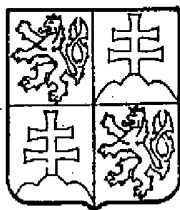


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 01142-90.T

(13) A3

5(51) C 07 K 15/06

(22) 08.03.90

(32) 08.03.89

(31) 89/111

(33) DK

(40) 19.02.92

(71) NOVO-NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK

(72) Halstrom John Broberg, Lyngby, DK

(54) Specificky glykosylované insulinové deriváty

(57) Specificky glykosylované insuliny a farmaceutické prostředky s jejich obsahem. Jde o mono-, di- nebo triglykosylované deriváty, které obsahují monosacharidový zbytek nebo oligosacharidovou skupinu se dvěma nebo třemi zbytky cukru. Uvedené deriváty jsou vysoce rozpustné a jejich účinek nastupuje rychleji než například u lidského insulinu.

Vynález se týká specificky glykosylovaných insulinových derivátů, které je možno zpracovat na farmaceutické prostředky, jakož i způsobu jejich výroby.

V posledních letech byla navrhována řada insulinových analogů pro léčbu cukrovky. Účelem navrhovaných derivátů bylo zlepšení léčby, při níž je nutno nahradit insulin tak, že by bylo použito dostupnějších insulinových analogů s rychlejším nebo protrahovanějším účinkem ve srovnání s účinkem lidského insulinu.

Problém, který je spojen s vývojem insulinových analogů substitucí jedné nebo většího počtu zbytků aminokyselin v nativním insulinu spočívá v tom, že vznikající látky mohou vyvolat imunologickou reakci. Mimoto často dochází také k problémům, které souvisí s neočekávanou rozpustností nebo nestálostí získané látky.

Insulin má poměrně krátký poločas v krevním oběhu, není však možno vyloučit, že dochází in vivo ke glykosylaci malého podílu insulinu nejen u diabetiků, jak je uváděno v publikaci Nakayama a další, "Nonenzymatic glycosylation of insulin, "Current topics in clinical and experimental aspects of diabetes mellitus", (1985), 201 až 204, Sakamoto, Min and Baba, Eds., Elsevier Science Publishers B.V., nýbrž také u lidí, kteří tímto onemocněním netrpí. Je tedy možno, že organismus již vyvinul mechanismus k potlačení tvorby protilátek proti glykosylovanému insulinu.

Je dále možné, že by bylo možno provést některé změny na sacharidové části k zakrytí přítomnosti antigenu.

Vazba glukosy, manosy a některých oligosacharidů na insulin byla podrobena velkému počtu studií in vitro, aby bylo možno prokázat, zda tvorba glykosylovaného insulinu in vivo může být příčinou pozdních komplikací u diabetiků. V publikaci Anzenbacher a další, *Biochimica et Biophysica Acta* 386 (1975), 603 až 607 se uvádí výsledky studií s vazbou D-glukosy na insulin při použití dialýzy s dosažením rovnovážného stavu. Vazba nebyla příliš specifická a průměrně se na molekulu insulinu vázalo osm molekul glukosy.

Interakce mezi insulinem a glukosou a mannosou je popsána v publikaci Dolhofer a další, *Febs Letters* 100 (1979), 133 až 136. Výsledky ukazují, že obě hexosy se mohou vázat kovalentně na molekulu insulinu v průběhu inkubace in vitro při teplotě 37 °C. Za zvolených reakčních podmínek se průměrně vázala $3,6 \pm 0,39$ zbytků glukosy a $5,0 \pm 0,43$ zbytků mannosy na molekulu insulinu.

Systém, v němž bylo uvolňování insulínu řízeno glukosou byl navrhován v publikaci Brownlee a Cerami, *Science* 206 (1979), 1190 až 1191, a *Diabetes* 32 (1983), 499 až 505, šlo o syntézu glykosylovaných derivátů insulinu, schopných kompetice s glukosou při vazbě na lectiny. S insulinem byly uváděny do reakce maltosa a jiné oligosacharidy.

