخير المذيب وتمت إذابة الوحدة البنائية في داي كلورو ميثان وتم الغسل مرتين مع 0.05 مولار حمض هيدروكلوريك.

تم تجفيف الطور العضوي organic phase (MgSO4) وتم التبخير في تفريغ. وهذا أعطى 9.98 جم (100٪) من حمض 13-((S)-1-ترت-بيوتوكسي كربونيل -3-{2- [2-({2- [2-(2،5-داي أوكسو -بيروليدين-1-يل أوكسي كربونيل ميثوكسي)-إيثوكسي] -إيثيل كربامويل}-ميثوكسي)-إيثوكسي] -إيثيل كربامويل}-بروبيل كربامويل)-تراي ديكانويك ترت-بيوتيل إستر كزيت.

تمت إذابة حمض 13-((S)-1-ترت-بيوتوكسي كربونيل -3-{2- [2-({2- [2-(2،5-داي أوكسو -بيروليدين-1-يل أوكسي كربونيل ميثوكسي)-إيثوكسي] -إيثيل كربامويل}-ميثوكسي)-إيثوكسي] -إيثيل كربامويل}-بروبيل كربامويل)-تراي ديكانويك ترت-بيوتيل إستر (4 جم) في حمض تراي فلورو أسيتيك (10 ملل) وتم تقليب الخليط عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة وتم التبخير في تفريغ. تمت إذابة الوحدة البنائية في داي كلورو ميثان (10 ملل) وتم التبخير في تفريغ. أدت إضافة

داي إيثيل إيثر (10 ملل) بارد إلى ترسيب مادة صلبة دهنية greasy solid. تم عزل ذلك بواسطة الترويق وتم التجفيف في تفريغ. وهذا أعطى 3.4 جم (قياسي) من حمض 14- [[(S1)-1-كربوكسي -4- [2- [2- [2- [2- [2- [2-(2،5-داي أوكسو بيروليدين-1-يل)أوكسي -2-أوكسو إيثوكسي] إيثوكسي] إيثيل أمينو] -2-أوكسو إيثوكسي] إيثوكسي] إيثيل أمينو] -4-أوكسو بيوتيل] أمينو] -14-أوكسو تترا ديكانويك -2]-2]-2]-2]-2]-14-[[(1S)-1-carboxy-4-[2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy-2-oxoethoxy]ethoxy]ethylamino]-2-oxoethoxy]ethoxy]ethylamino]-4-oxobutyl]amino]-14-oxotetradecanoic acid (تترا ديكان داي ول-OSu-gGlu-2xOEG)، والتي تم تخزينها عند -18°م.

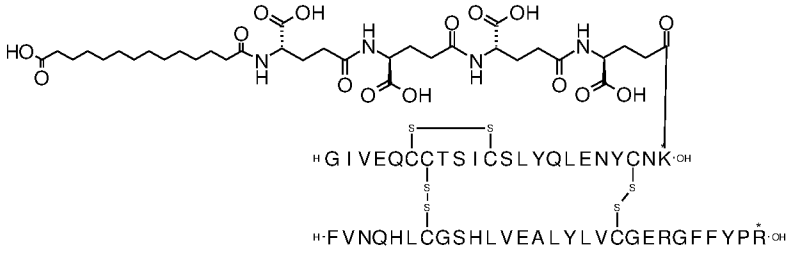
كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 775،33؛ calc: 774،8.

المعالجة بأسيل والتنقية من مشتقات إنسولين

تم وصف الإجراء العام (A) للمعالجة بأسيل وتنقية مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع في المثال 1، أدناه. وقد تم تطبيق هذا الإجراء أيضا على عملية تخليق المركبات وفقا للأمثلة 2-25، أدناه. وقد تم تنفيذ التنقية باستخدام الطرق الأخرى (كما هو مبين أعلاه) لبعض هذه المشتقات.

المثال 1؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)-تترا ديكان داي ول-4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛ IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29]، des-ThrB27،ThrB30-إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [(S4)-4-كربوكسي -4- [[(S4)-4-كربوكسي -4- [[(S4)-4-كربوكسي -4-(13)-كربوكسي تراي ديكانويل أمينو) بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] Lys،(B)-ببتيد.



تمت إذابة A22K، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري (2.0 جم) في 40 ملل 0.1مولار Na2CO3 (مائي)، وتم تعديل الرقم الهيدروجيني إلى 11.2 مع 1مولار من NaOH (مائي). تترا ديكان داي ول-OSu-4xgGlu (0.454 جم) في 2 ملل N،N-داي ميثيل فورماميد

وتمت الإضافة بالتقطير إلى محلول إنسولين بينما تم الحفاظ على الرقم الهيدروجيني ثابت 11.2 مع 1 مولار NaOH (مائي). تم تقليب خليط التفاعل عند درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة، بعد ذلك تمت المعادلة إلى رقم هيدروجيني = 7.5 باستخدام M0.1 حمض هيدروكلوريك (مائي) وتم التخفيف بـ 1:1 /EtOH ماء milliQ.

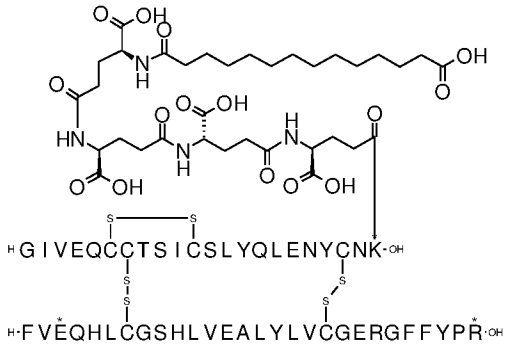
تمت تنقية الإنسولين الناتج بواسطة كروماتوجراف التبادل الأيوني على عمود 74 Poros50HQ ملل، شطف بـ 25 إلى 500 مل مولار أسيتات أمونيوم ammonium acetate في 15 مل مولار تريس، 50٪حجم/حجم إيثانول، رقم هيدروجيني 7.5 (حمض أسيتيك). تم تنفيذ عملية نزع الملح من الأجزاء النقية على عمود طور عكسي reverse phase column مشطوف بتدريج أسيتونيتريل في ماء milliQ يحتوي على 0.1٪ حمض تراي فلورو أسيتيك. تم تجفيف الإنسولين النقي الناتج بالتجميد. كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1629.98 (+4M)/4. Calc: 1630.65.

يتم تخليق العامل الكاشف للمعالجة بأسيل، تترا ديكان داي ول–OSu–4xgGlu، كما هو مبين أعلاه.

المثال 2؛ الإجراء العام (A)

إنسولين desB30 ،B29R ،desB27 ،B3E ،(4xgGlu–تترا ديكان داي ول–(eps)N)A22K بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،GluB3]–des، ThrB30،ThrB27–إنسولين(بشري)–(A)–ببتيديل)–N{إيبسلون} [(S4)–4–كربوكسي –4– [(S4)–4–كربوكسي –4– [(S4)–4–كربوكسي –4– [(S4)–4–كربوكسي –4–(13– كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] Lys،(B)–ببتيد.



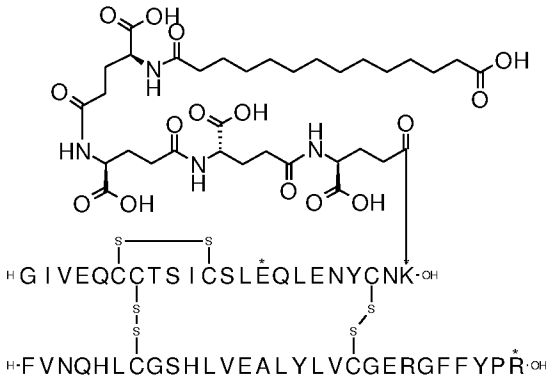
تم تحضير هذا النظير وفقا للطريقة الموضحة في المثال 1.

كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1633.9 (H+4M+). Calc: 1634.4

المثال 3؛ الإجراء العام (A)

A14E، A22K(eps)N–تترا ديكان داي ول–(4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،4GluA1]–des–ThrB30،ThrB27–إنسولين(بشري)–(A)–ببتيديل)–N{إيبسلون}[(S4)–4–كربوكسي –4–] [(S4)–4–كربوكسي –4–] [(S4)–4–كربوكسي –4–] [(S4)–4–كربوكسي –4–(13–كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] Lys،(B)–ببتيد.



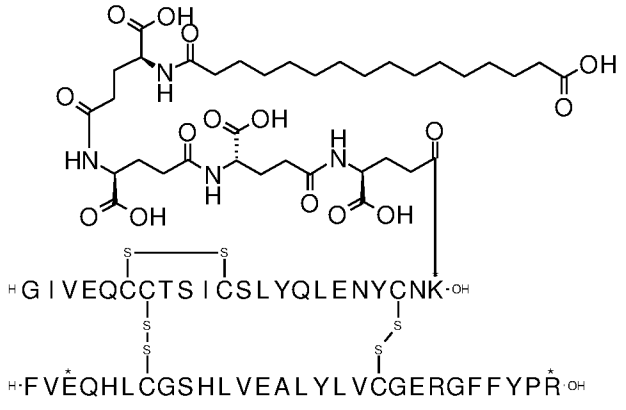
كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1622.2 (4M+)/4. Calc: 1622.1

المثال 4؛ الإجراء العام (A)

A22K(eps)N–هكسا ديكان داي ول–(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،GluB3]–des–ThrB30،ThrB27–إنسولين(بشري)–(A)–ببتيديل)–N{إيبسلون}[(S4)–4–كربوكسي –4–] [(S4)–4–كربوكسي –4–] [(S4)–4–كربوكسي –4–] [(S4)–4–كربوكسي –4–(15–كربوكسي بنتا decanoylأمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] –

des-ThrB27,ThrB30-Insulin(human)-(A)-peptidyl)-N{Epsilon}[(4S)-4- Lys carboxy-4-[[(4S)-4-carboxy-4-[[(4S)-4-carboxy-4-[[(4S)-4-carboxy-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoyl]amino]butanoyl] amino]butanoyl]-ببتيد-(B)،amino]butanoyl]Lys.

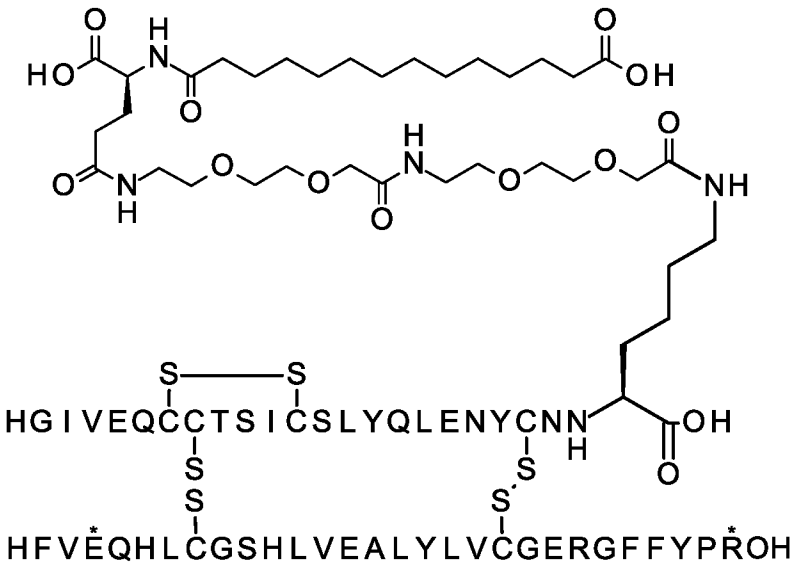


كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1641.2 (H+4M+). Calc: 1641.4.

المثال 5؛ الإجراء العام (A)

desB30 ،B29R ،desB27 ،B3E ،(gGlu-2xOEG-هكسا ديكان داي ول-(eps)N)A22K إنسولين بشري؛

-des ،[ArgB29،GluB3]){ألفا}N :الاسم (IUPAC نوع ،OpenEye) IUPAC] -2] -2] -2]] -2] -2] -2] {إيبسلون}N-(ببتيديل-(A)-(بشري)-إنسولين-ThrB30،ThrB27 [(S4)-4-كربوكسي -4-(15-كربوكسي بنتا ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي أسيتيل] Lys-(human)Insulin-ThrB30-ThrB27,des-peptidyl)-N{Epsilon}[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxy-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoyl]amino]ethoxy]ethoxy]acetyl]amino]-ببتيد-(B)،ethoxy]ethoxy]acetyl]Lys.

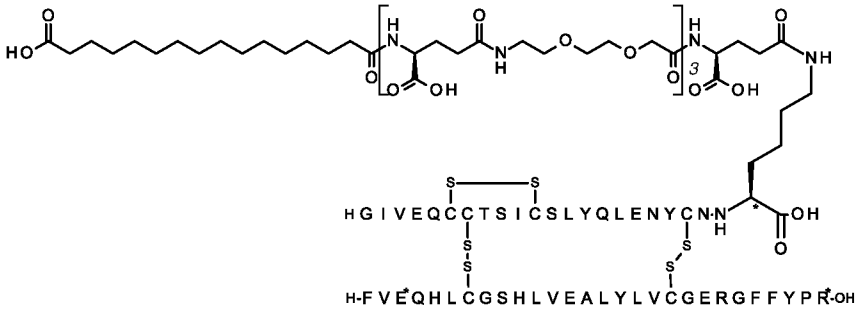


كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1616.6 (4/(4M+). Calc: 1617.1

المثال 6؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-3x(gGlu-OEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،GluB3]-des، ThrB30،ThrB27-إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [(S4)-4-كربوكسي -4- [2-] -2] [(S4)-4-كربوكسي -4- [2- [2- [2- [2-] -2] [(S4)-4-كربوكسي -4- [2- [2- [2-] -2] [(S4)-4-كربوكسي -4- [2-] -2] [(S4)-4-كربوكسي بنتا ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] بيوتانويل] Lys-des-ThrB27,ThrB30-Insulin(human)-(A)-peptidyl)-N{Epsilon}[(4S)-4-carboxy-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxy-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxy-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxy-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoyl]amino]ethoxy]ethoxy]acetyl]amino]butanoyl]amino]ethoxy]ethoxy]acetyl]amino]butanoyl]amino]-Lys[B)،ethoxy]ethoxy]acetyl]amino]butanoyl]-ببتيد.

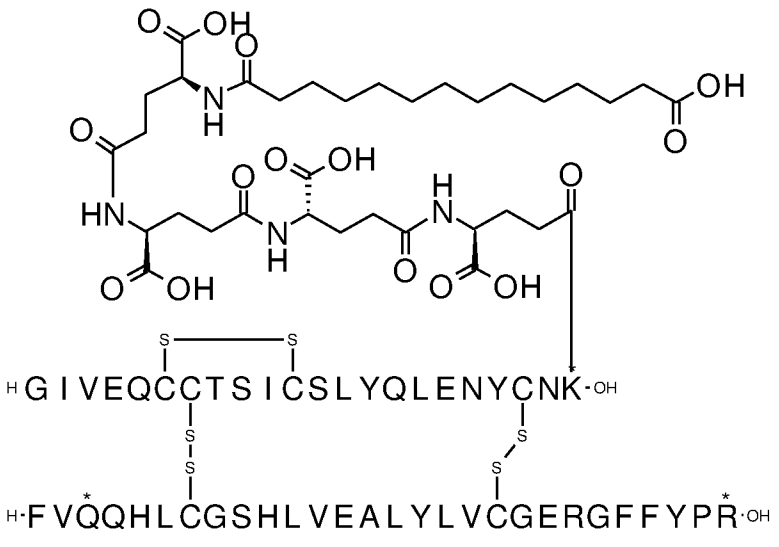


كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (التردذيذ الكهربي): m/z = 1749.9 (4/(4M+) .Calc: 1750.3

المثال 7؛ الإجراء العام (A)

A22K(eps)N-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}-des-[ArgB29،GlnB3] إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون}-[(S4)-4-كربوكسي-4-] [(S4)-4-كربوكسي-4-] [(S4)-4-كربوكسي-4-] [(S4)-4-كربوكسي-4-(13)-كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] des-ThrB27,ThrB30-Insulin(human)-(A)-peptidyl)-N{Epsilon}[(4S)-4-Lys carboxy-4-[[(4S)-4-carboxy-4-[[(4S)-4-carboxy-4-[[(4S)-4-carboxy-4-(13-carboxytridecanoylamino)butanoyl]amino]butanoyl]amino] butanoyl]amino]butanoyl]Lys، (B)-ببتيد.

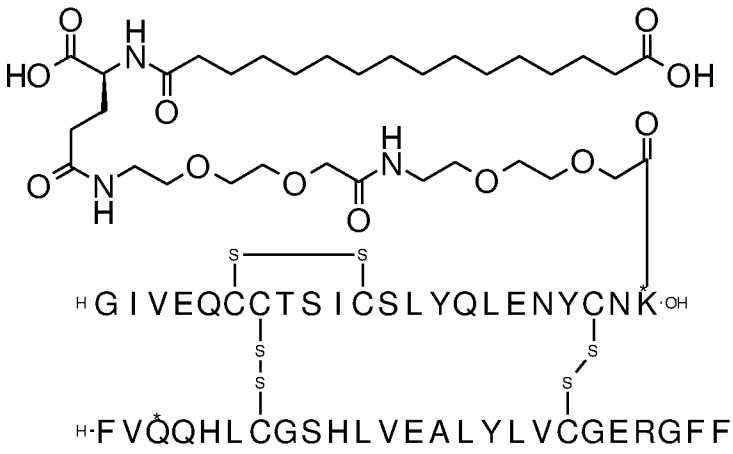


كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (التردذيذ الكهربي): m/z = 1634.2 (4/(4M+. Calc: 1633.1

المثال 8؛ الإجراء العام (A)

desB30 ،B29R ،desB27 ،B3Q ،(gGlu-2xOEG-ول داي ديكان هكسا-(eps)N)A22K إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،GlnB3]-des-ThrB30،ThrB27-إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [2- [2- [2-] [2- [2- [2-] [(S4)-4-كربوكسي -4-(15-كربوكسي بنتا ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل] Lys،(B)-ببتيد.



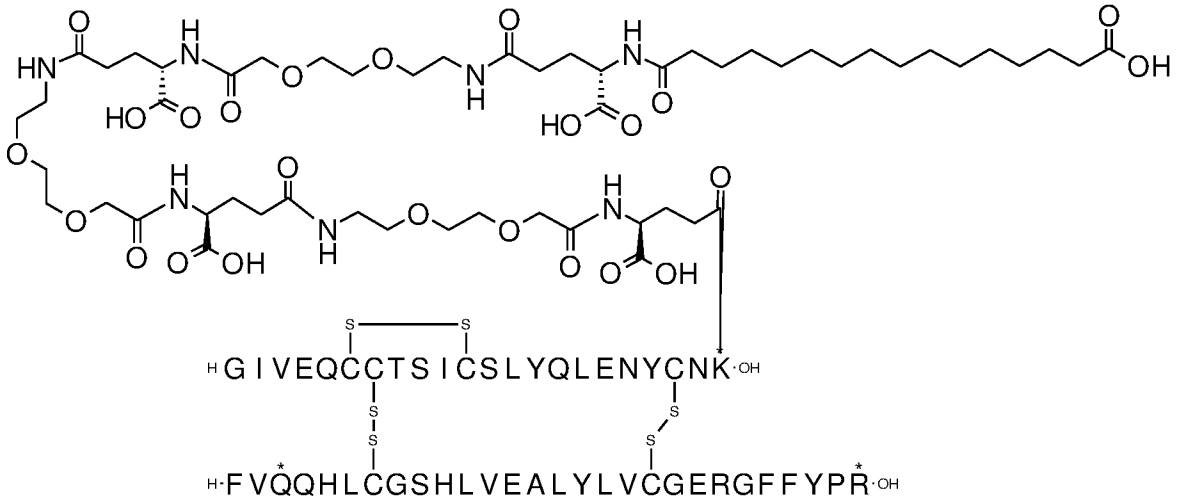
كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (التردذيذ الكهربي): m/z = 1616.6 (4/(M+4. Calc: 1615.8.

المثال 9؛ الإجراء العام (A)

B29R ،desB27 ،B3Q ،(gGlu-3x(gGlu-OEG-ول داي ديكان هكسا-(eps)N)A22K desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،GlnB3]-des-ThrB30،ThrB27-إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [(S4)-4-كربوكسي -4- [2- [2-] [(S4)-4-كربوكسي -4- [2- [2- [2-] [(S4)-4-كربوكسي -4- [2- [2- [2-] [(S4)-4-كربوكسي -4-(15-كربوكسي بنتا ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي]

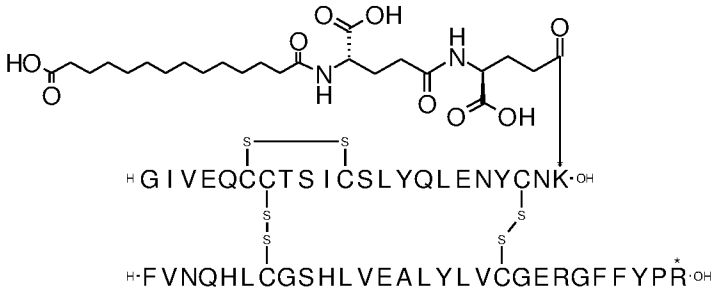
إيثوكسي] أسيتيل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل] أمينو] بيوتانويل] Lys،(B)-ببتيد.



كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1749.8 (M+4)/4. Calc: 1748.5

المثال 10؛ الإجراء العام (A)

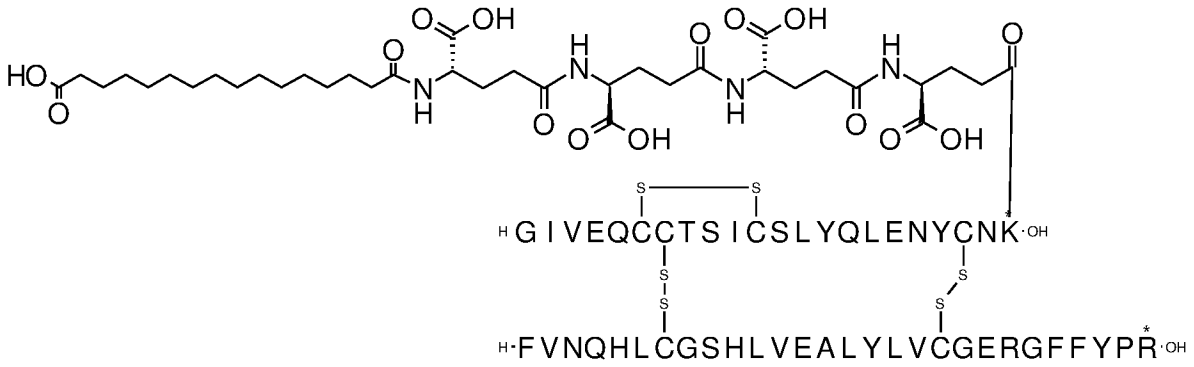
A22K(N(eps)-تترا ديكان داي ول-2xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛ IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29]، des-ThrB27،ThrB30- إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [(S4)-4-كربوكسي -4- [ ](S4)-4-كربوكسي -4-(13-كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] Lys- des-ThrB27,ThrB30- Insulin(human)-(A)-peptidyl)-N{Epsilon}[(4S)-4-carboxy-4-[[(4S)-4-carboxy-4-(13-carboxytridecanoylamino)butanoyl]amino]butanoyl]Lys-(B)، ببتيد.



كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (التردذيذ الكهربي): m/z = 1565.6 (M+4)/4. Calc: 1566.1

المثال 11؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)-هكسا ديكان داي ول-4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛ IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29]، des-ThrB27، ThrB30- إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [(S4)-4-كربوكسي -4- [[(S4)-4-كربوكسي -4- [[(S4)-4-كربوكسي -4-(15-كربوكسي بنتا ديكانويل أمينو) بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] Lys،(B)-ببتيد.

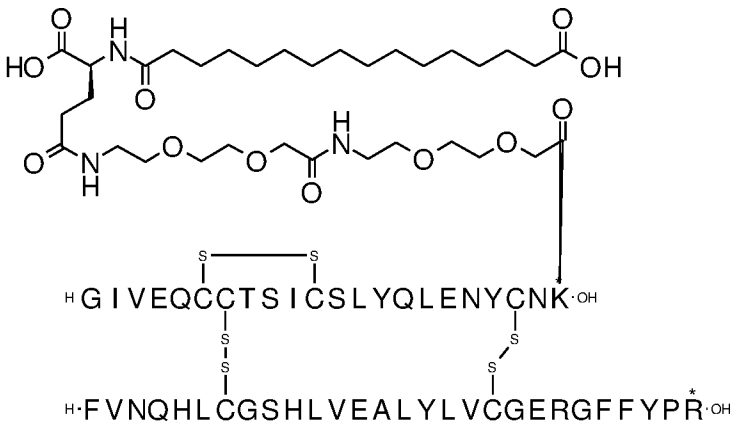


كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (التردذيذ الكهربي): m/z = 1637.4 (M+4)/4. Calc: 1636.6

المثال 12؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)-هكسا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29]، des-ThrB27، ThrB30- إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [2- [2- [[2- [2- [2- [[(S4)-4-كربوكسي -4-(15-كربوكسي بنتا ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل] Lys،(B)-ببتيد.

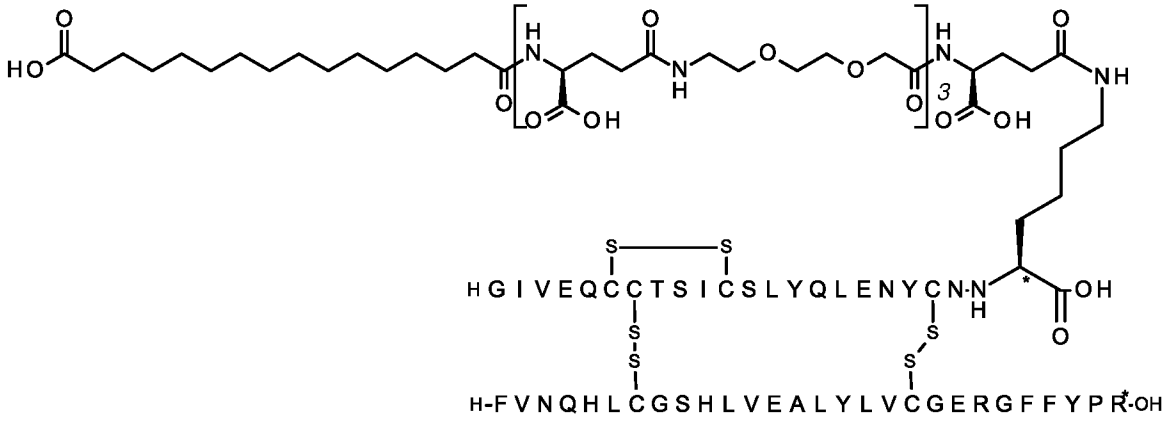


كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1613.2 (M+4)/4. Calc: 1613.4

المثال 13؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)-هكسا ديكان داي ول-(gGlu-3x(gGlu-OEG)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29]، des-ThrB27،ThrB30- إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [(S4)-4-كربوكسي -4- [-2] -2] -2] [-2] -2] -2] [(S4)-4-كربوكسي -4- [-2] -2] -2] [(S4)-4-كربوكسي -4- [-2] -2] -2] [(S4)-4-كربوكسي -4-(15-كربوكسي بنتا ديكانويل أمينو) بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] بيوتانويل] Lys،(B)-ببتيد.

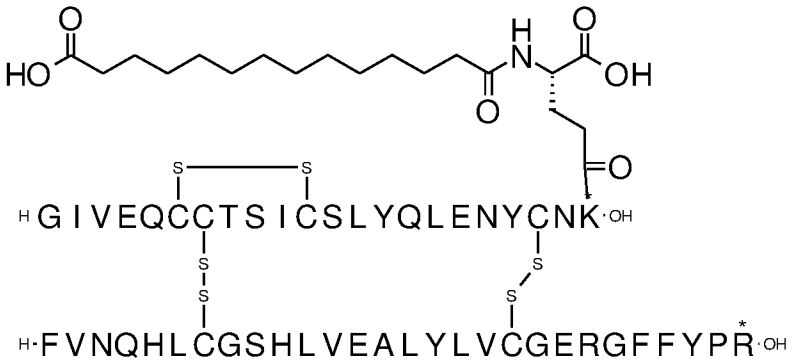


كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1746.4 (M+4)/4. Calc: 1746.5.

المثال 14؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)–تترا ديكان داي ول–gGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29]، des–ThrB27،ThrB30– إنسولين(بشري)–(A)–ببتيديل)–N{إيبسلون} [(S4)–4–كربوكسي –4–(13–كربوكسي تراي ديكانويل أمينو) بيوتانويل] Lys،(B)–ببتيد.

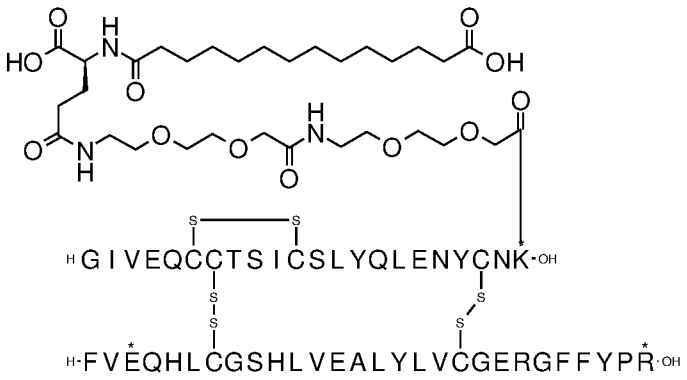


كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1533.2 (M+4)/4. Calc: 1533.8

المثال 15؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)–تترا ديكان داي ول–2xOEG–gGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،GluB3]، des–ThrB27،ThrB30–إنسولين(بشري)–(A)–ببتيديل)–N{إيبسلون} [–2] [–2] [–2] [–2] [–2] [–2] [–2] [–2] [(S4)–4–كربوكسي –4–(13–كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو [إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل Lys [،(B)–ببتيد.

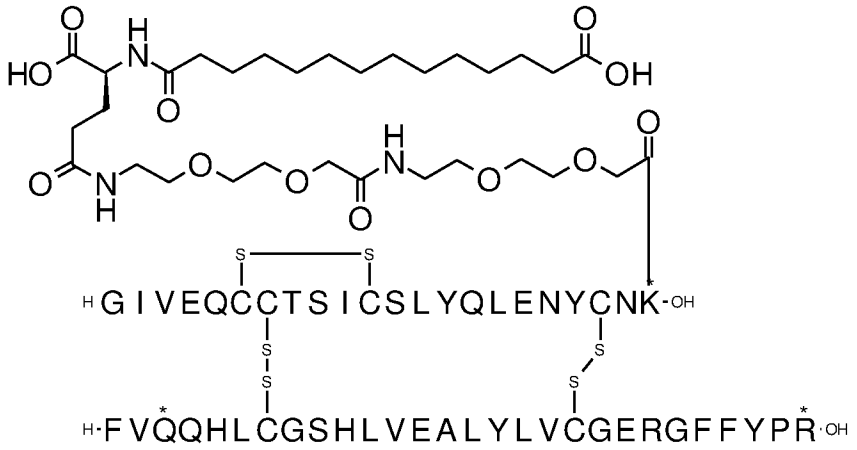


كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1610.7 (M+4)/4. Calc: 1610.1

المثال 16؛ الإجراء العام (A)

desB30 ،B29R ،desB27 ،B3Q ،(gGlu–2xOEG–تترا ديكان داي ول–(eps)N)A22K إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،GlnB3]، des–ThrB30،ThrB27–إنسولين(بشري)–(A)–ببتيديل)–N{إيبسلون} [2– [2– [2–] [2– [2– [2–] [2– [2– [2–] [(S4)–4–كربوكسي –4–(13–كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل] Lys،(B)–ببتيد.

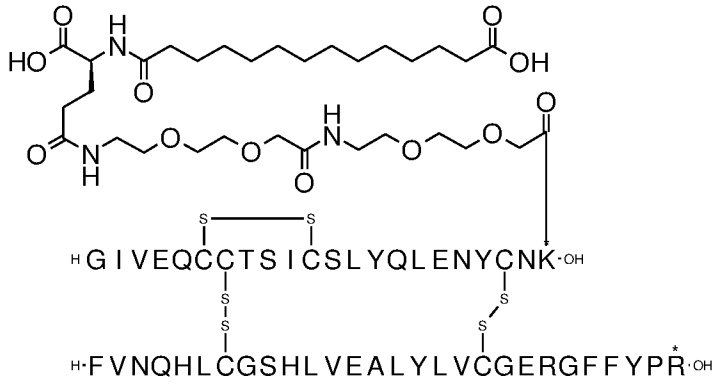


كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1609.7 (M+4)/4. Calc: 1609.9

المثال 17؛ الإجراء العام (A)

desB30 ،B29R ،desB27 ،(2xOEG–تترا ديكان داي ول–(eps)N)A22K إنسولين بشري؛

-ThrB30،ThrB27-des ،[ArgB29]){ألفا}N :الاسم (IUPAC نوع ،OpenEye) IUPAC
إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [2- [2- [2- [2- [2- [2- [(S4)-4-كربوكسي
-4-(13-كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو]
إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل] Lys،(B)-ببتيد.

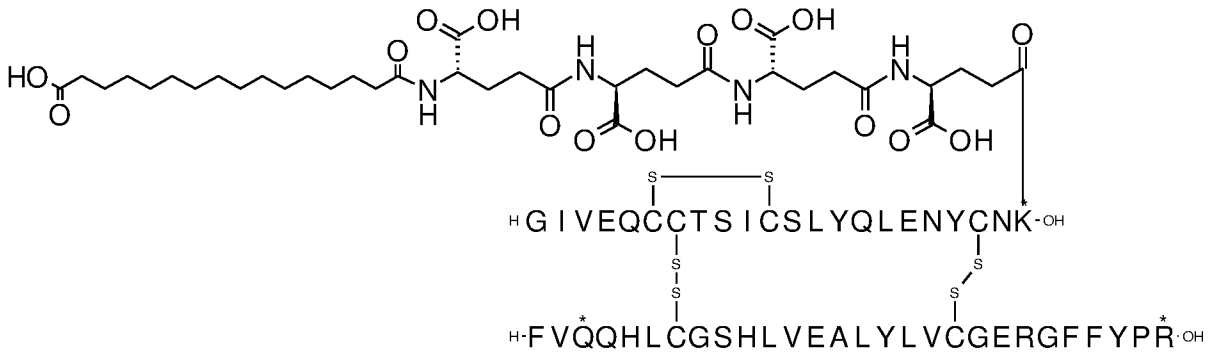


كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1606.3 (M+4)/4. Calc:
1606.4

المثال 18؛ الإجراء العام (A)

desB30 ،B29R ،desB27 ،B3Q ،(4xgGlu-هكسا ديكان داي ول-(eps)N)A22K
إنسولين بشري؛

-des ،[ArgB29،GlnB3]){ألفا}N :الاسم (IUPAC نوع ،OpenEye) IUPAC
ThrB30،ThrB27-إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [(S4)-4-كربوكسي -4-]
[(S4)-4-كربوكسي -4- [[(S4)-4-كربوكسي -4-] [(S4)-4-كربوكسي -4-(15-
كربوكسي بنتا ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل]
Lys،(B)-ببتيد.

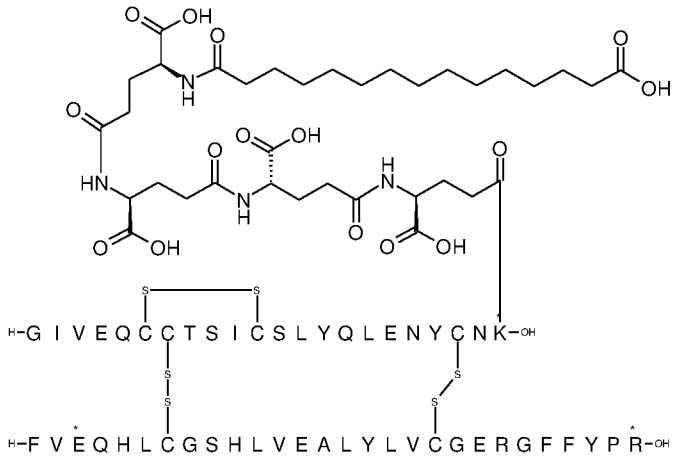


كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (التزذيذ الكهربي): m/z = 1640.9 (M+4)/4. Calc: 1641.1

المثال 19؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)–بنتا ديكان داي ول–(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،GluB3]–des–ThrB30،ThrB27–إنسولين(بشري)–(A)–ببتيديل)–N{إيبسلون} [(S4)–4–كربوكسي –4– [(S4)–4–كربوكسي –4–] [(S4)–4–كربوكسي –4–] [(S4)–4–كربوكسي –4–(14–كربوكسي تترا ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] Lys،(B)–ببتيد.



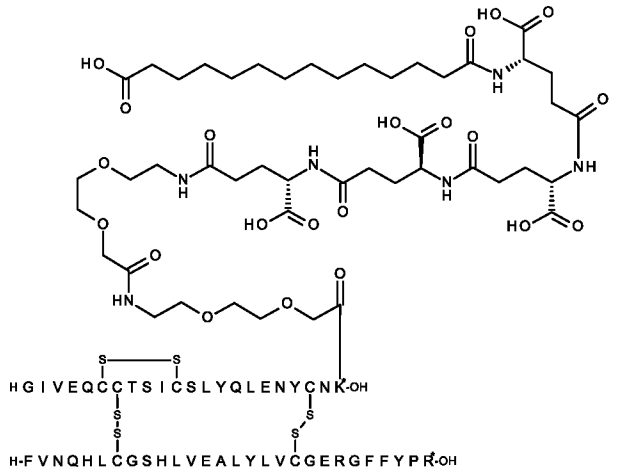
كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (التزذيذ الكهربي): m/z = 1637.63 (M+4)/4. Calc: 1636.76

المثال 20؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)–تترا ديكان داي ول–2xOEG–(4xgGlu)، B29R، desB27، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29]–des–ThrB30،ThrB27–إنسولين(بشري)–(A)–ببتيديل)–N{إيبسلون} [–2] [–2] [–2]] –2] –2] –2]] –2] –2] –2] [(S4)–4–كربوكسي –4–] [(S4)–4–كربوكسي –4–] [(S4)–4–كربوكسي –4–(13–

كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل] أمينو] إيثوكسي] -إيثوكسي] أسيتيل] Lys،(B)-ببتيد.

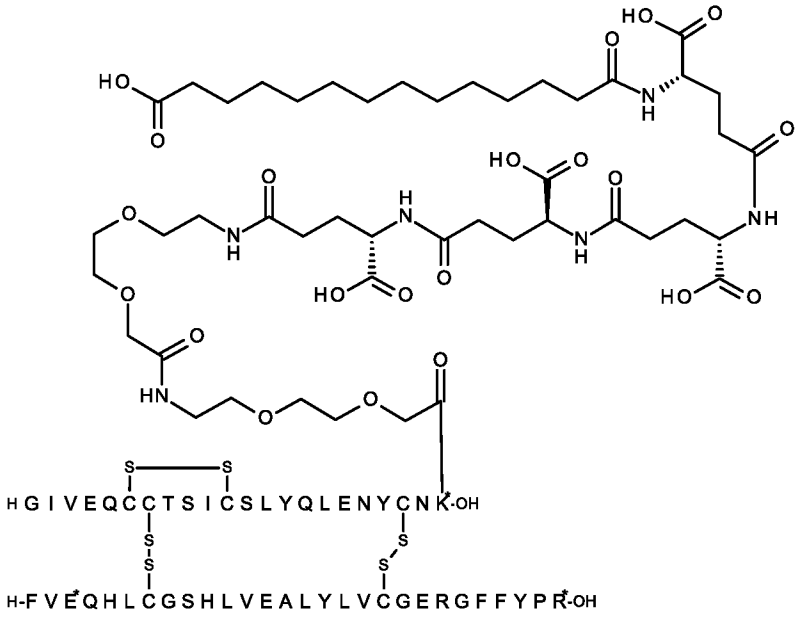


كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1703.0 (M+4)/4. Calc: 1703.2

المثال 21؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)-تترا ديكان داي ول-4xgGlu-2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،GluB3]، des-ThrB30،ThrB27-إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [2- [2- [2-] [2- [2- [2-] [2- [2- [2- [(S4)]-4-كربوكسي -4- [[(S4)]-4-كربوكسي -4- [[(S4)]-4-كربوكسي -4- [[(S4)]-4-كربوكسي -4-(13-كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل] Lys،(B)-ببتيد.

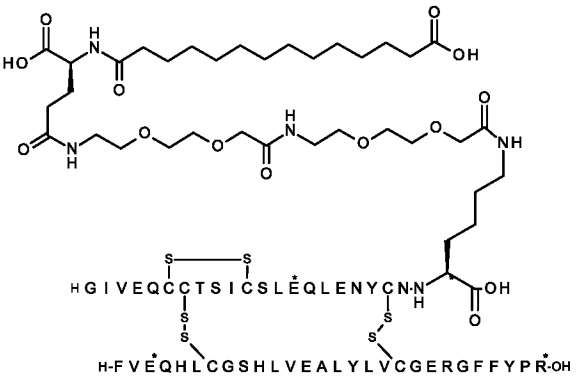


كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1706.6 (M+4)/4. Calc: 1707.0

المثال 22؛ الإجراء العام (A)

A14E، A22K(N(eps)–تترا ديكان داي ول–(gGlu–2xOEG)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،GluB3،4GluA1]، des–ThrB30،ThrB27–إنسولين(بشري)–(A)–ببتيديل)–N{إيبسلون} [2– [2– [2–] [2– [2– [2–] [2– [2– [2–] [(S4)–4–كربوكسي –4–(13–كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل [أمينو] إيثوكسي] إيثوكسي] أسيتيل] Lys،(B)–ببتيد.