Nakayama a další ve svrchu uvedené publikaci sledovali neenzymatickou glykosylaci insulinu in vitro a in vivo u diabetických nemocných a došli k závěru, že glukosa se včleňuje do molekuly insulinu in vivo za patologických podmínek. Při pokusech in vivo docházelo k vazbě tří molekul glukosy na jednu molekulu insulinu.

V publikaci Lapolla a další, Diabetes 37 (1988), 787 až 791 se popisuje snížená biologická účinnost in vivo pro insulin, glykosylovaný in vitro. Insulin byl glykosylován za přítomnosti vysoké koncentrace glukosy podle svrchu uvedené publikace Dolhoferovy ve vodném prostředí 17 hodin při teplotě 37 °C a pH 7,4. Vázalo se průměrné množství 2 moly glukosy na 1 mol insulinu.

Vzhledem k tomu, že natývní insulin má tři volné primární aminoskupiny v poloze B1 (Phe), A1 (Gly) a B29 (Lys), je zřejmé, že svrchu popsané glykosylované insulinové deriváty byly nehomogenní směsí glykosylovaných molekul insulinu.

Až dosud nebyly podniknuty žádné pokusy s frakcionací svrchu uvedených směsí na jejich jednotlivé složky.

Glykosylované insulinové deriváty pro samoregulující systémy uvolňování insulinu byly popsány v publikaci Kim a další, Journal of Controlled Release 1,

(1984), 57 až 66 a v US patentových spisech č. 4 483 792, 4 478 830, 4 478 746 a 4 489 063. V těchto glykosylovaných insulinových derivátech byla glukosa nebo mannosu vázána na insulin přes skupinu, odvozenou od dikarboxylových kyselin, anhydridu kyselin nebo fenylaminu nebo kombinaci těchto skupin.

V evropské patentové přihlášce č. 84200328, uveřejněné pod číslem 119 650 se popisují galaktosyl insulinové deriváty, které stejně jako glykosylované insuliny, popsané v Kimově svrchu uvedené publikaci obsahují mezi galaktosylovým zbytkem a molekulou insulinu skupinu, přes kterou jsou tyto zbytky vázány.

Vynález si klade za úkol navrhnout insulinové deriváty s dokonalejšími vlastnostmi. Zejména by mělo jít o insulinové deriváty, které by nevyvolávaly imunologickou reakci. Dále by měly tyto deriváty zajistit rychlejší nástup účinku než u nativního insulinu a zlepšit rozpustnost méně rozpustných insulinů a umožnit tak použití vysoce koncentrovaných roztoků, například u tak zvaných osmotických insulinových čerpadel. Nové deriváty by také neměly mít sklon k tvorbě fibril.

Předmětem vynálezu jsou tedy specificky glykosylované insulinové deriváty. Pod tímto pojmem se rozumí deriváty, v nichž se uhlohydrátová skupina nachází ve specifické poloze v molekule insulinu. Jak nebylo možno

očekávat, takto specificky glykosylované insulinové deriváty poskytují pro léčebné účely cenné výhody, jak bude patrné z dalšího popisu a z příkladové části.

Vynález se tedy týká specificky glykosylovaných insulinových derivátů, v užším smyslu derivátů, které jsou monoglykosylovány v polohách A1, B1 nebo B29, diglykosylovány v polohách A1 a B1, A1 a B29 nebo B1 a B29 nebo triglykosylovány v polohách A1, B1 a B29.

Glykosylované insuliny, které byly popsány ve svrchu uvedené publikaci Kima a dalších, jsou odlišné od insulinových derivátů podle vynálezu, v nichž se využívá vlastní aldehydové funkce cukru pro tvorbu kovalentní vazby s insulinem bez použití jiných pomocných skupin. Další výhodou insulinových derivátů podle vynálezu ve srovnání s deriváty podle uvedené publikace je zachování nativní distribuce náboje insulinové molekuly. Aminoskupiny, které se účastní glykosylační reakce jsou převáděny na sekundární aminoskupiny a jsou nadále schopné protonace jako v běžném insulinu.

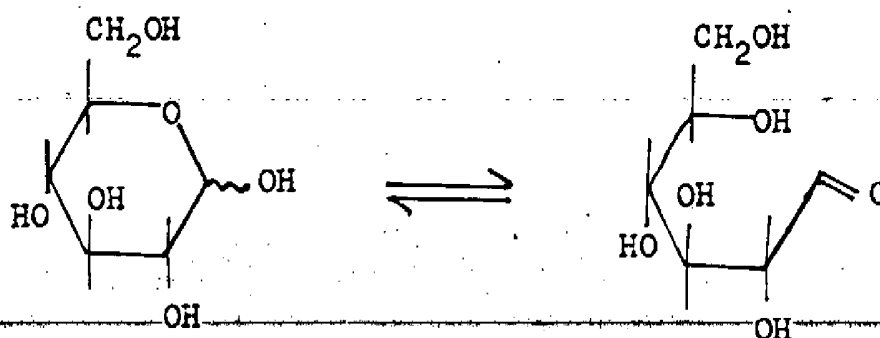
Nové insulinové deriváty mohou v každé z uvedených poloh obsahovat monosacharid nebo oligosacharid s obsahem až tří zbytků cukru. Vhodnými monosacharidy jsou glukosa, mannosa a galaktosa, vhodnými oligosacharidy maltosa, isomaltosa, laktosa, maltotriosa, melibiosa a cellobiosa.

Specificky glykosylované insulinové deriváty podle vynálezu je možno použít k léčbě cukrovky. Při úpravě insulinové léčby je také možno použít zvláštních směsí jednotlivých specificky glykosylovaných sloučenin.

Pod pojmem insuliny se rozumí nativní forma insulinu, například insulin člověka, skotu a vepře, avšak také deriváty těchto látek, v nichž bylo nahrazeno, přidáno nebo vypuštěno několik aminokyselin nebo alespoň jedna aminokyselina ve srovnání s přírodním insulinem, jak bylo popsáno v evropských patentových spisech č. 194 864A a 214 826A.

Jak již bylo uvedeno, nativní insuliny obsahují tři místa potenciální glykosylace, a to dva N-terminální zbytky aminokyselin v řetězci A a B a zbytek lysinu v poloze B29. Je zřejmé, že počet potenciálních míst pro glykosylaci u analogu insulinu svrchu popsaného typu se může pohybovat od dvou (dva N-terminální zbytky) až do většího počtu v závislosti na tom, kolik zbytků lysinu se nachází v modifikované molekule insulinu vzhledem k tomu, že lysin je jediná přírodně se vyskytující aminokyselina s volnou primární aminoskupinou v postranním řetězci.

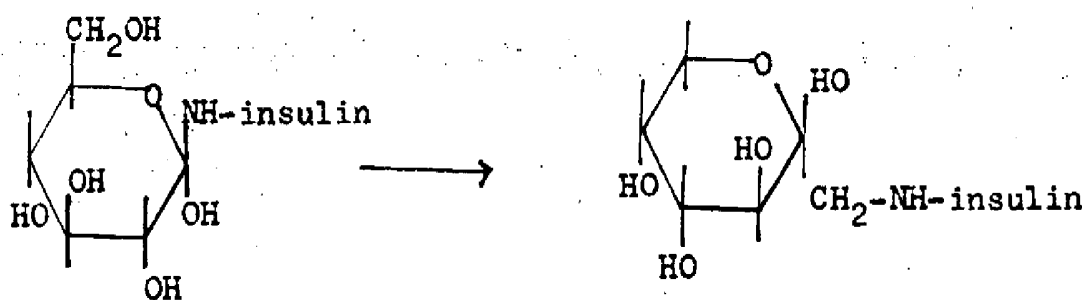
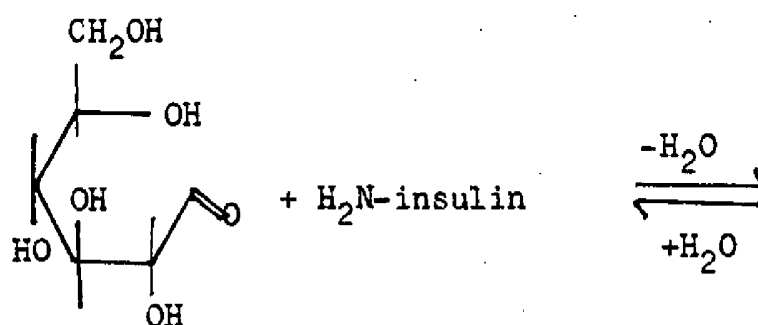
Glykosylace schematicky probíhá podle následujícího schématu, byla použita D-glukosa.