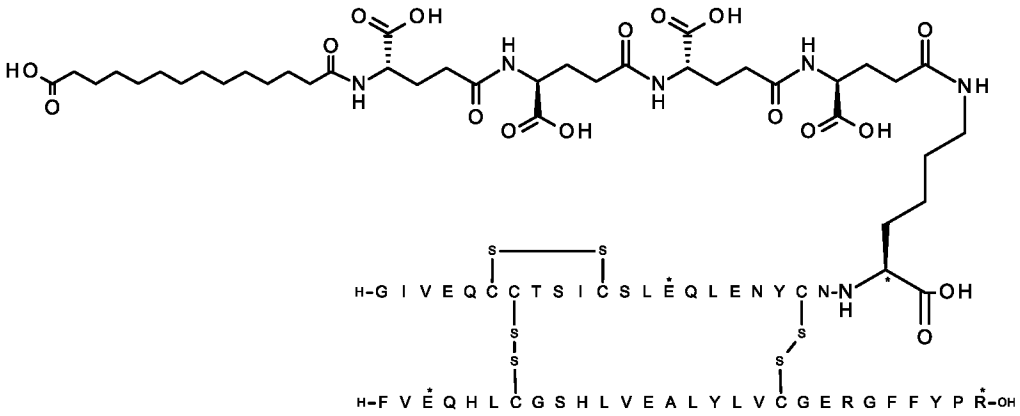


كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1601.9 (M+4)/4. Calc: 1601.6

المثال 23؛ الإجراء العام (A)

A14E، A22K(N(eps)-تترا ديكان داي ول-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

des-، [ArgB29،GluB3،4GluA1])N{ألفا}(الاسم: IUPAC نوع ،OpenEye) IUPAC [ThrB30،ThrB27-إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [(S4)]-4-كربوكسي -4- [(S4)]-4-كربوكسي -4- [(S4)]-4-كربوكسي -4- [(S4)]-4-كربوكسي -4-(13-كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] Lys،(B)-ببتيد.

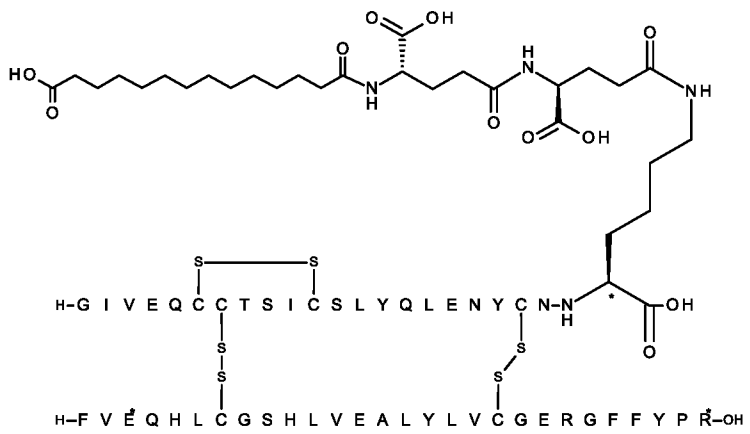


كروماتوجراف سائل -طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1625.9 (M+4)/4. Calc: 1625.8

المثال 24؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)-تترا ديكان داي ول-(2xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

des-، [ArgB29،GluB3])N{ألفا}(الاسم: IUPAC نوع ،OpenEye) IUPAC [ThrB30،ThrB27-إنسولين(بشري)-(A)-ببتيديل)-N{إيبسلون} [(S4)]-4-كربوكسي -4- [(S4)]-4-كربوكسي -4-(13-كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] Lys،(B)-ببتيد.

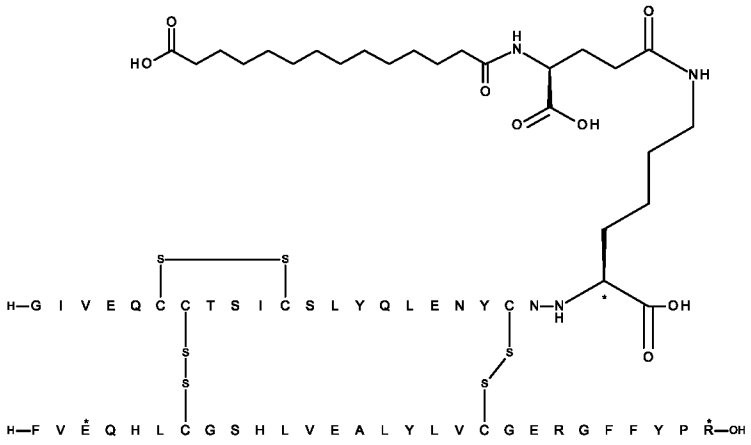


كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1537.7 (M+4)/4. Calc: 1537.5

المثال 25؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)–تترا ديكان داي ول–(gGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

IUPAC (OpenEye، نوع IUPAC) الاسم: N{ألفا}([ArgB29،GluB3]، des–ThrB30،ThrB27–إنسولين(بشري)–(A)–ببتيديل)–N{إيبسلون} [(S4)–4–كربوكسي –4–(13–كربوكسي تراي ديكانويل أمينو)بيوتانويل] Lys،(B)–ببتيد.

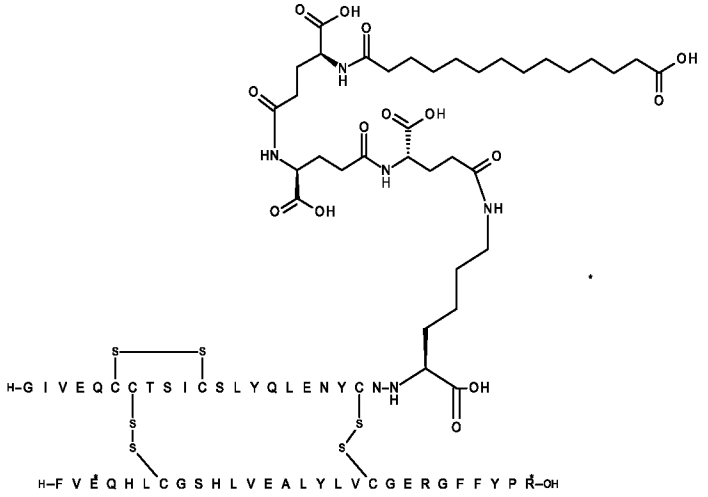


كروماتوجراف سائل –طيف كتلي (الترذيذ الكهربي): m/z = 1537.7 (M+4)/4. Calc: 1537.5

المثال 26؛ الإجراء العام (A)

A22K(N(eps)–تترا ديكان داي ول–(3xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري؛

-des ،[ArgB29،GluB3])N{ألفا} الاسم: (IUPAC نوع ،OpenEye) IUPAC
[-4- كربوكسي -4-(S4)] N-(بتيديل-(A)-(بشري)إنسولين-ThrB30،ThrB27 N{إيبسلون} [(S4)-4-كربوكسي
[(S4)-4-كربوكسي -4- [[(S4)-4-كربوكسي -4-(13-كربوكسي تراي ديكانويل أمينو
)بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] أمينو] بيوتانويل] Lys،(B)-ببتيد.



يمكن تحضير هذا النظير وفقا للطريقة الموضحة في المثال 1.

المثال 27؛ ألفة مستقبل إنسولين Insulin receptor affinity لمشتقات إنسولين مختارة وفقا للاختراع، مقاسة على مستقبلات قابلة للذوبان solubilised receptors

يتم تحديد ألفة الارتباط النسبية relative binding affinity لنظائر الإنسولين وفقا للاختراع لمستقبل إنسولين بشري بواسطة ارتباط التنافس في فحص تقارب ومضي scintillation proximity assay (SPA) (وفقا لـ Glendorf T et al. (2008) Biochemistry 47 4743-4751).

باختصار، تم تنفيذ سلاسل عمليات تخفيف dilution series لإنسولين بشري معياري ونظير الإنسولين الذي سيتم اختباره في Optiplates ذات 96 عين (Perkin-Elmer Life Sciences) متبوعة بإضافة [125I-A14Y] -إنسولين بشري، جسم مضاد فأري mouse antibody مضاد لـ مستقبل إنسولين 83-7، IR-A بشري مذاب (شبه منقاة بواسطة كروماتوجراف أكلوتينين agglutinin chromatography لجنين القمح wheat germ من خلايا كلى الهامستر baby hamster kidney (BHK) التي تعبر بشكل مفرط عن مستقبل IR-A كامل)، وكريات فحص تقارب ومضي (كريات بولي فينيل تولوين polyvinyltoluene فحص تقارب ومضي مضادة للفئران، GE Healthcare) في ارتباط المحلول المنظم مكون من 100 مل مولار اتش إى بى إى أس HEPES (رقم هيدروجيني 7.8)، 100 مل مولار NaCl، 10 مل مولار MgSO4،

و0.025٪ (حجم/حجم) Tween 20. تتم حضانة الأطباق مع الرج الرقيق لمدة 22-24 ساعة عند 22°م، ويتم الطرد المركزي عند 2000 لفة/دقيقة لمدة دقيقتين ووتم العد وتم العد على TopCount NXT (Perkin-Elmer Life Sciences).

تم تحليل البيانات من فحص تقارب ومضي وفقا للنموذج اللوجستي رباعي المتغير four-parameter logistic model (Vølund A (1978) Biometrics 34 357-365)، وقيم ألفة الارتباط للنظائر محسوبة نسبة إلى للإنسولين بشري المعياري المقاس في نفس الطبق.

يتم أيضا استخدام فحص ذو صلة حيث يحتوي ارتباط المحلول المنظم هلة 1.5٪ مصل ألبومين بشري (وزن/حجم) (Sigma A1887) لتقليد المزيد من الحالات الفسيولوجية.

تم تقديم قيم ألف مستقبل الإنسولين وغيرها من البيانات في المعمل لنظائر الإنسولين المختارة وفقا للاختراع في الجدول 1، أدناه.

المثال 28؛ قياس قيم ألفة إنسولين ومستقبل عامل نمو شبيه بإنسولين -1 لمشتقات الإنسولين المختارة وفقا للاختراع، على مستقبلات مرتبطة بغشاء membrane associated receptors

تتم تنقية مستقبل إنسولين ولمستقبل 1 لعامل النمو الشبيه بإنسولين بشرية مرتبطة بغشاء من خلايا كلى الهامستر المصابة بشكل مستقر مع ناقل pZem219B يحتوي على أي من بشري IR-A، IR-B أو وليجو IR-IGF. تم جمع خلايا خلايا كلى الهامستر وتم التجانس في المحلول المنظم المبرد بالثلج ice-cold buffer (25 مل مولار HEPES رقم هيدروجيني 7.4، 25 مل مولار CaCl2 و1 مل مولار MgCl2، 250 ملجم/لتر باكتيراسين bacitracin، 0.1 مل مولار بيفابلوك Pefablock). تم عمل طبقات من الجسيمات المتجانسة homogenates على وسادة 41٪ (وزن/حجم) سكروز وتم الطرد المركزي لمدة 75 دقيقة عند 95000 جم عند 4°م. يتم جمع أغشية البلازما plasma membranes، تم التخفيف 1:5 بالمحلول المنظم (كما هو مذكور أعلاه) وتم الطرد المركزي مرة أخرى لمدة 45 دقيقة عند 40000 جم عند 4°م. تم تعليق الكريات في أقل حجم من المحلول المنظم وتم السحب خلال إبرة (حجم 23) ثلاث مرات قبل التخزين لحين الاستخدام عند -80°م.

تم تحديد ألفة الارتباط النسبية لـ IR-A، IR-B أو لمستقبل 1 لعامل النمو الشبيه بإنسولين البشرية المرتبطة بغشاء بواسطة ارتباط التنافس في ضبط فحص تقارب ومضي. تم تنفيذ فحوص مستقبل إنسولين في نسخة مزدوجة في OptiPlates ذو 96 عين (Perkin-Elmer Life Sciences).

تتم حضانة بروتين غشاء Membrane protein مع إثارة خفيفة لـ 150 دقيقة عند 25°م مع 50 بيكومولار [125I-A14Y] -إنسولين بشري في حجم كلي بمقدار 200 ميكرولتر من المحلول المنظم للفحص (50 مل مولار HEPES، 150 مل مولار NaCl، 5 مل مولار MgSO4، 0.01٪ Triton X-100، 0.1٪ (وزن/حجم) مصل ألبومين بشري (Sigma A1887)، مثبطات بروتياز protease inhibitors خالية من إى دى تى أيه EDTA كاملة)، 50 ميكروجم من أجلوتينات لجرثومة القمح wheat germ agglutinate من كريات دقيقة PVT مطلية بـ (WGA)- (GE Healthcare) وزيادة تركيزات المركب الترابطي ligand. يتم إنهاء الفحوص بواسطة الطرد المركزي للطبق عند 2000 دورة/دقيقة لمدة 2 دقيقة والتفاعلية الإشعاعية bound radioactivity المرتبطة المقاسة بواسطة الاعتماد على TopCount NXT (Perkin-Elmer Life Sciences).

يتم تنفيذ فحوص لمستقبل 1 لعامل النمو الشبيه بإنسولين بشكل أساسي بالنسبة لفحوص ارتباط مستقبل إنسولين باستثناء أنه قد تم استخدامها لمستقبل 1 لعامل النمو الشبيه بإنسولين المرتبط بالغشاء و50 بيكومولار [125I-Tyr31] -بشري IGF-1. يتم تحليل البيانات من فحص تقارب ومضي وفقا لنموذج لوجستي رباعي المتغير (Biometrics 34 357-365 (1978) Vølund A)، ويتم حساب قيم ألفة الارتباط للنظائر التي سيتم اختبارها نسبة إلى معيار الإنسولين البشري المقاسة في نفس الطبق.

يتم تحديد مستقبل إنسولين (صورة متناظرة A) وبيانات ارتباط لمستقبل 1 لعامل النمو الشبيه بإنسولين لنظائر إنسولين المختارة وفقا للاختراع في الجدول 1، أدناه.

الجدول 1

بيانات ارتباط مستقبل إنسولين (صورة متناظرة A) ومستقبل IGF-1 لنظائر إنسولين مختارة وفقا للاختراع

المثال رقم	ألفة IR-A النسبية* (@ 0٪ مصل ألبومين بشري) (٪)	ألفة IR-A النسبية* (@ 1.5٪ مصل ألبومين بشري) (٪)	ألفة IR-A النسبية** (@ 0.1٪ مصل ألبومين بشري) (٪)	ألفة لمستقبل 1 نسبة النمو لعامل الشبيه بإنسولين النسبية*** (@ 0.1٪ مصل ألبومين بشري) (٪)	نسبة IR IGF1****
1	218.4	106.2	150.4	233.8	0.64
2	144.0	69.2	131.4	137.0	0.96
3	150.2	95.6	111.0	127.8	0.87
4	176.8	10.9	37.8	66.4	0.57
5	178.5	17.0	39.0	184.2	0.21
6	128.0	17.7	54.6	126.5	0.43
7	193.8	111.6	126.3	194.7	0.65
8	169.2	27.6	33.6	197.4	0.17
9	209.0	29.9	19.3	130.9	0.15
10	166.8	91.4	237.6	241.3	0.98
11	277.4	15.8	39.3	108.8	0.36
12	167.6	35.5	46.4	309.7	0.15
13	291.3	29.2	79.9	208.9	0.38
14	211.9	76.7	173.9	325.9	0.59
15	203.0	89.4	98.4	228.5	0.43
16	223.5	92.5	107.3	415.7	0.26
17	241.7	117.9	117.3	546.4	0.21
18	166.2	17.8	36.8	89.8	0.41

المثال رقم	ألفة IR-A النسبية* (@ 0٪ مصل ألبومين بشري) (٪)	ألفة IR-A النسبية* (@ 1.5٪ مصل ألبومين بشري) (٪)	ألفة IR-A النسبية** (@ 0.1٪ مصل ألبومين بشري) (٪)	ألفة لمستقبل 1 لعامل النمو الشبيه بإنسولين النسبية*** (@ 0.1٪ مصل ألبومين بشري) (٪)	نسبة IR IGF1****
19	166.9	52.8	75.8	118.0	0.64
20	184.4	127.8	130.5	260.1	0.50
21	99.0	132.6	74.9	151.7	0.49
22	64.9	54.5	43.6	143.3	0.30
23	84.4	44.3	38.9	90.9	0.43
24	183.5	76.6	84.3	184.3	0.46
25	188.7	68.8	65.2	225.7	0.29

*) مستقبل إنسولين بشري صورة متناظرة A مستنسخ مذاب، تم التعبير عن البيانات في ٪ نسبة إلى إنسولين بشري، البروتوكول المحدد في المثال 27.

**) مستقبل متناظر من مستقبل إنسولين بشري صورة متناظرة A مستنسخة مرتبطة بالغشاء، تم التعبير عن البيانات في ٪ نسبة إلى إنسولين بشري، البروتول المحدد في المثال 28.

***) مستقبل عامل نمو 1 شبيه بإنسوبين بشري مرتبط بالغشاء، تم التعبير عن البيانات في ٪ نسبة إلى إنسولين بشري، البروتول المحدد في المثال 28.

****) نسبة قيم ألفة IR-A إلى لمستقبل 1 لعامل النمو الشبيه بإنسولين من مستقبلات مرتبطة بالغشاء، البروتوكولات من المثال 28.

المثال 29؛ معايرة مونومر-دايمر محللة بواسطة تخفيف SEC-HPLC

تم تنفيذ سلسلة من عمليات التخفيف series of dilutions مع SEC-HPLC (استبعاد حجم كروماتوجراف سائل عالي الأداء) لتقييم معايرة مونومر-دايمر monomer-dimer equilibrium لإنسولين خالي من الزنك zinc free insulin. بواسطة حقن حجم يختلف من (2.5-80 ميكرولتر) من 0.6 مل مولار من نظير الإنسولين الذي يتم اختباره على سوبروز Superose 12 عمود 300/10 GL، وشطف مع 140 مل مولار NaCl، 10 مل مولار تريس رقم هيدروجيني 7.7 بمعدل تدفق بمقدار 0.8 مل/دقيقة، يتم تخفيف العينة بشكل نسبي عمليات مع حجم الحقن. بناء على الإزاحة في وقت الاحتجاز كوظيفة تخفيف، تم حساب اثنين من المتغيرات؛ زيادة في الوزن الجزيئي molecular weight (زيادة Mw) وانحدار R.

تم اشتقاق انحدار R كمخطط منحدر لوقت الاحتجاز في سجل مقابل (حجم حقن) حيث تم حساب زيادة الوزن الجزيئي عبر مجموعة من العينات المرجعية reference samples مثل الزيادة في الوزن الجزيئي المختلف بين حجم حقن الأقل والأعلى. يقوم كلا المتغيرين بعكس ميل نظير الإنسولين إلى الانفصال ردا على التخفيف وبالتالي، القدرة على الحصول على انفصال مونومرات monomers عند حقن sc.

تم تقديم النتاج الخاصة بعمليات التحديد وتلك الخاصة بنظائر إنسولين وفقا للفن السابق في الجداول 2-4، أدناه.

الجدول 2

الزيادة في الوزن الجزيئي (زيادة الوزن الجزيئي)

مركبات وفقا للاختراع

مركب وفقا للمثال.	انحدار R (دقيقة/ميكرولتر)	زيادة الوزن الجزيئي (٪)
1	0.05-	3.18
2	0.06-	4.29
3	0.06-	5.18
4	0.02-	1.69

7	0.03-	2.55
10	0.08-	6.01
11	0.13-	10.71

الجدول 3

الزيادة في الوزن الجزيئي (زيادة الوزن الجزيئي)

مركبات وفقا للفن السابق (البراءة الدولية 022013/2009‡)

Ex.‡ للفن السابق	انحدار R (دقيقة/ميكرولتر)	زيادة الوزن الجزيئي (٪)
إنسولين أسبارت	0.04-	3.00
إنسولين بشري	0.65-	56.0
1	0.78-	83.2
4	0.66-	68.2
5	0.52-	53.3
42	0.74-	75.8
44	0.75-	75.5
45	0.73-	71.6

أرقام المثال المحددة عبارة عن نظائر A22K معالجة بأسيل بدون حذف وحدة B27Thr بنائية (desB27) معروفة وموضحة في الفن السابق (مثلا البراءة الدولية 022013/2009).

الجدول 4

الزيادة في الوزن الجزيئي (زيادة الوزن الجزيئي)

مركبات وفقا للفن السابق (البراءة الدولية 096431/2007‡)

رقم المثال في الفن السابق.‡	انحدار R (دقيقة/ميكرولتر)	زيادة الوزن الجزيئي (٪)
11	*	*
12	0.66-	74.4

*) لا يوجد بيانات يتم الحصول عليها بسبب الذوبانية الضعيفة لنظير الإنسولين عند رقم هيدروجيني 7.4

أرقام المثال المعينة عبارة عن نظائر A22K معالجة بأسيل بدون حذف وحدة B27Thr بنائية (desB27) المعروفة والموضحة في الفن السابق (مثلا البراءة الدولية 096431/2007).

الخلاصة

تم توضيح النتائج التي تم الحصول عليها من مشتقات وفقا للاختراع ومن مشتقات وفقا للفن السابق في الجداول 5، 6، و7، أدناه.