D-glukosa
pyranosová struktura

D-glukosa
řetězec

Reaktivní složkou je struktura ve formě řetězce.



glukosoinulin je možno vyjádřit také pojmem 1-deoxy-
-D-fruktosylinsulin, ve schematu se pod pojmem insulin
rozumí desaminoinsulin.

Svrchu uvedená reakce bude analogic-
kým způsobem probíhat také s použitím jiných monosacharidů

nebo oligosacharidů, které budou obsahovat volnou aldehydovou skupinu.

Dále budou uvedeny specifické příklady glykosylovaných insulinů; jde vždy o deriváty lidského insulinu:

Phe(B1) glukosoinulin,

Phe(B1) mannosoinulin,

Phe(B1), Lys(B29) digalaktosainulin,

Gly(A1), Lys(B29), digalaktosainulin,

Phe(B1), Gly(A1) diisomaltosoinulin,

Phe(B1), Lys(B29) diisomaltosoinulin,

Gly(A1), Lys(B29) diisomaltosoinulin,

Gly(A1), Phe(B1), Lys(B29) triglukosoinulin,

Gly(A1), Phe(B1), Lys(B29) trimaltosoinulin,

Gly(A1), Phe(B1), Lys(B29) trilaktosoinulin,

Gly(A1), Phe(B1), Lys(B29) trimaltotriosoinulin,

Gly(A1), Phe(B1), Lys(B29) trimannosoinulin,

Gly(A1), Phe(B1), Lys(B29) trigalaktosoinulin,

Gly(A1), Phe(B1), Lys(B29) triisomaltosoinulin,

Phe(B1) glukoso [Asp^{B10}] insulin,

Gly(A1), Phe(B1) diglukoso [Asp^{B10}] insulin.

Zajímavé jsou také specificky glykosylované insuliny jiných živočišných druhů, například insulin vepře.

Specificky glykosylované insulinové deriváty je možno získat reakcí insulinu nebo jeho analogů s přebytkem zvoleného monosacharidu nebo oligosacharidu ve vhodném organickém nebo vodném prostředí. Teplota se může měnit v rozmezí 20 až 60 °C. Z organických rozpouštědel je možno užít nižší karboxylové kyseliny, například kyselinu octovou a propionovou, nižší alifatické alkoholy, jako methanol, ethanol a 2-propanol, ethylenglykol a propylen-glykol, je však možno užít také fenoly.

Reakční doba a složení reakční směsi bude záviset na tom, zda je požadován monoglykosylovaný, diglykosylovaný nebo triglykosylovaný produkt. Reakci je možno sledovat vysokotlakou kapalinovou chromatografií v reversní fázi (dále RP HPLC) ke stanovení okamžiku maximální tvorby jednotlivých glykosylovaných produktů.

Reakce se zastaví zchlazením, například na -20 °C, reakční směs se pak odpaří do sucha, hlavní složky reakční směsi se pak izolují a čistí preparativní RP HPLC. Po odstranění solí je možno charakterizovat výsledný produkt hmotovou spektrometrií s použitím bombardování rychlými atomy (dále FAB-MS), kvantitativní analýzou aminokyselin po redukci borohydridem a biologickými zkouškami.

Glykosylované insulinové deriváty a jejich směsi je možno použít místo insulinu člověka nebo vepře ve známých farmaceutických prostředcích s obsahem

insulinu za vzniku nových farmaceutických prostředků. Tyto farmaceutické prostředky budou obsahovat glykosylovaný insulin nebo jeho sůl, vhodnou z farmaceutického hlediska ve vodném roztoku, s výhodou s neutrální hodnotou pH. Vodné prostředí může obsahovat látku, zajišťující isotonicitu, jako chlorid sodný, octan sodný nebo glycerol. Mimoto může vodné prostředí obsahovat zinečnaté ionty, pufrý, jako acétátový nebo fosfátový pufr a konzervační prostředky, jako m-kresol, methylparaben nebo fenol. Hodnota pH se upraví na vhodnou hodnotu a výsledný prostředek je možno sterilizovat filtrací.

Nové prostředky s obsahem insulinu podle vynálezu je možno užít obdobným způsobem jako známé prostředky s obsahem insulinu.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady.

P ř í k l a d 1

Phe(B1) glukoseinsulin

0,1 mmol lidského insulinu se uvede do suspenze ve 30 ml methanolu a při teplotě místnosti se přidá 5 ml ledové kyseliny octové. Směs se opatrně míchá

až do rozpuštění insulínu. Pak se přidá další množství 35 ml methanolu a po přidání 2,2 mmol D-glukosy se směs opatrně míchá 8 hodin při teplotě 40 °C, po této době se stává výsledný produkt hlavní složkou reakční směsi.

Roztok se zahustí téměř do sucha na rotačním odpařovači. Pak se odparek rozpustí ve vodě a podrobí se frakcionaci pomocí preparativní RP HPLC. Užije se sloupec o rozměru 16 x 250 mm se 7, μ m 100 Å C₁₈ částic. Teplota je 30 °C, mobilní fáze. A: 0,04 M kyseliny fosforečné, 0,2 M síranu sodného, 10 % acetonitrilu, pH 2,5 po úpravě ethanolaminem. B: 50% acetonitril.

Frakce, odpovídající centrální části hlavního vrcholu se zbaví solí a lyofilizuje. Výtěžek je 0,02 mmol. Produkt byl charakterizován FAB-MS a kvantitativní analýzou aminokyselin po redukci hydroborátem. Analýza aminokyselin prokázala dva zbytky fenylalaninu, to jest o jeden zbytek fenylalaninu méně než v lidském insulínu, patrně v důsledku substituce na Phe(B1). Molekulová hmotnost byla 5970, teoretická hodnota je 5970.

Příklad 2

Phe(B1),Gly(A1) diglukosoinšulin

Svrchu uvedená sloučenina byla získána způsobem podle příkladu 1 s tím rozdílem, že reakční doba byla 16 hodin místo 8 hodin, čímž se výsledný produkt stal hlavní složkou reakční směsi. Výtěžek byl 0,06 mmol.

Analýza aminokyselin prokázala o jeden zbytek Phe a o jeden zbytek Gly méně vzhledem k substituci v poloze A1 a B1.

Molekulová hmotnost byla 6132, teoretická hodnota je 6132.

Absorpce po podkožním podání byla stanovena u vepřů při injekčním podání ^{125}I značeného Phe(B1), Gly(A1) diglukosoinšulinu, získaného způsobem podle publikace Jørgensen a další, Diabetologia 19 (1980), 546 až 554. Rychlost absorpce po podkožní injekci ^{125}I -lidského inšulinu a ^{125}I Phe(B1),Gly(A1) diglukosoinšulinu lidského původu je uvedena v následující tabulce 1. Hodnoty T_{75} , T_{50} a T_{25} v tabulce 1 znamenají čas v hodinách, který uplynul od okamžiku injekčního podání vzorku do změření radioaktivity a do jejího poklesu v místě podání na 75 %, 50 % a 25 % počáteční hodnoty. Z tabulky 1 je zřejmé, že glykosylovaný inšulin se vstřebává rychleji než lidský inšulin.

T a b u l k a 1

	T ₇₅	T ₅₀	T ₂₅
lidský insulin	1,12	2,33	3,69
lidský diglukosoinsulin	0,65	1,47	2,76

Účinek lidského insulinu (ActrapidTM)
a lidského Gly(A1),Phe(B1) diglukosoinsulinu po podkožním
podání u vepřů (průměr z pěti zvířat) v množství 0,1 jed-
notka/kg je uveden v následující tabulce 2, která uvádí
glukosu v mmol/l.