الجدول 5

بيانات حيود الآشعة السينية صغير الزاوية من مشتقات وفقا للاختراع

المثال رقم	قطر الدوران Radius of gyration Rg ، (نانومولار)	**Dmax (نانومولار)	مونومر (٪)	دايمر (٪)	أنواع أكبر (٪)
1	1.8	6.5	80	0	20

2	24	74	4.3	1.4	2
1	30	69	4.0	1.3	4
22	0	78	6.6	1.8	10
11	26	63	5.7	1.6	11
7	27	66	5.8	1.6	7
5	39	56	5.5	1.6	18

الجدول 6

بيانات حيود الأشعة السينية صغير الزاوية من مشتقات وفقا للفن السابق (البراءة الدولية 5 ‡022013/2009)

أنواع أكبر (٪)	دايمر (٪)	مونومر (٪)	Dmax (نانومولار)	قطر الدوران، Rg (نانومولار)	المثال رقم‡
52	0	48	10	2.9	5
42	58	0	11.4	3.2	4
43	57	0	8.0	2.3	44
48	22	30	7.9	2.4	6
53	47	0	8.9	2.6	42
54	46	0	10.0	2.8	1
56	17	27	8.2	2.4	45

الجدول 7

بيانات حيود الآشعة السينية صغير الزاوية من مشتقات وفقا للفن السابق (البراءة الدولية ‡096431/2007)

المثال رقم‡	قطر الدوران، Rg (نانومولار)	Dmax (نانومولار)	مونومر (٪)	دايمر (٪)	أنواع أكبر (٪)
12	3.1	12.0	48	0	52
*11	*	*	*	*	*

*) المشتقات المرسبة في المحلول المنظم تشير إلى وجود أنواع كبيرة أو نواتج تراكم aggregates. لا يمكن الحصول على أي بيانات.

يمكن من هذه الدراسات استنتاج أن المشتقات وفقا للاختراع، عند حالات محاكاة حالات في النسيج تحت الجلد بعد الحقن، وهي أكثر عرضة للانفصال إلى مونومرات وسوف يتم امتصاصها بالتالي بشكل أسرع بعد حقن نظائر وفقا للفن السابق تحت الجلد. يتفاوت المحتوى المونومري monomeric content من 63-83٪ للنظائر وفقا للاختراع، في مقابل 0-48٪ بالنسبة لنظائر الفن السابق. يمكن استنتاج أن نظائر وفقا للفن السابق، والأنواع الجزيئية الأكبر الملحوظة أكبر في الحجم (Rg وDmax) بالإضافة إلى أنها موجودة بشكل أكبر (42-62٪ في مقابل 1-22٪ بالنسبة لنظائر وفقا للاختراع). وهذا يشير إلى منفعة النظائر للاستخدام قبل الأكل مقارنة بالنظائر وفقا للفن السابق.

المثال 30؛ مستحضر من المستحضرات الصيدلانية

يمكن صياغة المستحضرات الصيدلانية وفقا للاختراع الحالي كمحلول مائي. يتم صنع المحلول المائي بشكل متواتر، مثلا، مع كلوريد صوديوم و/أو جليسرول. علاوة على ذلك، يمكن أن يحتوي الوسط المائي aqueous medium على المحاليل المنظمة buffers والمواد الحافظة. يتم تعديل قيم الرقم الهيدروجيني إلى القيم المطلوبة ويمكن أن تكون ما بين حوالي 3 إلى حوالي 8.5، ما بين حوالي 3 وحوالي 5، أو حوالي 6.5، أو حوالي 7.4، أو حوالي 7.5، اعتمادا على النقطة الكهربية المتواترة isoelectric point، pI، لنظير الإنسولين محل الاستفهام.

مستحضر من صيغ الإنسولين الخالية من الزنك

تم تحليل نظائر إنسولين خالية من الزنك في محلول مائي، وحيث احتوت الصياغة النهائية 0.6 مل مولار من نظير الإنسولين، 16 مل مولار m-كريسول، 16 مل مولار فينول، 7 مل مولار من داي صوديوم فوسفات disodium phosphate، كميات مناسبة من نيكوتيناميد وجليسرول، وتم تعديل الرقم الهيدروجيني إلى 7.3-7.5 (تم القياس عند درجة حرارة وتم ترشيح المحلول بشكل معقم خلال مرشح filter 0.2 ميكرومتر. تم ملء الصيغة في أوعية سعة 2 مل وتم الإحكام باستخدام أغطية متغضنة crimp caps.

الجدول 8

التركيبات المثالية من مستحضرات الانسولين

	المثال رقم	مشتق إنسولين (مل مولار)	فينول (مل مولار)	m-كريسول (مل مولار)	نيكوتيناميد (مل مولار)	جليسرول (٪ وزن/حجم)	فوسفات (مل مولار)	رقم هيدروجيني
A	2	0.6	16	16	-	1.8	7	7.4
B	2	0.6	16	16	80	1.3	7	7.4
C	2	0.6	16	16	170	0.7	7	7.4
D	7	0.6	16	16	-	1.8	7	7.4
E	7	0.6	16	16	80	1.3	7	7.4
F	7	0.6	16	16	170	0.7	7	7.4
G	4	0.6	16	16	-	1.8	7	7.4
H	4	0.6	16	16	80	1.3	7	7.4
I	4	0.6	16	16	170	0.7	7	7.4
J	180	0.6	16	16	170	0.7	7	7.4

المثال 31؛ فحص تليف ثيوفلافين T Thioflavin T (ThT) لتقييم الثبات الفيزيائي لصيغ البروتين يمكن أن يؤدي الثبات الفيزيائي المنخفض لببتيد إلى تكوين ألياف نقوية amyloid fibril formation، والتي تمت ملاحظتها كبنيات جزيئية دقيقة شبه محززة thread-like macromolecular structures مرتبة في العينة التي تؤدي أخيرا إلى تكوين الجل. يتضمن ثيوفلافين T أثر تألق متميز عند الارتباط بالألياف [Naiki et al. (1989) Anal. Biochem. 177 244-249; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309 274-284].

يتم اقتراح تكوين المركب الوسيط المطبق جزئيا للببتيد كآلية بدء عامة للتليف. بعض هذه المركبات الوسيطة تقوم بتكوين أنوية في قالب يمكن عليه تجميع المركبات الوسيطة وإجراءات التليف. تتناظر عملية التأخر في الزمن مع الفاصل حيث يتم تكوين الكتلة الحركة للفاصل وثابت المعدل الواضح هو معدل تكوين الليف نفسه (الشكل 1).

تحضير العينة

تم تحضير العينات قبل كل فحص. تم خلط العينات من كل تركيبة مع محلول ثيوفلافين T مائي (0.1 مل مولار ثيوفلافين T) في معدل حجم بمقدار 990:10 وتم النقل إلى طبق معايرة دقيقة microtiter plate ذو 96 عين (Packard Opti-Plate™-96، بولي ستيرين polystyrene أبيض). عادة، تم وضع أربعة أو ثمانية من مستنسخات كل عينة (تناظر حالة اختبارية واحدة) في عمود واحد من العيون. تم إحكام الطبق بـ Scotch 15 Pad (Qiagen).

الحضانة وقياس التألق

تم تنفيذ عملية الحضانة عند درجة الحرارة، ورج وقياس انبعاث تألق ثيوفلافين T في قارئ طبق متألق Fluoroskan Ascent FL أو قارئ الطبق Varioskan (Thermo Labsystems). تم تعديل درجة الحرارة إلى 37°م. تم تعديل الرج الدوار إلى 960دورة/دقيقة مع زيادة بمقدار 1 ملم في كل البيانات المقدمة. تم تنفيذ قياس التألق باستخدام الإثارة خلال مرشح 444 نانومتر وقياس الانبعاث خلال مرشح 485 نانومتر. وقد تم بدء كل دورة بواسطة حضانة الطبق عند درجة حرارة فحص لمدة 10 دقائق. تم قياس الطبق كل 20 دقيقة لمدة تصل إلى 45 ساعة. ما كل قياس، تم رج الطبق وتم التسخين كما هو مبين.

التعامل مع البيانات

تم توليد مخططات التألق في مقابل الزمن في Microsoft Excel وتم تقدير التأخر الزمني كنقطة الحصر بين التقارب الخطي لمنطقة التأخر ومنطقة التليف كما هو موضح في الأشكال 14أ، 14ب و14ج (الشرح 1أ، 1ب و1ج، على التوالي). هناك زيادة في التأخر الزمني يناظر زيادة في الثبات الفيزيائي. نقاط البيانات بشكل مثالي عبارة عن متوسط أربعة أو ثمانية عينات.

تم توضيح النتاج التي تم الحصول عليها لنظائر A22K معالجة بأسيل إذا كان الاختراع، ونظائر A22K معالجة بأسيل المشابهة وفقا للفن السابق بدون حذف وحدة B27Thr بنائية (desB27)، في الجدول 8، أدناه.

الجدول 8

الثبات الفيزيائي المقاس بالتأخر الزمني ثيوفلافين T لمستحضرات خالية من الزنك

رقم المثال	الصياغة	التأخر الزمني (h) في فحص ثيوفلافين T	آر أس دى RSD (٪)
2	A	26.7	27
2	B	34.9	16
2	C	42	6
4	D	43.5	5
4	E	45	*
4	F	45	*
7	G	26.3	20
7	H	20.2	31
7	I	15	15
18	J	14	17

البراءة الدولية 022013/2009 المثال 5	-	15.0	17
البراءة الدولية 096431/2007 المثال 12	-	4.7	17

* لا يوجد تليف في الدورة الزمنية لفحص ثيوفلافين T

يتم استنتاج أن نظائر إنسولين A22K معالج بأسيل وفقا للاختراع تبين ثبات أفضل أو مشابه تجاه التليف (أي لها ثبات فيزيائي متزايد) في صيغة خالية من الزنك كل منها مع وبدون نيكوتيناميد مضاف أكثر من النظائر المضافة وفقا للفن السابق. وهذا مدهش جدا حيث تشير بيانات التخفيف حيود الآشعة السينية صغير الزاوية وSEC-HPLC إلى أن نظائر الإنسولين وفقا للاختراع أصغر في الحجم (أي مكونة من مونومرات ودايمرات dimers) وقد يتوقع الشخص الخبير أنها سوف تؤدي إلى ثبات فيزيائي أقل.

المثال 32؛ تحليل من إنسولين الثبات الكيماوي

استبعاد حجم كروماتوجراف

الصيغ المستخدمة: انظر المثال 31

تم تنفيذ عملية تحديد كمي لبروتين ذو وزن وزن جزيئي عالي ومونومر نظير الإنسولين monomer insulin analogue على عمود Waters Acquity BEH200 SEC (150 x 2.4 ملم، الجزء رقم 186005225) مع شطافة تحتوي على 55٪ (حجم/حجم) أسيتونيتريل، 0.05٪ حمض تراي فلورو أسيتيك عند معدل تدفق بمقدار 0.2 مل/دقيقة و درجة حرارة عمود بمقدار 40°م. تم تنفيذ عملية الكشف بواسطة جهاز كشف امتصاص قابل للضبط tuneable absorbance detector (Waters Acquity TUV) عند 215 نانومتر. كان حجم الحقن 1.5 ميكرولتر من كل من صيغ نظير الإنسولين 600 ميكرومولار و600 ميكرومولار إنسولين بشري معياري. تمت حضانة كل

مستحضر نظير عند 5، 25 و37°م في أوعية سعة 2 مل. عند أزمنة محددة تم قياس بروتين ذو وزن وزن جزيئي عالي ومحتوى المستحضرات. تم توضيح النتائج في الجدول 9، أدناه.

الجدول 9

محتوى بروتين ذو وزن وزن جزيئي عالي بواسطة التخزين عند 37°م

الأسابيع عند 37°م	رقم المثال 2			رقم المثال 4			رقم المثال 7			المثال رقم 18	البراءة الدولية 2009/022013 المثال رقم 5
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	-
0	0.5 ٪	0.1 ٪	0.1 ٪	0.5 ٪	0.2 ٪	0.2 ٪	1.9 ٪	0.1 ٪	0.1 ٪	٪0.5	٪3.3
2	0.6 ٪	0.2 ٪	0.2 ٪	0.7 ٪	0.4 ٪	0.4 ٪	2.5 ٪	0.5 ٪	0.5 ٪	٪1.1	٪4.9
4	0.8 ٪	0.3 ٪	0.3 ٪	1.0 ٪	0.5 ٪	0.5 ٪	4.1 ٪	0.7 ٪	0.7 ٪	*	٪13.1
8	2.3 ٪	*	*	2.2 ٪	*	*	6.8 ٪	*	*	*	٪29.1

*غير محدد

سوف يتم استنتاج أن تكوين بروتينات ذات وزن جزيئي عالية high molecular weight proteins (HMWP) بواسطة التخزين في صيغة خالية من الزنك عند 37°م أقل جدا بالنسبة لمشتقات إنسولين وفقا للاختراع (تكوين ما يصل إلى 6.8٪ بروتين ذو وزن وزن جزيئي عالي بعد 8 الأسابيع التخزين لمركبات إنسولين وفقا للاختراع وفقا للأمثلة 2، 4 و7، على التوالي)، حيث يؤدي مشتق إنسولين مشابه وفقا للفن السابق إلى تكوين 29.1٪ بروتين ذو وزن وزن جزيئي عالي). سوف

يتم استنتاج أن مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع تشكل مستويات منخفضة من بروتين ذو وزن وزن جزيئي عالي في صيغة خالية من الزنك وفي وجود نيكوتيناميد عند التخزين عند 37°م.

كروماتوجراف طور عكسي Reverse Phase Chromatography (UPLC)

تم تنفيذ عملية تحديد الشوائب المتعلقة بالإنسولين على نظام كروماتوجراف طور عكسي باستخدام عمود Kinetex Phenomenex C18، بحجم 150x2.1 ملم، بحجم جسيم 1.7 ميكرومتر، وحجم مسام 100 آنجستروم (جزء Phenomenex بمقدار 00F-4475-AN)، مع معدل تدفق بمقدار 0.3 مل/دقيقة عند 50°م ومع الكشف عن UV عند 215 نانومتر. تم تنفيذ الشطف بطور منقول يتكون مما يلي: A: 10٪ (حجم/حجم) أسيتونيتريل، 0.09 مولار داي-أمونيوم هيدروجين فوسفات di-ammonium hydrogen phosphate، رقم هيدروجيني 3.6، وB: 80٪ (حجم/حجم) أسيتونيتريل. تدريج: تغير خطي 0-7 دقيقة من 15٪ B إلى 26٪ B، 7-34 تغير خطي إلى 40٪ B، 34-36 دقيقة تغير خطي يصل إلى 80٪ B لغسل العمود، قبل الإعادة إلى الحالات الأولية عند 39 دقيقة 15٪ B. تم تحديد كمية الشوائب كمنطقة امتصاص مقاسة بالنسبة المئوية لمنطقة الامتصاص الكلية المحددة بعد شطف المواد الحافظة. تمت حضانة كل نظير مستحضر analogue preparation عند 5، 25 و37°م في أوعية سعة 2 مل. عند أزمنة محددة تم قياس الشوائب المتعلقة بالإنسولين insulin related impurities للمستحضرات. تم توضيح النتائج في الجدول 10، أدناه.

الجدول 10

النقاء بواسطة التخزين عند 37°م

البراءة الدولية /2009 022013 المثال رقم 5	المثال رقم 18	رقم المثال 7	رقم المثال 4	رقم المثال 2	الأسابيع عند 37°م

الصيا غة	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	-
0	95.٪2	98.٪1	97.٪8	92.٪0	95.٪7	95.٪4	84.٪1	98.1٪3	98.٪0	92.٪9	٪88.4
2	93.٪8	96.٪8	96.٪6	90.٪5	94.٪8	95.٪1	79.٪7	95.6٪	95.٪5	90.٪0	٪36.3
4	93.٪2	94.٪4	94.٪3	89.٪3	92.٪3	92.٪1	76.٪4	93.2٪	92.٪7	*	٪16.1
8	87.٪5	*	*	86.٪5	*	*	69.٪1	*	*	*	٪4.1

*غير محدد

سوف يتم استنتاج أن مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع أكثر استقرارا في الصيغة بدون زنك من نظير معالج A22K بأسيل مشابهة وفقا للفن السابق. النظائر وفقا للفن السابق غير مستقرة بحيث يكون أقل من 5٪ (تناظر أقل من نقاء 84٪ من نقطة) للمشتق سليما بعد 8 أسابيع من التخزين عند 37°م. نظائر الإنسولين وفقا للاختراع (الممثلة بواسطة المركبات وفقا للأمثلة 2، 4 و7) لها أقل من 7.7، 5.5 و15٪ فقد في نقاط النقاء، على التوالي، بعد 8 أسابيع من التخزين عند 37°م. يمكن استنتاج أيضا أن مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع تكون مستقرة في صيغة خالية من الزنك مع نيكوتيناميد المضاف.

المثال 33؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد في خنازير أل واى دى LYD

يمكن اختبار مشتقات الإنسولين وفقا للاختراع بواسطة الإعطاء تحت الجلد إلى الخنازير، مثلا مقارنة بإنسولين أسبارت (NovoRapid) في الصيغة التجارية أو مقارنة مع نظائر إنسولين A22K معالج

بأسيل مشابهة وفقا للفن السابق وفقا لهذا البروتوكول. يمكن اختبار المشتقات للمتغيرات الصيدلانية الحركية و/أو الصيدلانية الديناميكية.

الطرق العامة المستخدمة

الفحص بالموجات الصوتية Ultrasound examination وتعليم منطقة الحقن injection area أثناء التعقيم لوضع القساطر الوريدية الدائمة permanent intravenous catheters، يتم فحص الخنازير بواسطة الموجات الصوتية مع وماسح الموجات الصوتية Esaote ultrasound scanner "MyLabFive" ونوع المسبار "LA435 6-18 ميجا هرتز". تم تحديد المنطقة المتوسطة بين الأذن والعظم الكتفي scapula، على الجانب الأيمن أو الأيسر (في مقابل القسطرة catheter)، منقطة بمساحة 2 x 2 سم بدون تحديد العضلة (مناسبة للحقن تحت الجلد) وتم تعليمها بواسطة وشم.

مخطط التغذية

تم صيام الخنازير (أي بدون إفطار) قبل الاختبار.

بالتالي كانت الخنازير في حظائرها الطبيعية طوال التجربة ولم يتم تعقيمها. تم صيام الخنازير لحين الحصول على عينات دم بعد 12 ساعة، ولكن مع وصول حر للماء. بعد جمع عينة الدم عند 12-ساعة تمت تغذية الخنازير.

الجرعات

تم تركيب Penfill في NovoPen®4. تم استخدام إبرة جديدة لكل خنزير. تم استخدام جها إيقاف إبرة needle stopper لضمان أقصلا اختراق إلى 5 ملم تحت الطبقة الجلدية epidermis. تم حساب حجم الجرعة (حجم آى يو IU) وتمت ملاحظة كل خنزير.

حجم الجرعة (U) = ((الوزن x الجرعة بالنانومول/كجم)/مركز نانومول/ملل) x 100 وحدة/ملل

تم إعطاء الخنزير جرعة تحت الجلد جانبيا على الجانب الأيمن أو الأيسر (في مقابل القسطرة) من العنق ويتم الحفاظ على الإبرة تحت الجلد لمدة لا تقل عن 10 ثواني بعد الحقن لضمان تحلل المركب.

علاج نقص السكر في الدم

بعد إعطاء الجرعات تحت الجلد subcutaneous dosing، يمكن أن يكون محلول الجلوكوز glucose solution جاهزا للحقن عبر الوريد لمنع نقص السكر في الدم، أي 4-5 سرنجات (20 ملل) مع جلوكوز معقم 20٪، جاهز للاستخدام. تشخيص نقص السكر في الدم يقوم على الأعراض الأساسية وقياسات جلوكوز الدم على مقياس جلوكوز glucometer (Glucocard X-meter).

يتكون العلاج من حقن عبر الوريد بطيئة بمقدار 50-100 مل 20٪ جلوكوز (10-20 جم جلوكوز). يتم تحديد الجلوكوز بالأجزاء على مدار 5-10 دقائق لحين التنفيذ.

عينات الدم

تم فحص قدرة قساطر الرقبة jugular catheters قبل الاختبار بمحلول معقم من 0.9٪ NaCl بدون إضافة 10 وحدة مكثفة/ملل هيبارين heparin.

قبل وبعد الجرعة، سوف يتم أخذ عينات الدم في من القسطرة الوريدية المركزية central venous catheter عند النقاط الزمنية التالية:

قبل الجرعة (-10، 0)، 3، 6، 9، 12، 15، 20، 30، 45، 60، 90، 120، 150، 180، 240، 300، 360، 420، 480، 540، 600 و720 دقيقة

يتم أخذ العينات بأداة ثلاثية التفريعات وبها سدادة 3-way stop-cock تم سحب 4-5 مل من مخلفات الدم وتم التخلص منها قبل أخذ العينة.

تم جمع عينات الدم بمقدار 0.8 مل في أنابيب مغطاة بـ EDTA لتحليل الجلوكوز والإنسولين.

بعد كل عينة دم، يتم نضح القسطرة بـ 5 مل من 0.9٪ NaCl معقم بدون إضافة 10 وحدة مكثفة/ملل هيبارين.

تتم إمالة الأنبوب برفق لمدة 10 ثواني لضمان الخلط المناسب للدم ومضاد التخثر anticoagulant (EDTA) وبعد دقيقة يتم وضعه على ذلك رطب. يتم لف الأنابيب لمدة 10 دقائق عند 3000 دورة/دقيقة و4°م لمدة ساعة بعد أخذ العينات. يتم تخزين العينات على ثلج رطب لحين وضعها في القطارة.

هناك حاجة لتقنية تطهير مطلوبة لتجنب النمو البكتيري bacterial growth في القسطرة مع خطر انسداد متزايد.

الكشف عن القساطر بعد الاختبار

إذا تم تنفيذ عمليات أخذ عينات الدم باستخدام تقنية مطهرة aseptic technique، يمكن إعطاء علاج وريدي intravenous treatment واحد مع 1 مل لكل 10 كجم من Pentrexyl® (1 جم من أمبيسيللين مذاب في 10 مل NaCl 0.9٪) ببطء عبر الوريد عبر القسطرة التي تم استخدامها لأخذ عينات الدم. بعد هذا العلاج، تم نضح القسطرة بـ 10 مل من NaCl 0.9٪.

تم نضح القساطر Catheters بـ 5 مل من NaCl 0.9٪ معقم مضاف إليه هيبارين (10 وحدة مكثفة/ملل). يتم غلق القساطر بقفل ليور مع غشاء حقن لاتكس latex injection membrane وتم حقن 1.0 مل من TauroLockHep500 خلال الغشاء كقفل للقسطرة.

تحليل عينات الدم

جلوكوز البلازما: تم وضع 10 ميكرلتر من البلازما في قطارة في 500 ميكرو لتر من المحلول المنظم لقياس تركيز جلوكوز في البلازما في تحليل BIOSEN الذاتي.

البلازما إنسولين: يتم وضع 1 x 50 ميكرولتر من البلازما في القطارة في أنابيب سعة 0.65 مل Micronic® (تهيئة /ELISA/LOCIفحص تقارب ومضي) لتحليل، باستخدام أي من ELISA أو كروماتوجراف سائل –طيف كتلي.

يتم تخزين البلازما مجمدة عند –20°م.

المثال 34؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد لمشتق الإنسولين وفقا للمثال 1 في خنازير LYD

بعد الإجراء العام المذكور أعلاه، تم الحصول على هيئات الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) والخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) التالية لمشتق الإنسولين وفقا للمثال 1.

الصيغ المستخدمة

مشتق إنسولين وفقا للمثال 1، رقم هيدروجيني=7.4؛ 609 ميكرومولار؛ 1.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 30 مل مولار فينول (0 Zn/هكسامر hexamer).

إنسولين أسبارت، الصيغة التجارية، 600 ميكرومولار؛ 1.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 7 مل مولار فوسفات؛ 10 مل مولار كلوريد صوديوم؛ 300 ميكرومولار زنك أسيتات zinc acetate؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول.

تم تقديم هذه النتائج في الأشكال 1-4 وفي الجدول 11، أدناه.

الجدول 11

المتغيرات الحركية الديناميكية (متوسط ±SD)

مركب		Tmax a (د)	Cmax/D (بيكومولار/ (نانو مول/كجم)	AUC/D بيكومولار * دقيقة/ (بيكومول/ كجم)	٪ extrap*	T½b (د)	متوسط وقت البقاء (د)
المثال 1 0 Zn/هكسامر	متوسط	11	1212	122	2	116	165
1 نانومول/كجم (8n=)	SD		456	25		10	20
NovoRapid® 0.5 نانومول/كجم (8n=)	متوسط	11	1277	67	2	67	93
	SD		788	26		16	19
NovoRapid® 1 نانومول/كجم (8n=)	متوسط	14	880	64	2	75	110
	SD		335	20		7	11

a Tmax محدد كمتوسط

b T½ محدد كمتوسط تجانسي pseudoSD harmonic mean±

c الإتاحية الحيوية المحسوبة بناء على بيانات الوريد (غير مبين)

الاستنتاج

سوف يتم اعتبار أن مشتق إنسولين وفقا للمثال 1 في الصيغة بدون زنك لها حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) مشابهة مثل إنسولين أسبارت (NovoRapid®) الصيغة التجارية.أيضا، متوسط وقت الاحتجاز لمشتق الإنسولين هذا كان بمقدار 165 دقيقة. يمكن استنتاج أن مشتق الإنسولين وفقا للمثال 1 مفيدة كإنسولين سريع الأكل (قبل الأكل).

المثال 35؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد من مشتق الإنسولين وفقا للمثال 2 في خنازير LYD

بعد الإجراء العام أعلاه، تم الحصول على حالات الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) والخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) التالية لمشتق الإنسولين وفقا للمثال 2.

الصيغ المستخدمة

مشتق إنسولين وفقا للمثال 2، رقم هيدروجيني=7.367؛ 607 ميكرومولار؛ 1.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 30 مل مولار فينول (0 Zn/هكسامر).

إنسولين أسبارت، الصيغة التجارية، 600 ميكرومولار؛ 1.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 7 مل مولار فوسفات؛ 10 مل مولار كلوريد صوديوم؛ 300 ميكرومولار زنك أسيتات؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول.

تم تقديم هذه النتائج في الأشكال 4-5 وفي الجدول 12، أدناه.

الجدول 12

المتغيرات الحركية الديناميكية (متوسط ±SD)

مركب		Tmax a (د)	Cmax/D (نانومولار/ بيكومول/كجم)	AUC/D بيكومولار *دقيقة/ (بيكومول/ كجم)	extrap%	T½b (د)	متوسط وقت البقاء (د)
المثال 2 0 Zn/هكسامر 1 نانومول/كجم (7n=)	متوسط	45	762	68	5	64	111
	SD		342	9		15	21
NovoRapid 0.5 نانومول/كجم (7n=)	متوسط	30	923	60	2	53	92
	SD		510	8		15	10
NovoRapid 1 نانومول/كجم (6n=)	متوسط	25	771	64	1	53	98
	SD		254	16		15	28

a Tmax محدد كمتوسط

b T½ محدد كمتوسط تجانسي ±pseudoSD

c الإتاحية المحسوبة بناء على بيانات الوريد (غير مبين)

الاستنتاج

سوف يتم اعتبار أن مشتق إنسولين وفقا للمثال 2 في الصيغة بدون زنك لها حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص

الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) مشابهة مثل إنسولين أسبارت. أيضا، متوسط وقت الاحتجاز لمشتق الإنسولين هذا كان بمقدار 111 دقيقة، لم تكن مختلفة بشكل كبير عن تلك الخاصة بـ NovoRapid® (إنسولين أسبارت). يمكن استنتاج أن مشتق الإنسولين وفقا للمثال 2 مفيدة كإنسولين سريع الأكل (قبل الأكل).

المثال 36؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد من مشتق الإنسولين وفقا للمثال 11 في خنازير LYD

بعد الإجراء العام أعلاه، تم الحصول على حالات الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) والخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) التالية لـ مشتق الإنسولين وفقا للمثال 11.

الصيغ المستخدمة

مشتق إنسولين وفقا للمثال 11، رقم هيدروجيني=7.44؛ 689 ميكرومولار؛ 1.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 30 مل مولار فينول (0 Zn/هكسامر).

تم تقديم هذه النتائج في الأشكال 6-7 وفي الجدول 13، أدناه.

الأشكال 6 و7 تبين الخواص الحركية الصيدلانية (تركيزات إنسولين في مقابل الزمن) للإنسولين وفقا للمثال 11 المصاغ مع صفر زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم)، والتغيرات الناتجة في جلوكوز البلازما، على التوالي؛ 1 نانومول/كجم

الجدول 13

المتغيرات الحركية الديناميكية (متوسط ±SD)

مركب		Tmaxa (د)	Cmax/D بيكومولار/(نانو	AUC/D بيكومولار *دقيقة/(بيكومول/ك	٪ extrap	T½b (د)	متوسط وقت البقاء (د)

				مول/كجم)	جم)			
المثال 11 1 نانومول/كجم (4n=)	متوسط SD	38		1207 330	261 60	12	245 32	334 46

Tmax a محدد كمتوسط

T½ b محدد كمتوسط تجانسي pseudoSD±

سوف يتم اعتبار أن مشتق إنسولين وفقا للمثال 11 في الصيغة بدون زنك لها حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) تؤهلها لتكون صيغة إنسولين قبل الأكل. أيضا، متوسط وقت الاحتجاز لمشتق الإنسولين هذا كان بمقدار 334 دقيقة، أقصر بشكل ملحوظ من الحالة التي تم الحصول عليها للصيغة المشابهة (أيضا) حمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك يحتوي على مشتق إنسولين وفقا للفن السابق، A22K(eps)N)-هكسا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG)، B29R، desB30 إنسولين بشري (البراءة الدولية 022013/2009، المثال 45، (متوسط وقت البقاء = 1287 دقيقة)، see أدناه. يمكن استنتاج أن مشتق الإنسولين وفقا للمثال 11 مفيدة كإنسولين سريع الأكل (قبل الأكل).

المثال 37؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد من مشتق الإنسولين وفقا للمثال 4 في خنازير LYD

بعد الإجراء العام أعلاه، تم الحصول على حالات الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) والخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) التالية لـ مشتق الإنسولين وفقا للمثال 4.

الصيغة المستخدمة

مشتق إنسولين وفقا للمثال 4، رقم هيدروجيني=7.43؛ 621 ميكرومولار؛ 1.8٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول، 10 مل مولار كلوريد صوديوم (0 Zn/هكسامر).

تم تقديم هذه النتائج في الأشكال 8-9 وفي الجدول 14، أدناه.

5

الجدول 14

البيانات الصيدلانية الحركية Pharmacokinetic data

مركب		Tmaxa (د)	Cmax/D بيكومولار/(نانو مول/كجم)	AUC/D بيكومولار *دقيقة/(بيكومول/كجم)	% extrap	T½b (د)	متوسط وقت البقاء (د)
المثال 4 0 zn/هكسامر 1 نانومول/كجم	متوسط SD	45	1272 394	255 41	8	160 26	235 34

10 أ) Tmax محدد كمتوسط

ب) T½ محدد كمتوسط تجانسي ±pseudoSD

سوف يتم اعتبار أن مشتق إنسولين وفقا للمثال 4 في الصيغة بدون زنك لها حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) تؤهلها لتكون صيغة 15 إنسولين قبل الأكل. أيضا، متوسط وقت الاحتجاز لمشتق الإنسولين هذا كان بمقدار 160 دقيقة، أقصر بشكل ملحوظ من الحالة التي تم الحصول عليها للصيغة المشابهة حمض 16،1-هكسا ديكان

داي ويك تحتوي على مشتق إنسولين وفقا للفن السابق، A22K(N)(eps)هكسا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG)، B29R، desB30 إنسولين بشري (البراءة الدولية 022013/2009، المثال 45، (متوسط وقت البقاء = 1287 دقيقة)، see أدناه. يمكن استنتاج أن مشتق الإنسولين وفقا للمثال 4 مفيدة كإنسولين سريع الأكل (قبل الأكل).

المثال 38؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد من مشتق إنسولين وفقا للفن السابق في خنازير LYD

بعد الإجراء العام أعلاه، تم الحصول على حالات الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) والخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) التالية لـ مشتق الإنسولين وفقا للفن السابق، A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG)، B29R، desB30 إنسولين بشري (البراءة الدولية 022013/2009، المثال 45.

الصيغ المستخدمة

المركب وفقا للبراءة الدولية 022013/2009، المثال 45، 588 ميكرومولار؛ 1.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 30 مل مولار فينول؛ 7 مل مولار تريس، رقم هيدروجيني=7.4 (0 Zn/هكسامر)، 1 نانومول/كجم.

تم تقديم هذه النتائج في الأشكال 10 و11، وفي الجدول 15، أدناه.

الأشكال 10 و11 يبين الخواص الحركية الصيدلانية (تركيزات إنسولين في مقابل الزمن) من مشتق إنسولين وفقا للفن السابق، أي A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG)، B29R، desB30 إنسولين بشري (البراءة الدولية 022013/2009، المثال 45)، المصاغ مع صفر زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم)، والتغيرات الناتجة في جلوكوز البلازما، على التوالي (1 نانومول/كجم).

الجدول 15

المتغيرات الحركية الديناميكية بعد جرعة تحت الجلد من 1 نانومول/كجم من المركب وفقا للبراءة الدولية 022013/2009، المثال 45

مركب		AUC/D بيكومولار *دقيقة/(بيكومول/كجم)	Tmaxa (د)	Cmax/D بيكومولار/(نانومول/كجم)	متوسط وقت البقاء (د)	T½b (د)
البراءة الدولية 022013/2009 Ex. 45 0 Zn/هكسامر (4n=) 1 نانومول/كجم	متوسط	422	45	736	1287	987
	SD	51	17	344	86	36

Tmax a محدد كمتوسط±SD

T½ b محدد كمتوسط تجانسي ±pseudoSD

سوف يتم اعتبار أن مشتق الإنسولين وفقا للفن السابق، البراءة الدولية 022013/2009، المثال 45، في الصيغة بدون زنك مرتبط ببقعة الحقن الممتدة protracted tailing، الناتج بشكل ممكن من امتصاص مؤجل لجزء من بقعة الحقن تحت الجلد subcutaneous depot. يبلغ تركيز هذا الإنسولين عند النقطة الزمنية 24 ساعة (1440 دقيقة) 98 بيكومولار. أيضا، يتم مد أثر تقليل جلوكوز الدم ليستمر لمدة على الأقل 8 ساعة (480 دقيقة). كان متوسط وقت البقاء 1287 دقيقة، غالبا 1 يوم. وهذا ما يجعل من الإنسولين وفقا للفن السابق للاستخدام قبل الأكل.

المثال 39؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد لنظير قريب من مشتق إنسولين وفقا للفن السابق في خنازير LYD

بعد الإجراء العام أعلاه، تم الحصول على حالات الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) والخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) التالية لـ the حمض C14 ثنائي نظير A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG)، B29R، desB30 إنسولين بشري ممثل للفن السابق كما هو مبين في البراءة الدولية 022013/2009 (انظر تحديدا المثال 45 (A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG)، B29R، desB30 إنسولين بشري).

الصيغ المستخدمة

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG)، B29R، desB30 إنسولين بشري (1،14-تترا ديكان داي ول (حمض C14 ثنائي) نظير 1،16-هكسا ديكان داي ول (حمض C16 ثنائي) وفقا للبراءة الدولية 022013/2009، المثال 45)، 588 ميكرومولار؛ 1.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 30 مل مولار فينول؛ 7 مل مولار تريس، رقم هيدروجيني=7.4 (0 Zn/هكسامر)

تم تقديم هذه النتائج في الشكل الملحق 9 وفي الجدول 16، أدناه.

الأشكال 12 و13 تبين الخواص الحركية الصيدلانية (تركيزات إنسولين في مقابل الزمن) of حمض C14 ثنائي نظير من مشتق إنسولين ممثل للفن السابق، أي A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ول-gGlu-2xOEG)، B29R، desB30 إنسولين بشري (البراءة الدولية 022013/2009، المثال 45)، المصاغ مع صفر زنك لكل 6 جزيئات إنسولين (1 نانومول/كجم)، والتغيرات الناتجة في جلوكوز البلازما، على التوالي (72 نانومول/حيوان).

الجدول 16

المتغيرات الحركية الديناميكية بعد جرعة تحت الجلد من 1 نانومول/كجم من حمض C14 ثنائي وفقا لنظير الحمض C16 الثنائي وفقا للفن السابق مركب وفقا للبراءة الدولية 022013/2009، المثال 45 (72 نانومول/حيوان)

رقم الحيوان	الجرعة بيكومول/ك	Tmax	Cmax/D بيكومولار/(ذ	AUC/D بيكومولار *دقيقة/(بيكومول/	٪ extrap	T½ دقيقة	متوسط

	جم	دقيقة	انو مول/كجم)	كجم)	٪	ة	وقت البقاء دقيقة
10107	713	50	450	128	6	182	310
10109	1714	20	241	40	9	148	226
10110	720	10	513	104	7	153	261
10111	706	50	363	81	8	158	255
10112	1735	20	344	41	10	219	305
N		5	5	5	5	5	5
متوسط			382	79	8		271
SD		19	104	39	1		35
متوسط		20					
متوسط تجانسي						168	
Pseud SD o						25	

الاستنتاج

سوف يتم اعتبار أن صورة الحمض C14 الثنائي من مشتق الإنسولين وفقا للفن السابق، البراءة الدولية 022013/2009، المثال 45، في الصيغة بدون زنك مرتبط ببقعة الحقن الممتدة، الناتج

بشكل ممكن من امتصاص مؤجل لجزء من بقعة الحقن تحت الجلد. يبلغ تركيز هذا الإنسولين عند النقطة الزمنية 10 ساعات (600 دقيقة) 24 بيكومولار. وقد وجد أن متوسط وقت الاحتجاز لنظير الحمض C14 الثنائي وفقا للفن السابق يساوي 271 دقيقة. كانت النتائج المناظرة التي تم الحصول عليها مع حمض C14 ثنائي نظائر وفقا للأمثلة 1 و2 وفقا للاختراع الحالي 165 و111 دقيقة، على التوالي. أيضا، يتم مد أثر تقليل جلوكوز الدم ليستمر لمدة على الأقل 11 ساعة (660 دقيقة). وهذا ما يجعل من الإنسولين وفقا للفن السابق للاستخدام قبل الأكل.

المثال 40؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد من مشتق الإنسولين وفقا للمثال 2 في جرذان زوكر سمينة، مقارنة الحالات مع وبدون 170 مل مولار نيكوتيناميد في الصيغة

بعد الإجراء العام أعلاه، تم الحصول على حالات الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) والخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) التالية لـ مشتق الإنسولين وفقا للمثال 2.

الصيغة المستخدمة

مشتق إنسولين وفقا للمثال 2، رقم هيدروجيني=7.43؛ 621 ميكرومولار؛ 1.8٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول، 10 مل مولار كلوريد صوديوم (0 Zn/هكسامر)، مع وبدون 170 مل مولار نيكوتيناميد.

تم إعطاء الجرذات الجرعات 40 نانومول/كجم

تم تقديم هذه النتائج في الشكل الملحق 15.

سوف يتم اعتبار أن تضمين 170 مل مولار نيكوتيناميد في صيغة الإنسولين الخالية من الزنك وفقا للمثال 2، تم إعطاء جرعات تحت الجلد لجرذان زوكر، وهو ما أدى إلى حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) أسرع أثرا، مع Tmax سابق. وبالتالي تم توضيح أن تضمين نيكوتيناميد بصيغة الإنسولين وفقا للمثال 2 وفقا للاختراع يؤدي إلى صيغة الإنسولين أكثر ملائمة للاستخدام قبل الأكل.

المثال 41؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد من مشتق الإنسولين وفقا للمثال 7 في جرذان زوكر سمينة، مقارنة الحالات مع وبدون 170 مل مولار نيكوتيناميد في الصيغة

بعد الإجراء العام أعلاه، تم الحصول على حالات الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) والخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) التالية لـ مشتق الإنسولين وفقا للمثال 7.

الصيغ المستخدمة:

مشتق إنسولين وفقا للمثال 7، رقم هيدروجيني=7.39؛ 604 ميكرومولار؛ 1.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول، 7 مل مولار صوديوم فوسفات sodium phosphate، 10 مل مولار كلوريد صوديوم (0 Zn/هكسامر)، 170 مل مولار نيكوتيناميد.

مشتق إنسولين وفقا للمثال 7، رقم هيدروجيني=7.39؛ 599 ميكرومولار؛ 1.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول؛ 7 مل مولار صوديوم فوسفات؛ 10 مل مولار كلوريد صوديوم (0 Zn/هكسامر).

تم إعطاء الجرذات الجرعات 40 نانومول/كجم

تم تقديم هذه النتائج في الأشكال 16-17.

سوف يتم اعتبار أن تضمين 170 مل مولار نيكوتيناميد في صيغة الإنسولين الخالية من الزنك وفقا للمثال 7، تم إعطاء جرعات تحت الجلد لجرذان زوكر، وهو ما أدى إلى حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) أسرع أثرا، مع Tmax أسبق. وبالتالي تم توضيح أن تضمين نيكوتيناميد بصيغة الإنسولين وفقا للمثال 7 وفقا للاختراع يؤدي إلى صيغة الإنسولين أكثر ملائمة للاستخدام قبل الأكل.

المثال 42؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد من مشتق

الإنسولين وفقا للمثال 16 في جرذان زوكر سمينة، مقارنة الحالات مع وبدون 170 مل مولار نيكوتيناميد في الصيغة

بعد الإجراء العام أعلاه، تم الحصول على حالات الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) والخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) التالية لـ مشتق الإنسولين وفقا للمثال 16.

الصيغ المستخدمة

مشتق إنسولين وفقا للمثال 16، رقم هيدروجيني=7.44؛ 599 ميكرومولار؛ 1.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول؛ 7 مل مولار صوديوم فوسفات؛ 10 مل مولار كلوريد صوديوم (0 Zn/هكسامر)؛ 170 مل مولار نيكوتيناميد.

مشتق إنسولين وفقا للمثال 16، رقم هيدروجيني=7.40؛ 581 ميكرومولار؛ 1.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول؛ 7 مل مولار صوديوم فوسفات؛ 10 مل مولار كلوريد صوديوم (0 Zn/هكسامر).

تم إعطاء الجرذات الجرعات 40 نانومول/كجم

تم تقديم هذه النتائج في الأشكال 18-19.

سوف يتم اعتبار أن تضمين 170 مل مولار نيكوتيناميد في صيغة الإنسولين الخالية من الزنك وفقا للمثال 16، تم إعطاء جرعات تحت الجلد لجرذان زوكر، وهو ما أدى إلى حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) أسرع أثرا، مع earlier an Tmax. وبالتالي تم توضيح أن تضمين نيكوتيناميد بصيغة الإنسولين وفقا للمثال 16 وفقا للاختراع يؤدي إلى صيغة الإنسولين أكثر ملائمة للاستخدام قبل الأكل.

المثال 43؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد من مشتق الإنسولين وفقا للمثال 4 في خنازير LYD، مقارنة الحالات مع وبدون 170 ميكرومولار نيكوتيناميد في الصيغة

بعد الإجراء العام أعلاه، تم الحصول على حالات الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) والخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) التالية لـ مشتق الإنسولين وفقا للمثال 4.

الصيغة المستخدمة

مشتق إنسولين وفقا للمثال 4، رقم هيدروجيني=7.42؛ 0.604 مل مولار مشتق إنسولين؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول؛ 2 ٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 7 مل مولار فوسفات (0 Zn/هكسامر).

مشتق إنسولين وفقا للمثال 4، رقم هيدروجيني=7.43؛ 0.605 مل مولار مشتق إنسولين؛ 170 مل مولار نيكوتيناميد؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول؛ 0.6 ٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 7 مل مولار فوسفات

تم إعطاء الخنازير جرعات 1 نانومول/كجم.

تم تقديم هذه النتائج في الشكل الملحق 20.

سوف يتم اعتبار أن تضمين 170 ميكرومولار نيكوتيناميد في صيغة الإنسولين الخالية من الزنك وفقا للمثال 4، تم إعطاء ال جرعات تحت الجلد إلى الخنازير، وهو ما أدى إلى حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) أسرع أثرا، مع Tmax أسبق. وبالتالي تم توضيح أن تضمين نيكوتيناميد بصيغة الإنسولين وفقا للمثال 4 وفقا للاختراع يؤدي إلى صيغة الإنسولين أكثر ملائمة للاستخدام قبل الأكل.

المثال 44؛ حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية)/الخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) تحت الجلد من مشتق الإنسولين وفقا للمثال 2 في خنازير LYD، مقارنة الحالات مع وبدون 170 ميكرومولار نيكوتيناميد في الصيغة

بعد الإجراء العام أعلاه، تم الحصول على حالات الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) والخواص الصيدلانية الديناميكية (أثر تقليل بلازما/جلوكوز الدم) التالية لـ مشتق الإنسولين وفقا للمثال 2.

الصيغة المستخدمة

مشتق إنسولين وفقا للمثال 2، رقم هيدروجيني=7.4؛ 608 ميكرومولار؛ 2٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول، 7 مل مولار صوديوم فوسفات (0 Zn/هكسامر).

مشتق إنسولين وفقا للمثال 2، رقم هيدروجيني=7.4؛ 614 ميكرومولار؛ 170 ميكرومولار نيكوتيناميد، 0.6٪ (وزن/حجم) جليسرول؛ 16 مل مولار فينول؛ 16 مل مولار m-كريسول، 7 مل مولار صوديوم فوسفات (0 Zn/هكسامر).

تم إعطاء الخنازير جرعات 1 نانومول/كجم.

تم تقديم هذه النتائج في الشكل الملحق 21.

سوف يتم اعتبار أن تضمين 170 ميكرومولار نيكوتيناميد في صيغة الإنسولين الخالية من الزنك وفقا للمثال 2، تم إعطاء ال جرعات تحت الجلد إلى الخنازير، وهو ما أدى إلى حالة الخواص الصيدلانية الديناميكية (تركيزات الدم/بلازما الإنسولين في مقابل الحالات الزمنية) أسرع أثرا، مع Tmax أسبق. وبالتالي تم توضيح أن تضمين نيكوتيناميد بصيغة الإنسولين وفقا للمثال 2 وفقا للاختراع يؤدي إلى صيغة الإنسولين أكثر ملائمة للاستخدام قبل الأكل.

قائمة التتابع

<110>Novo Nordisk A/S

<120> NOVEL INSULIN DERIVATIVES AND THE MEDICAL USES HEREOF

8702 <130>WO01

<140>PCT/EP2015/053989

26-02-2015 <141>

<150>EP 14157215.6

28-02-2014 <151>

5 <160>

<170>PatentIn version 3.5

1 <210>

22 <211>

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>A chain of analogue of Human insulin of Examples 1-2, 4-21 and 24-26.

<220>

<221>CHAIN

(22)..(1) <222>

<220>

<221>MOD_RES

(22)..(22) <222> 5

<223>ACETYLATION; (N(eps)-tetradecanedioyl-4xgGlu ;(

) N(eps)-hexadecanedioyl-4xgGlu ;(

) N(eps)-hexadecanedioyl-gGlu-2xOEG ;(

) N(eps)-hexadecanedioyl-3x(gGlu-OEG)-gGlu ;(

1 <400> 10

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

15 10 5 1

Glu Asn Tyr Cys Asn Lys

20

2 <210> 15

22 <211>

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>A chain of analogue of Human insulin of Examples 3, and 22-23.

<220>

<221>CHAIN

(22)..(1) <222>

<220>

<221>MOD_RES

(22)..(22) <222>

<223>ACETYLATION; (N(eps)tetradecanedioyl-4xgGlu ;(

) N(eps)-tetradecanedioyl-4xgGlu ;(

) N(eps)-tetradecanedioyl-gGlu-2xOEG.(

2 <400>

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

15 10 5 1

Glu Asn Tyr Cys Asn Lys

20 15

3 <210>

28 <211>

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>B chain of analogue of Human insulin of Examples 1, 3, 10-14, 17, and 20.

3 <400>

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

15 10 5 1

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Pro Arg

25 20

4 <210>

28 <211> 10

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>B chain of analogue of Human insulin of Examples 2, 4-6, 15, 19 , and 21-26. 15

4 <400>

Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

15 10 5 1

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Pro Arg

25 20

5 <210>

28 <211>

<212>PRT

<213>Artificial Sequence 5

<220>

<223>B chain of analogue of Human insulin of Examples 7-9, 16 and 18.

5 <400>

Phe Val Gln Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

15 10 5 1 10

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Pro Arg

25 20

15

قائمة التتابع:

"أ" بيكومولار

"ب" دقائق

"ج" الانسولين في المثال 1،0 زنك 1 نانومول/كجم

"د" نوفورابيد 0،5 نانومول/كجم

"هـ" نوفورابيد 1 نانومول/كجم

"و" متوسطPK لSEM

"ز" إنسولين (بيكومولار)

"ح" PG(مل مولار)

"ط" SEM التغير في بلازما جلوكوز ، متوسط

"ي" الانسولين في المثال 2،0 زنك 1 نانومول/كجم

"ك" متوسط دلتاPG لSEM

"ل" الانسولين في المثال 11،0 زنك 1 نانومول/كجم

"م" الانسولين في المثال 4،0 زنك 1 نانومول/كجم

"ن" التغير في بلازما جلوكوز

"س" إنسولين وفقا ل 0222013/2009 المثال 45 (ن=4)

"ع" الوقت (الدقيقة)

"ف" نظائر إنسولين (بيكومولار)

"ص" بلازما الجلوكوز(مل مول)

"ق" نظير داي أسيد C14 وفقا ل0222013/2009 المثال 45 (72 نانومول لكل حيوان)

"ر" الشرح

"ش" منطقة تباطؤ

"ت" منطقة رجفان

"ث" منطقة المعايرة

"خ" شدة التألق

"ذ" مقياس عشوائي

"ض" زمن التباطؤ=101،7 ساعة

"أ1" PKلجرذ زوكر- إنسولين المثال 2

"ب1" الإنسولين وفقا للمثال 2

"ج1" الإنسولين وفقا للمثال 2 + 170 مل مولار نيكوتيناميد

"د1" PKالجرذ زوكر – إنسولين المثال 7

"هـ1" الإنسولين وفقا للمثال 7

"و1" الإنسولين وفقا للمثال 7 + 170 ميكرو مولار نيكوتيناميد

"ز1" إنسولين (بيكو مولار؛ متوسط±SEM)

"ح1" PKالجرذ زوكر – إنسولين المثال 16

"ط1" الإنسولين وفقا للمثال 16

"ي1" الإنسولين وفقا للمثال 16 + 170 مل مولار نيكوتيناميد

"ك1" مركز (بيكومولار)

"ل1" الإنسولين وفقا للمثال 2 + 170 مكرو مولار نيكوتيناميد

"م1" الإنسولين وفقا للمثال 4 + 170 مل مولار نيكوتيناميد

"ن1" الإنسولين وفقا للمثال 4

"س1" PKالخنزير – إنسولين وفقا للمثال 2

عناصر الحماية

1. مشتق إنسولين insulin derivative، يكون مشتق الإنسولين insulin derivative هذا عبارة عن نظير معالج بأسيل acylated analogue من إنسولين بشري human insulin، وهذا النظير عبارة عن

[A22K، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري human insulin؛

ويتم اشتقاق نظير إنسولين insulin analogue هذا بواسطة إضافة أسيل إلى مجموعة أمينو إيبسلون epsilon amino group من وحدة ليسين بنائية lysine residue عند الموضع A22 مع مجموعة من الصيغة II:

[أسيل]-[رابط]-

حيث مجموعة الرابط عبارة عن سلسلة حمض أميني amino acid chain مكونة من 1 إلى 10 وحدات حمض أميني بنائية مختارة من -gGlu- و-OEG-؛ حيث

يمثل gGlu وحدة حمض جلوتاميك جاما بنائية؛

يمثل OEG وحدة بنائية من حمض 8-أمينو-3،6- داي أوكسا أوكتانويك (أي مجموعة من الصيغة -NH-(CH2)2-O-(CH2)2-O-CH2-CO-)؛

يمكن أن تمثل وحدات الحمض الأميني البنائية هذه بأي ترتيب؛ و

تتضمن سلسلة الحمض الأميني amino acid chain هذه على الأقل وحدة gGlu بنائية واحدة؛ و

حيث مجموعة أسيل Acyl group عبارة عن وحدة بنائية من حمض α،ω-داي -كربوكسيليك α,ω-di-carboxylic acid مختارة من

حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك 1,14-tetradecanedioic acid؛

حمض 1،15-بنتا ديكان داي ويك 1,15-pentadecanedioic acid؛ و

حمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك 1,16-hexadecanedioic acid؛

يمكن أن يتضمن هذا النظير المعالج بأسيل acylated analogue، استبدال إضافي من A14E، و/أو B3E أو B3Q.

2. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، وهذا النظير عبارة عن [A14E، A22K، B3E، desB27، B29R، desB30]، [A14E، A22K، desB27، B29R،

desB30]، [A22K، B3E، desB27، B29R، desB30]، [A22K، B3Q، desB27، B29R، desB30]، أو [A22K، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري human insulin، ويتم علاج نظير الإنسولين هذا بأسيل عند مجموعة أمينو إيبسلون epsilon amino group من وحدة ليسين بنائية lysine residue عند الموضع A22.

3. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، حيث يتم اختيار مجموعة الرابط من -gGlu-؛ -2xgGlu-؛ -3xgGlu-؛ -4xgGlu-؛ -2xOEG-gGlu-؛ -(gGlu-OEG)3x-gGlu-؛ -(gGlu)-2xOEG-4xgGlu-؛ -2xOEG-؛ و-gGlu-2xOEG-.

4. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 3، حيث يتم اختيار مجموعة الرابط من -gGlu-؛ -2xgGlu-؛ -4xgGlu-؛ -2xOEG-gGlu-؛ -(gGlu-OEG)3x-gGlu-؛ -2xOEG-؛ و-gGlu-2xOEG-.

5. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 4، حيث مجموعة الرابط عبارة عن -4xgGlu-.

6. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، حيث تكون مجموعة أسيل Acyl group عبارة عن مجموعة حمض ثنائي مشتقة من حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك -1,14 tetradecanedioic acid؛ حمض 1،15-بنتا ديكان داي ويك 1,15-pentadecanedioic acid؛ أو حمض 1،16-هكسا ديكان داي ويك 1,16-hexadecanedioic acid.

7. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 6، حيث مجموعة أسيل Acyl group عبارة عن حمض 1،14-تترا ديكان داي ويك 1,14-tetradecanedioic acid.

8. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، حيث المجموعة من الصيغة II (أي [أسيل]-[رابط]-) عبارة عن تترا ديكان داي ويل-gGlu-؛ تترا ديكان داي ويل-2xgGlu-؛

تترا ديكان داي ويل-3xgGlu-؛ تترا ديكان داي ويل-4xgGlu-؛ تترا ديكان داي ويل-gGlu-2xOEG-؛ تترا ديكان داي ويل-2xOEG-4xgGlu-؛ تترا ديكان داي ويل-2xOEG-؛ بنتا ديكان داي ويل-4xgGlu؛ هكسا ديكان داي ويل-4xgGlu-؛ هكسا ديكان داي ويل-2xOEG-gGlu-؛ أو هكسا ديكان داي ويل-gGlu-(OEG-gGlu)3x-.

9. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 8، حيث المجموعة من الصيغة II (أي [أسيل]-[رابط]-) عبارة عن تترا ديكان داي ويل-4xgGlu-.

10. تركيبة صيدلانية تتضمن مشتق إنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، وواحد أو أكثر من المواد الحاملة أو المخففات المقبولة صيدلانيا.

11. التركيبة الصيدلانية وفقا لعنصر الحماية 10، المصاغة كتركيبة منخفضة الزنك، بدون أيونات زنك zinc ions مضافة.

12. التركيبة الصيدلانية وفقا لعنصر الحماية 11، المصاغة كتركيبة منخفضة الزنك zinc، تتضمن أقل من 0.2 أيونات Zn^{2+} لكل 6 جزيئات إنسولين insulin molecules.

13. التركيبة الصيدلانية منخفضة الزنك وفقا لعنصر الحماية 11، حيث لم تتم إضافة أي مادة خافضة للتوتر السطحي surfactant.

14. التركيبة الصيدلانية منخفضة الزنك وفقا لعنصر الحماية 11، تتضمن مركب نيكوتيني nicotinic compound، وتحديدا نيكوتيناميد nicotinamide.

15. التركيبة الصيدلانية وفقا لعنصر الحماية 10، المصاغة كتركيبة منخفضة الزنك، بدون أيونات زنك مضافة، وتتضمن نظير معالج بأسيل acylated analogue من إنسولين بشري human insulin مختارة من:

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ويل-(2xOEG-gGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ويل-(gGlu-(OEG-gGlu)3x)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ويل-(2xOEG-gGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-بنتا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ويل-(2xOEG-gGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ويل-(gGlu-(OEG-gGlu)3x)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ويل-(2xOEG-gGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-هكسا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ويل-(2xOEG-4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

A22K(N)(eps)-تترا ديكان داي ويل-(2xOEG-4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin؛

desB30 ،B29R ،desB27 ،B3E ،(2xOEG-gGlu-تترا ديكان داي ويل-(eps)N)A22K ،A14E
إنسولين بشري human insulin؛

desB30 إنسولين ،B29R ،desB27 ،B3E ،(4xgGlu-تترا ديكان داي ويل-(eps)N)A22K ،A14E
بشري human insulin؛

desB30 إنسولين بشري ،B29R ،desB27 ،B3E ،(2xgGlu-تترا ديكان داي ويل-(eps)N)A22K
human insulin ؛

desB30 إنسولين بشري ،B29R ،desB27 ،B3E ،(gGlu-تترا ديكان داي ويل-(eps)N)A22K
human insulin ؛ و

desB30 إنسولين بشري ،B29R ،desB27 ،B3E ،(3xgGlu-تترا ديكان داي ويل-(eps)N)A22K
human insulin.

16. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، يتضمن هذا النظير المعالج بأسيل acylated analogue بشكل إضافي استبدال A14E.

17. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، يتضمن هذا النظير المعالج بأسيل acylated analogue بشكل إضافي استبدالات A14E وB3E.

18. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، يتضمن هذا النظير المعالج بأسيل acylated analogue بشكل إضافي استبدال B3E.

19. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، يتضمن هذا النظير المعالج بأسيل acylated analogue بشكل إضافي استبدال B3Q.

20. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، وهذا النظير عبارة عن [A14E، A22K، desB27، B29R، desB30]، [A22K، B3E، desB27، B29R، desB30]، [A22K، B3Q، desB27، B29R، desB30]، أو [A22K، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري

human insulin، ويتم علاج نظير إنسولين insulin analogue هذا بأسيل عند مجموعة أمينو إيبسلون epsilon amino group من وحدة ليسين بنائية lysine residue عند الموضع A22.

21. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 20، وهذا النظير عبارة عن [A22K، B3E، desB27، B29R، desB30] نسبة إلى إنسولين بشري human insulin، ويتم علاج نظير إنسولين insulin analogue هذا بأسيل عند مجموعة أمينو إيبسلون epsilon amino group من وحدة ليسين بنائية lysine residue عند الموضع A22.

22. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، والذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

23. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

24. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A14E، A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

25. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-هكسا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

26. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن

A22K(eps)*N*-هكسا ديكان داي ويل-(2xOEG-gGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

27. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-هكسا ديكان داي ويل-(gGlu-(OEG-gGlu)3x)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

28. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

29. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-هكسا ديكان داي ويل-(2xOEG-gGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

30. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-هكسا ديكان داي ويل-(gGlu-(OEG-gGlu)3x)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

31. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(2xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

32. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-هكسا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

33. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن
A22K(eps)*N*-هكسا ديكان داي ويل-(2xOEG-gGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري
human insulin.

34. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن
A22K(eps)*N*-هكسا ديكان داي ويل-(gGlu-(OEG-gGlu)3x)، desB27، B29R، desB30
إنسولين بشري human insulin.

35. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن
A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(gGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human
insulin.

36. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن
A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(2xOEG-gGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين
بشري human insulin.

37. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن
A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(2xOEG-gGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين
بشري human insulin.

38. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن
A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(2xOEG)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human
insulin.

39. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن

A22K(eps)*N*-هكسا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، B3Q، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

40. مشتق الإنسولين وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-بنتا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

41. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(2xOEG-4xgGlu)، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

42. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(2xOEG-4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

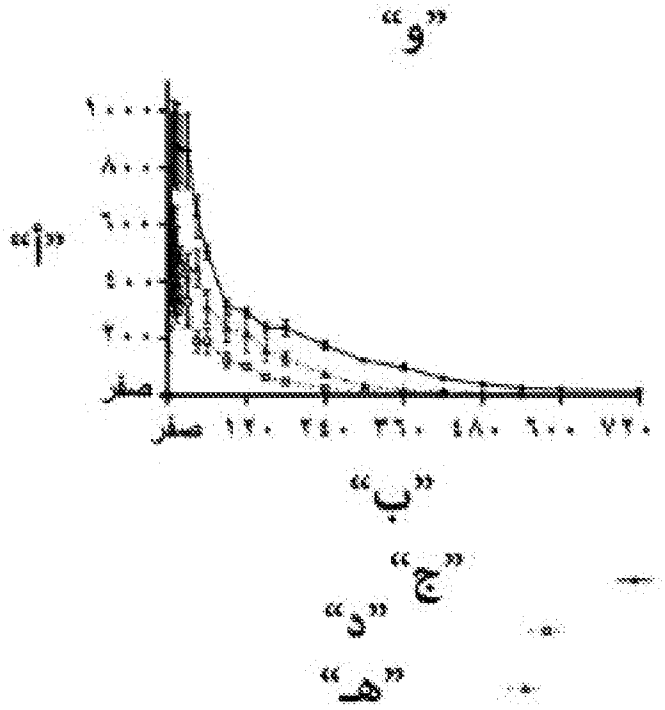
43. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A14E، A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(2xOEG-gGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

44. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A14E، A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(4xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

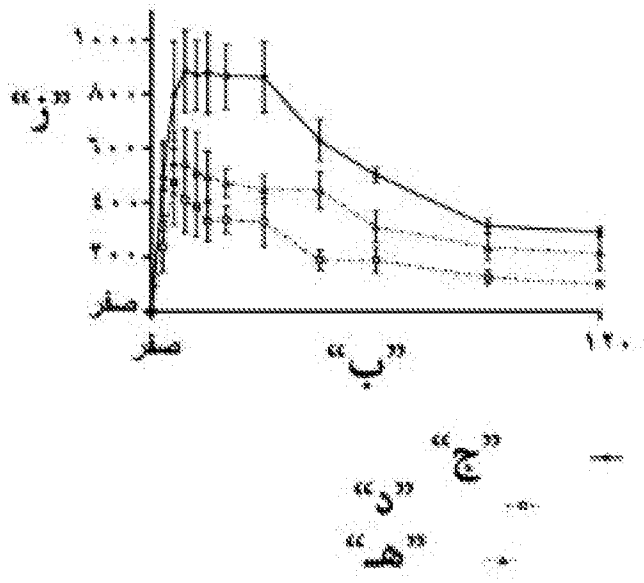
45. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-(2xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

46. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-gGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.

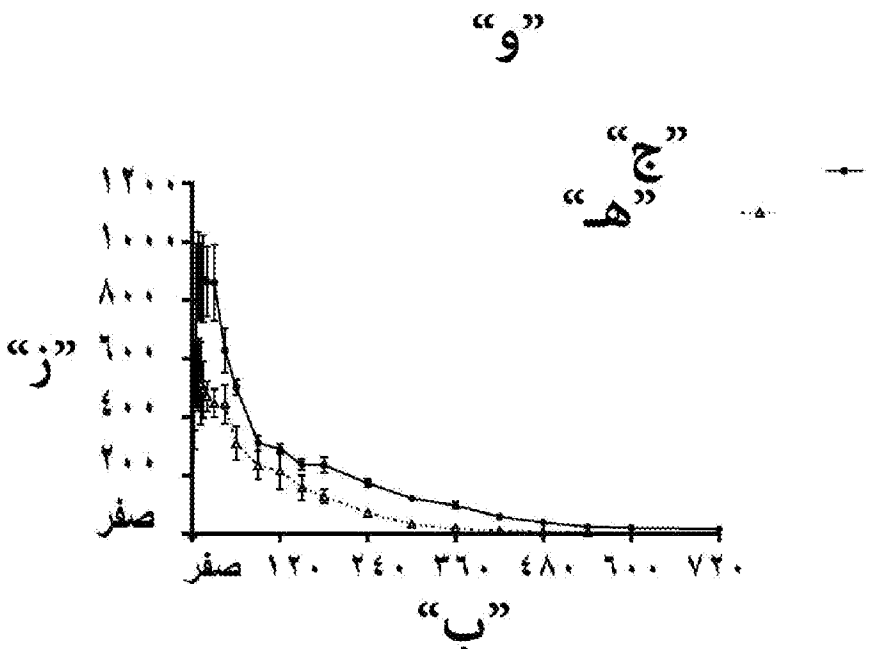
47. مشتق الإنسولين insulin derivative وفقا لعنصر الحماية 1، الذي هو عبارة عن A22K(eps)*N*-تترا ديكان داي ويل-3xgGlu)، B3E، desB27، B29R، desB30 إنسولين بشري human insulin.



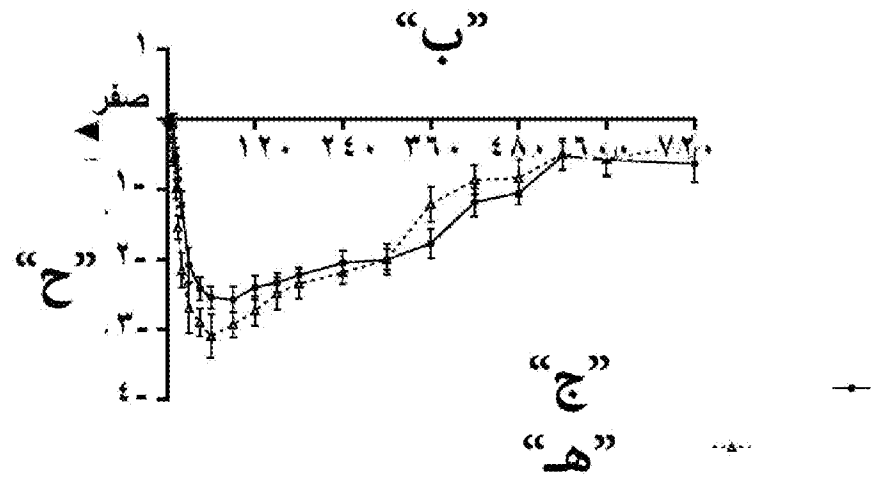
شكل ١



شكل ٢

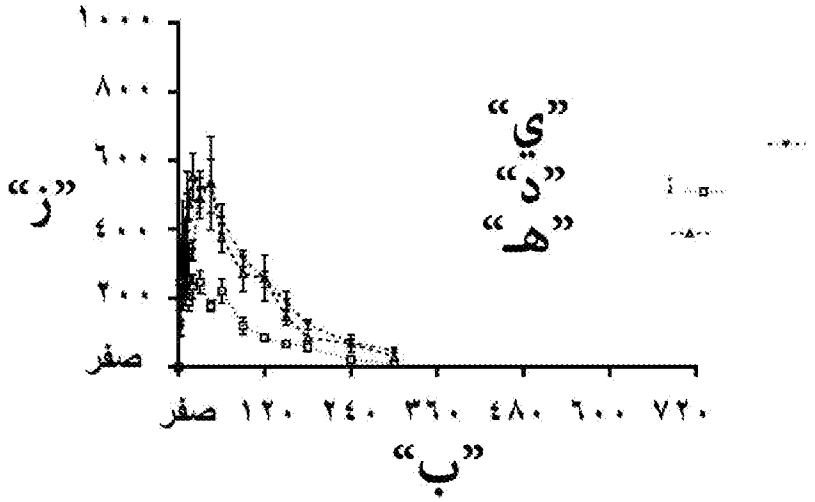

"و"
"ج"
"هـ"
"ز"
١٢٠٠
١٠٠٠
٨٠٠
٦٠٠
٤٠٠
٢٠٠
صفر
صفر ١٢٠ ٢٤٠ ٣٦٠ ٤٨٠ ٦٠٠ ٧٢٠
"ب"

شكل ٣أ


"ط"
"ب"
١
صفر
١٢٠ ٢٤٠ ٣٦٠ ٤٨٠ ٦٠٠ ٧٢٠
١-
٢-
٣-
٤-
"ح"
"ج"
"هـ"

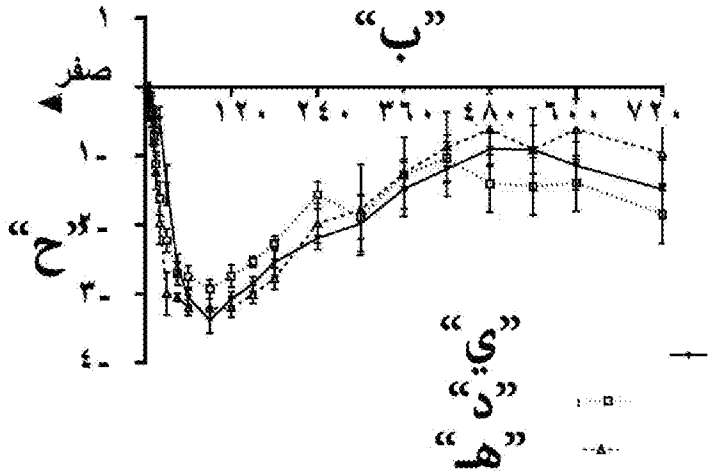
شكل ٣ب

“و”



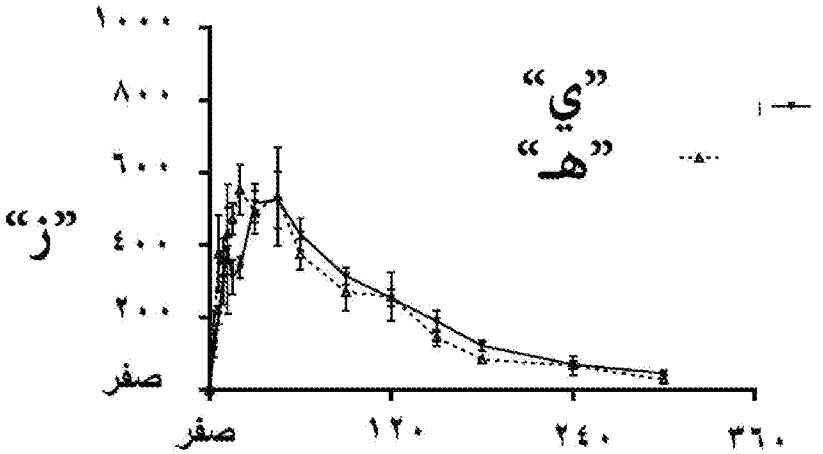
شكل ٤أ

“ك”



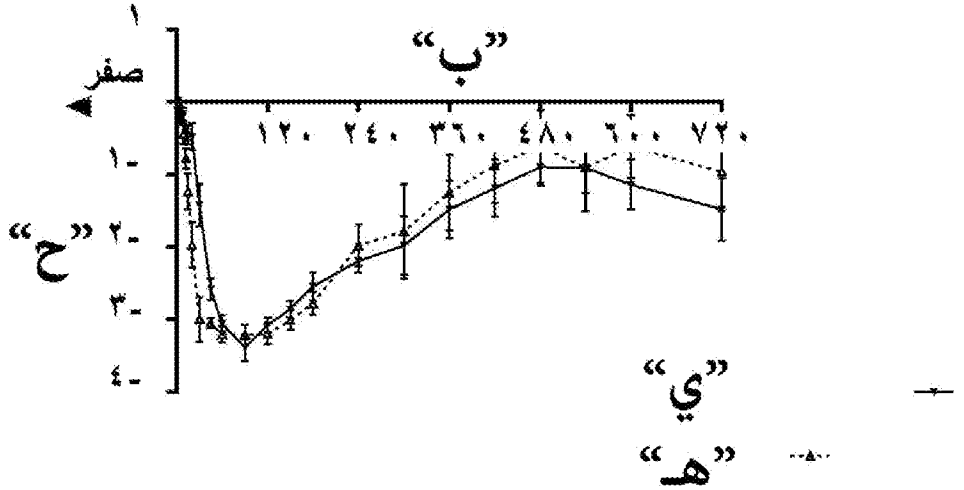
شكل ٤ب

“و”



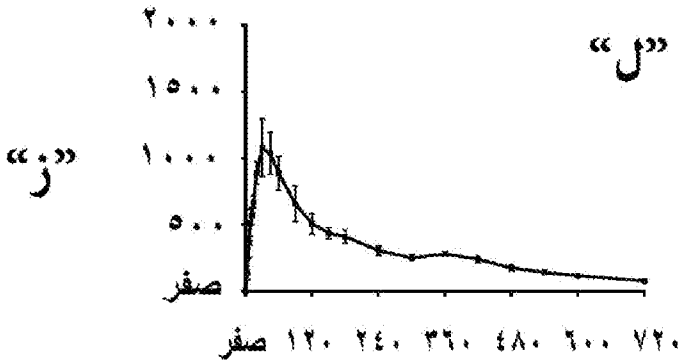
شكل ٥أ

“ط”



شكل ٥ب

"و"



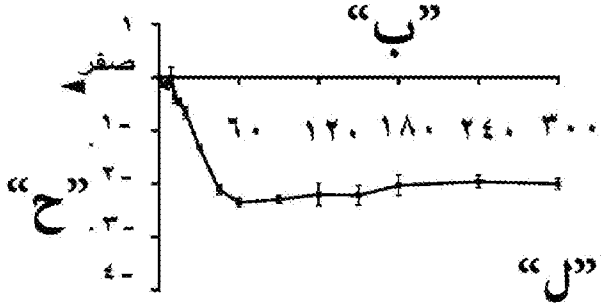
"ل" — "ز"

"ب"

شكل ٦

"ط"

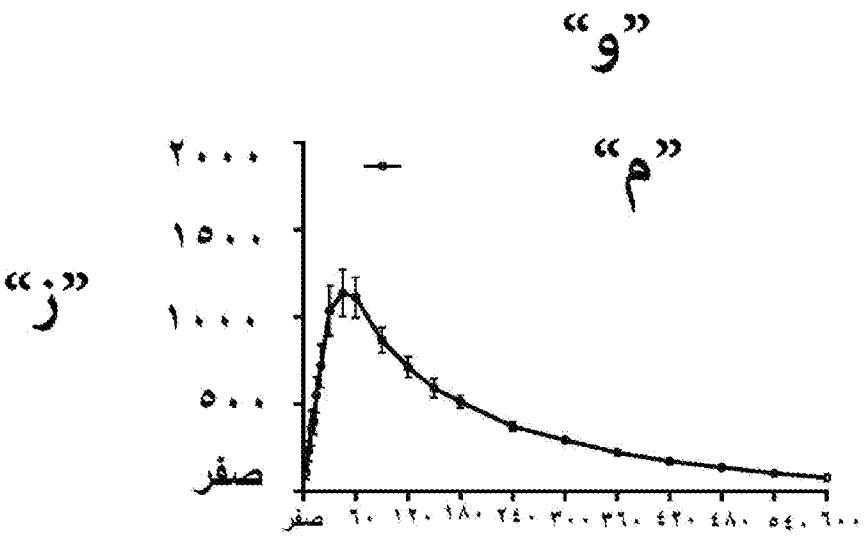
"ب"



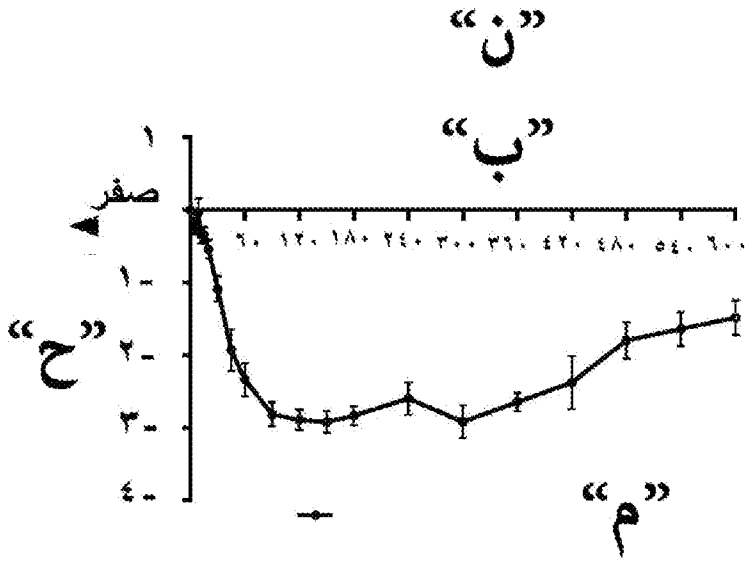
"ح"

"ل" —

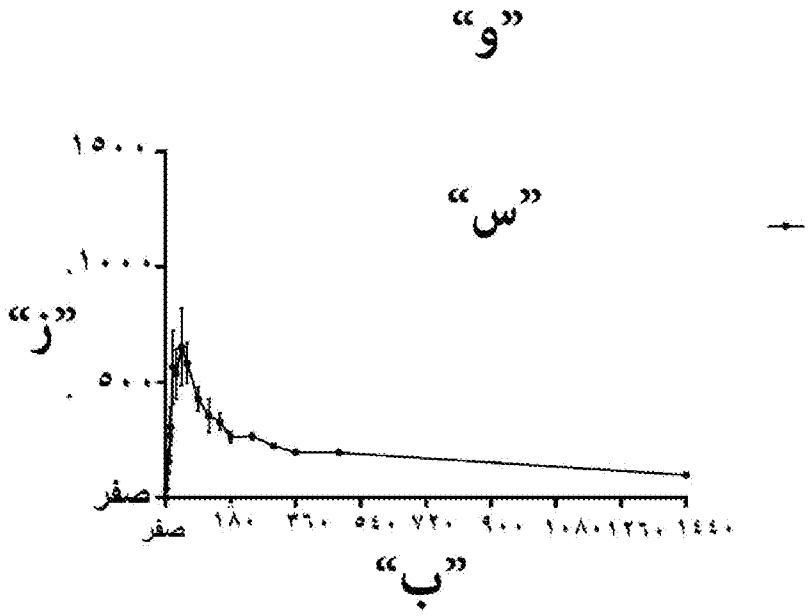
شكل ٧


"و"
"م"
"ز"
٢٠٠٠
١٥٠٠
١٠٠٠
٥٠٠
صفر
صفر ٦٠ ١٢٠ ١٨٠ ٢٤٠ ٣٠٠ ٣٦٠ ٤٢٠ ٤٨٠ ٥٤٠ ٦٠٠
"ب"

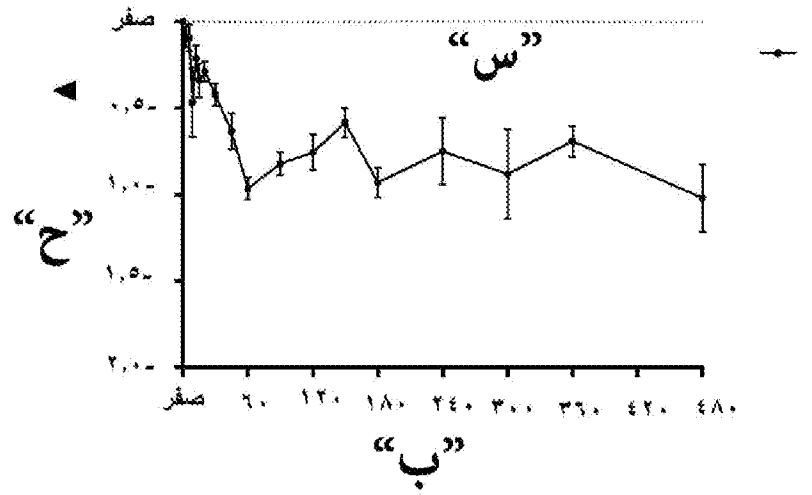
شكل ٨


"ن"
"ب"
١
صفر
١-
٢-
٣-
٤-
"ح"
٦٠ ١٢٠ ١٨٠ ٢٤٠ ٣٠٠ ٣٦٠ ٤٢٠ ٤٨٠ ٥٤٠ ٦٠٠
"م"

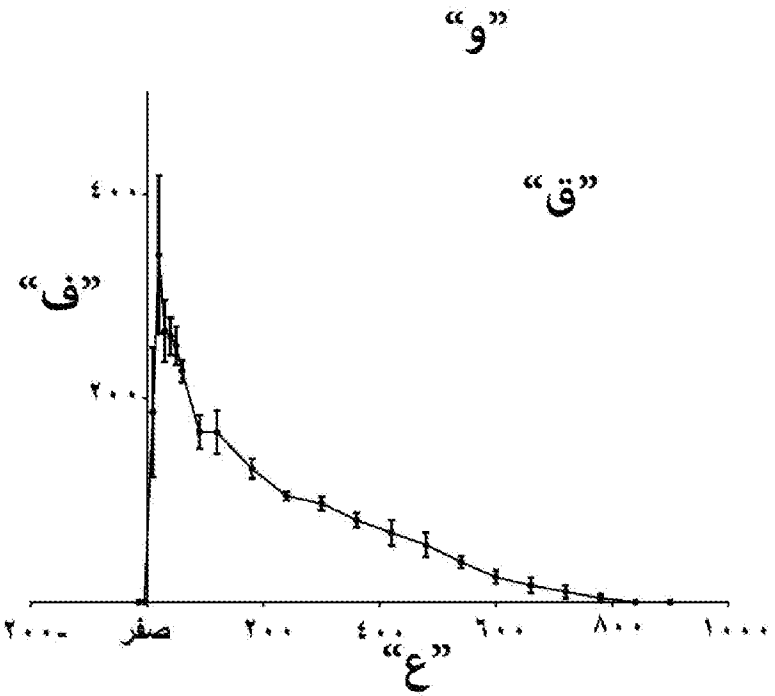
شكل ٩


"و"
"س"
"ز"
١٥٠٠
١٠٠٠
٥٠٠
صفر
صفر ١٨٠ ٣٦٠ ٥٤٠ ٧٢٠ ٩٠٠ ١٠٨٠ ١٢٦٠ ١٤٤٠
"ب"

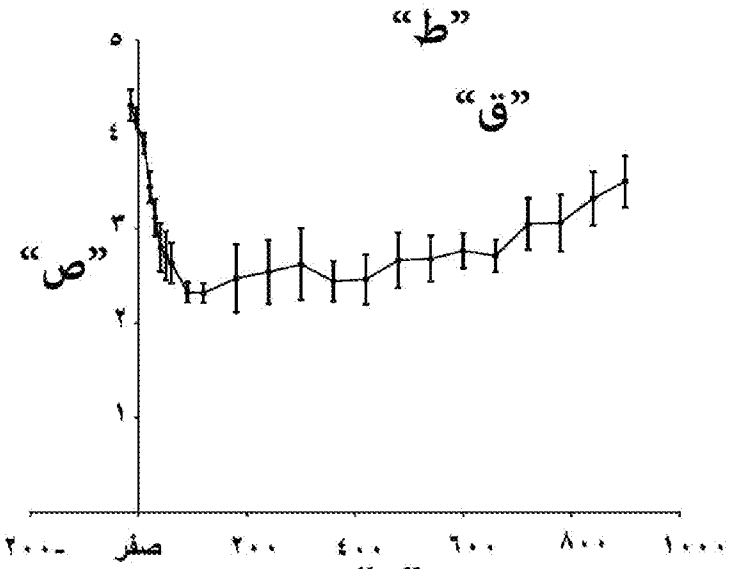
شكل ١٠


"ط"
"س"
"ح"
صفر
١,٠٠
١,٥٠
٢,٠٠
صفر ٦٠ ١٢٠ ١٨٠ ٢٤٠ ٣٠٠ ٣٦٠ ٤٢٠ ٤٨٠
"ب"

شكل ١١

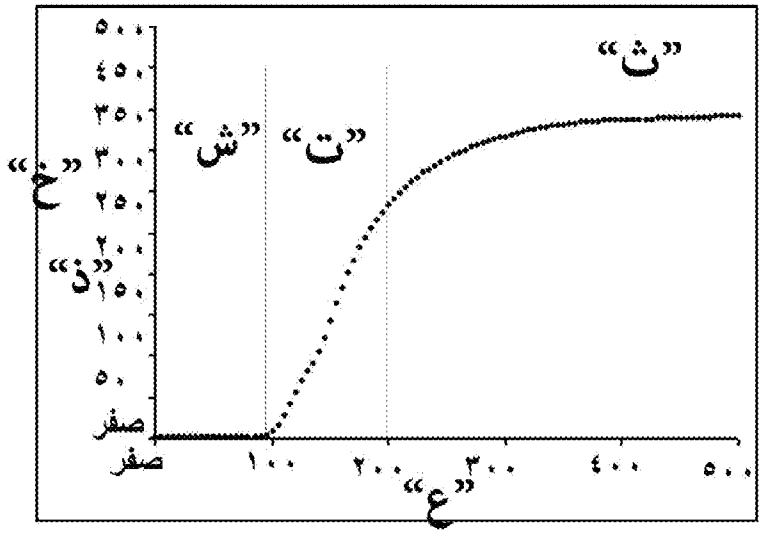

"و"
"ق"
"ف"
٤٠٠
٢٠٠
٢٠٠- صفر ٢٠٠ ٤٠٠ ٦٠٠ ٨٠٠ ١٠٠٠
"ع"

شكل ١٢


"ط"
"ق"
"ص"
٥
٤
٣
٢
١
٢٠٠- صفر ٢٠٠ ٤٠٠ ٦٠٠ ٨٠٠ ١٠٠٠
"ع"

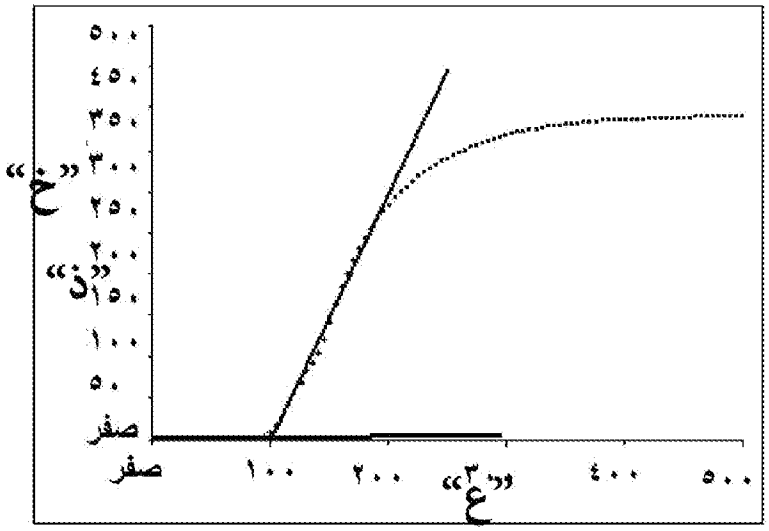
شكل ١٣

"ر" ١أ



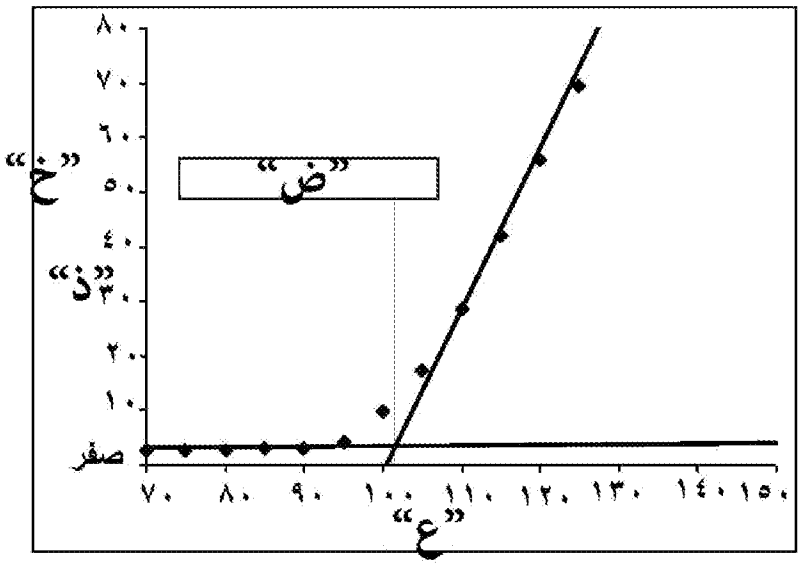
شكل ١٤أ

"ر" ١ب



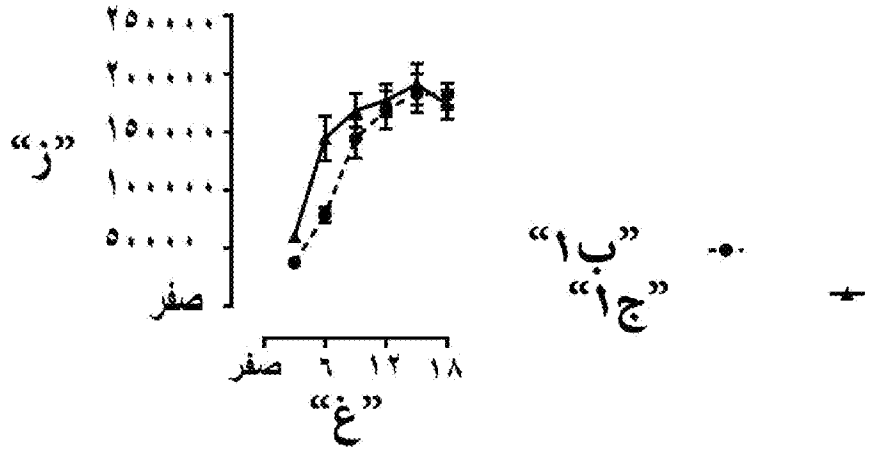
شكل ١٤ب

"ر" ١ج

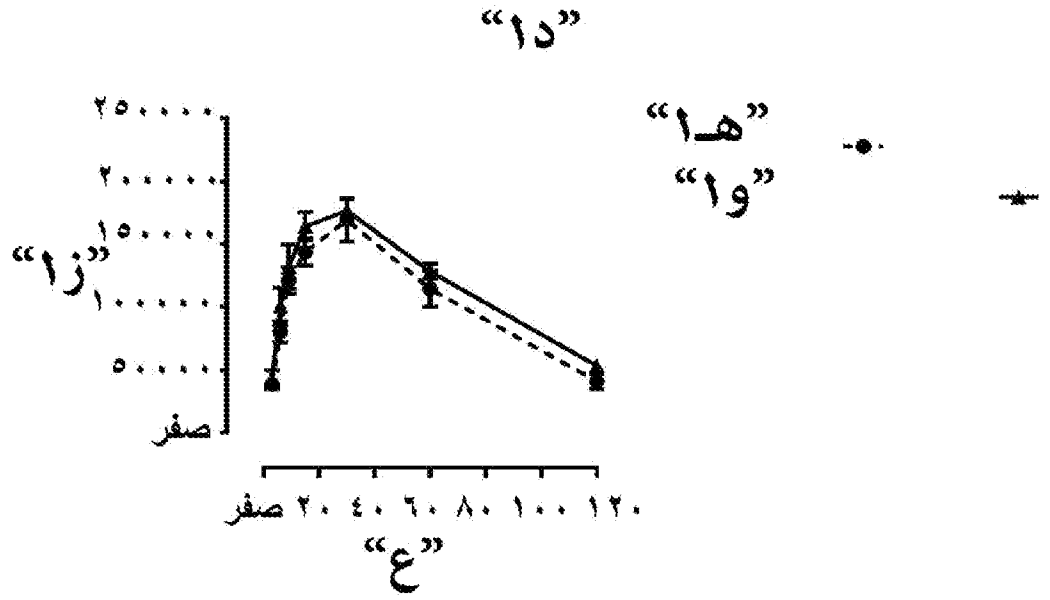


شكل ١٤جـ

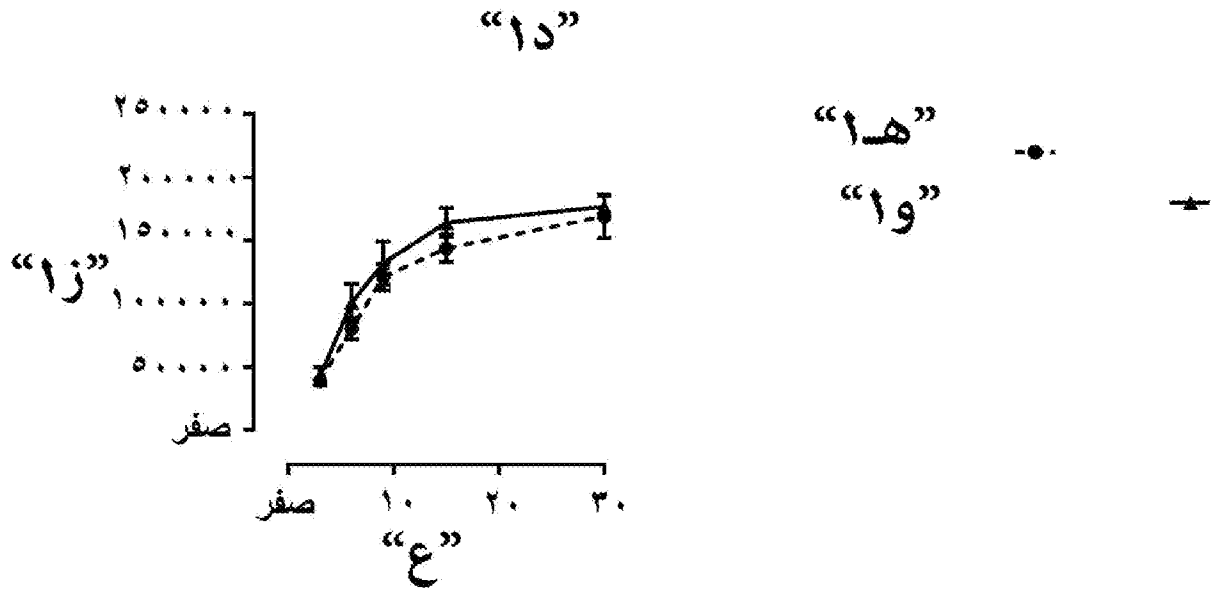
"أ١"



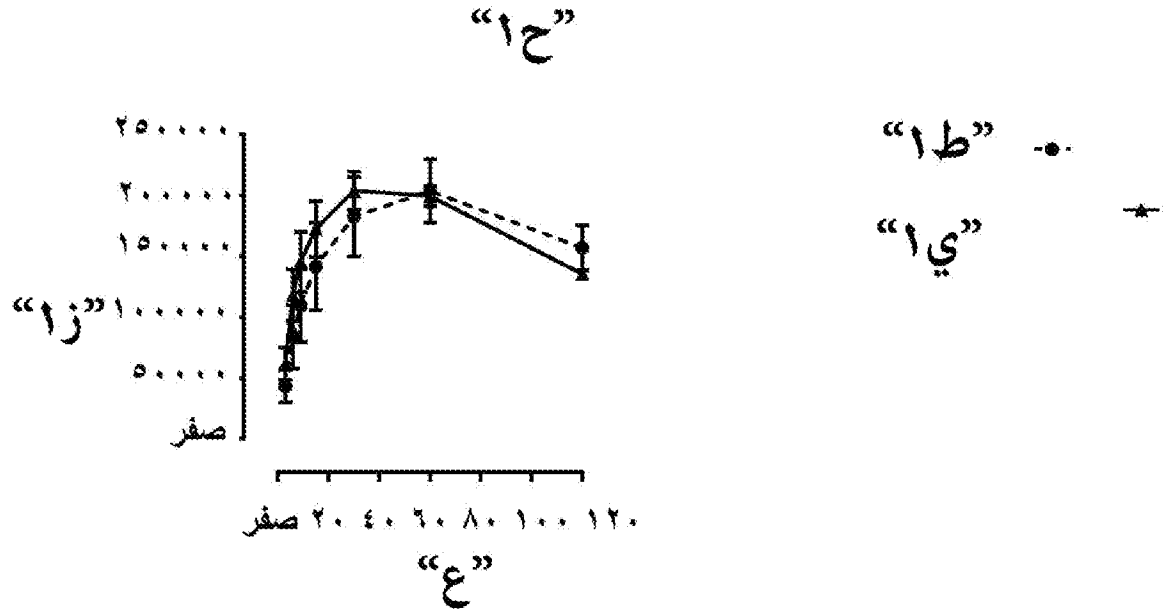
شكل ١٥


"د١"
"هـ١"
"و١"
"ز١"
٢٥٠٠٠٠
٢٠٠٠٠٠
١٥٠٠٠٠
١٠٠٠٠٠
٥٠٠٠٠
صفر
صفر ٢٠ ٤٠ ٦٠ ٨٠ ١٠٠ ١٢٠
"ع"

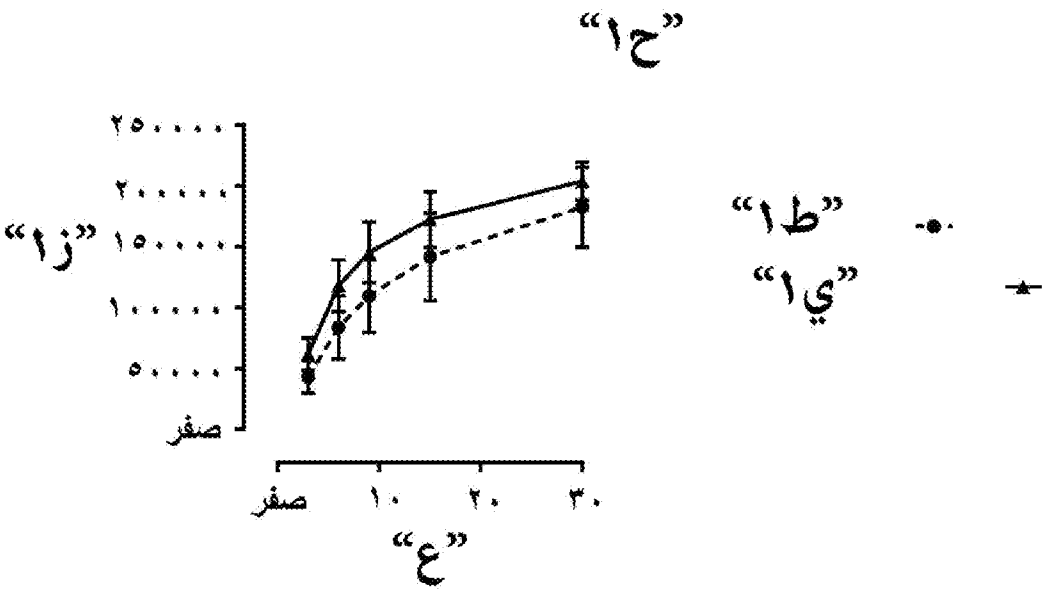
شكل ١٦


"د١"
"هـ١"
"و١"
"ز١"
٢٥٠٠٠٠
٢٠٠٠٠٠
١٥٠٠٠٠
١٠٠٠٠٠
٥٠٠٠٠
صفر
صفر ١٠ ٢٠ ٣٠
"ع"

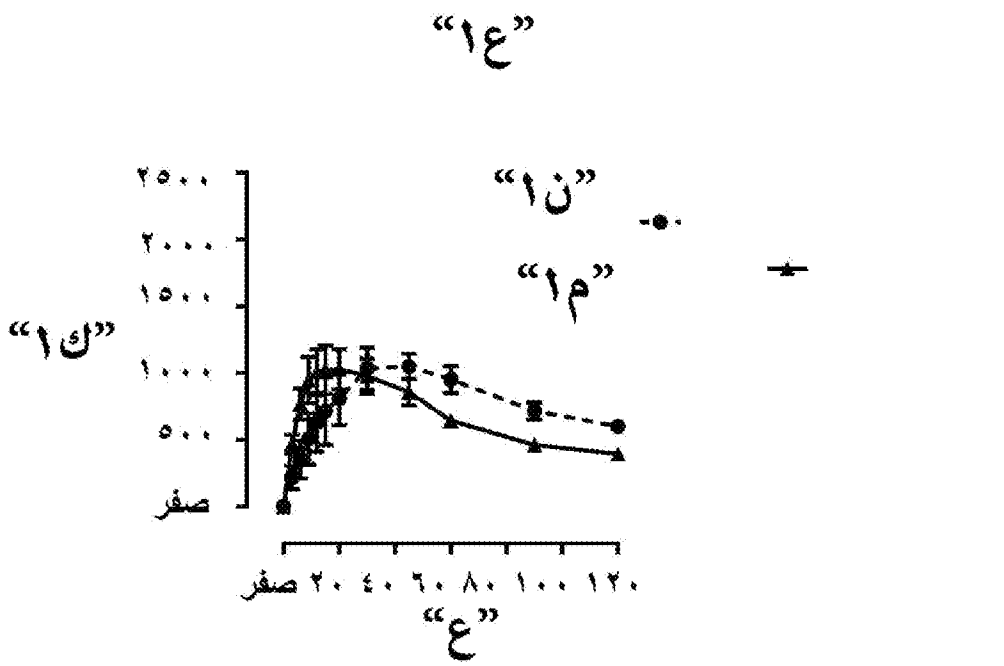
شكل ١٧


"ح١"
"ط١"
"ي١"
"ز١"
٢٥٠٠٠٠
٢٠٠٠٠٠
١٥٠٠٠٠
١٠٠٠٠٠
٥٠٠٠٠
صفر
صفر ٢٠ ٤٠ ٦٠ ٨٠ ١٠٠ ١٢٠
"ع"

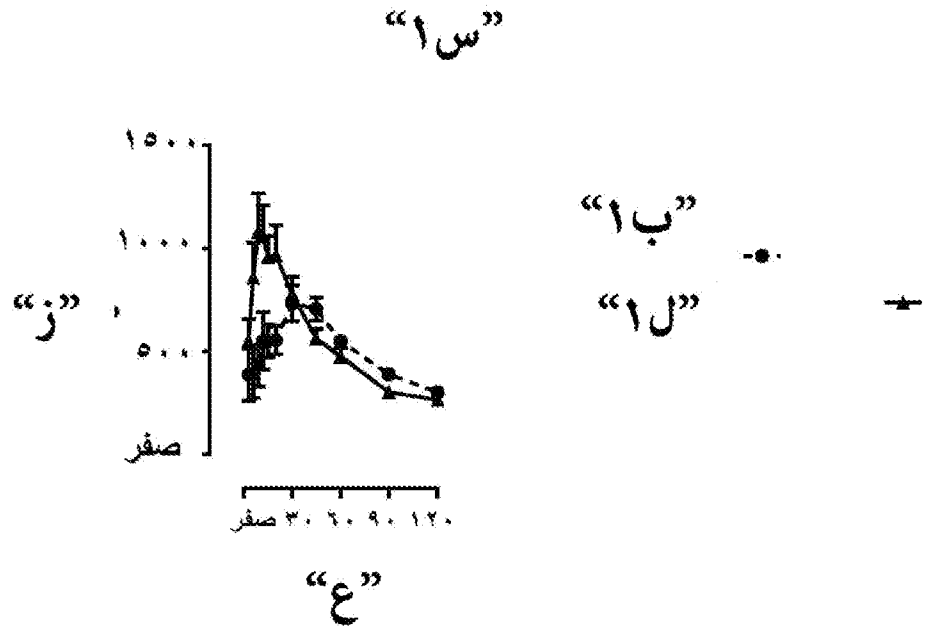
شكل ١٨


"ح١"
"ط١"
"ي١"
"ز١"
٢٥٠٠٠٠
٢٠٠٠٠٠
١٥٠٠٠٠
١٠٠٠٠٠
٥٠٠٠٠
صفر
صفر ١٠ ٢٠ ٣٠
"ع"

شكل ١٩


"ع١"
"ن١"
"م١"
"ك١"
٢٥٠٠
٢٠٠٠
١٥٠٠
١٠٠٠
٥٠٠
صفر
صفر ٢٠ ٤٠ ٦٠ ٨٠ ١٠٠ ١٢٠
"ع"

شكل ٢٠


"س١"
"ب١"
"ل١"
"ز"
١٥٠٠
١٠٠٠
٥٠٠
صفر
صفر ٣٠ ٦٠ ٩٠ ١٢٠
"ع"

شكل ٢١

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشـرط تسـديد المقابل المالي السـنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سـقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية.

صادرة عن

الهيئة السعودية للملكية الفكرية

ص ب ٦٥٣١ ، الرياض ١٣٣٢١ ، المملكة العربية السعودية

SAIP@SAIP.GOV.SA