T a b u l k a 2

čas v h	lidský insulin	lidský diglukosoinsulin
-0,33	5,30	5,24
0	5,36	5,32
0,33	4,78	4,76
0,67	4,72	4,06
1	4,12	3,34
1,5	3,60	2,98
2	3,24	2,84
2,5	3,28	2,96
3	3,18	3,14
4	3,34	3,96

Tabulka 2 prokazuje rychlejší účinek diglukosinsulinu ve srovnání s lidským insulinem.

Imunologická odpověď u králíků (průměr z 10 králíků) pro lidský insulin, insulin skotu a lidský Gly(A1),Phe(B1) diglukosinsulin je uvedena v tabulce 3, kde jsou uvedeny hodnoty vazby v králičím seru v procentech podle publikace Schlichtkrull a další, Horm. Metab. Res. Suppl. ser. 5 (1974), 134 až 143.

T a b u l k a 3

čas, dny	lidský insulin	insulin skotu	lidský diglukosinsulin
0	1,9	-0,4	1,2
13	2,3	0,6	1,3
27	3,0	28,5	1,5
41	3,2	29,7	1,4
55	4,3	30,7	1,1
69	3,9	32,7	2,2
83	2,4	30,1	1,1
97	2,0	32,6	1,5

Z tabulky 3 je zřejmé, že lidský diglukosinsulin vyvolává neočekávaně nízkou imunologickou odpověď, srovnatelnou s odpovědí na lidský insulin.

Příklad 3

Analogickým způsobem byly získány také následující sloučeniny. Molekulová hmotnost byla zjišťována FAB-MS nebo hmotovou spektrometrií s plasmatickou desorpací, tyto hodnoty jsou spolu s vypočítanou molekulovou hmotností uvedeny v tabulce pro každou látku.

sloučenina	molekulová hmotnost	
	vypočítáno	nalezeno
Phe(B1) galaktosoinsulin	5956	5970
Phe(B1) maltosoinsulin	6119	6132
Phe(B1) laktosoinsulin	6125	= 6132
Phe(B1) maltotriosoinsulin	6288	6294
Gly(A1),Phe(B1) dimaltosoinsulin	6444	6456
Gly(A1),Phe(B1) dilaktosainsulin	6446	6456
Gly(A1),Phe(B1) dimaltotriosoinsulin	6771	6780
Gly(A1),Phe(B1),Lys(B29) triglukoso- insulin	6294	6294
Gly(A1),Phe(B1) diglukoso [Asp ^{B10}] insulin	6112	6110

Šlo vždy o deriváty lidského insulinu. Uložení zbytků cukrů bylo potvrzeno redukcí hydroborátem s následnou kvantitativní analýzou aminokyselin.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Specificky glykosylovaný insulin, vyznačující se tím, že obsahuje jeden nebo větší počet monosacharidových zbytků nebo jeden nebo větší počet oligosacharidových skupin s až třemi zbytky cukru.

2. Specificky glykosylovaný insulin podle bodu 1, vyznačující se tím, že obsahuje jeden zbytek monosacharidu nebo jednu oligosacharidovou skupinu s až třemi zbytky cukru.

3. Specificky glykosylovaný insulin podle bodu 1, vyznačující se tím, že obsahuje dva zbytky monosacharidu nebo dvě oligosacharidové skupiny s až třemi zbytky cukru.

4. Specificky glykosylovaný insulin podle bodu 1, vyznačující se tím, že obsahuje tři zbytky monosacharidu nebo tři oligosacharidové skupiny s až třemi zbytky cukru.

5. Specificky glykosylovaný insulin podle bodu 1, vyznačující se tím, že je monoglykosylován v poloze A1, B1 nebo B29.

02. V 90	020535
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	č. j.
PŘIL.	

N 1142-90T

6. Specificky glykosylovaný insulin podle bodu 3, vyznačující se tím, že je diglykosylován v polohách A1 a B1, A1 a B29 nebo B1 a B29.

7. Specificky glykosylovaný insulin podle bodu 4, vyznačující se tím, že je triglykosylován v polohách A1, B1 a B29.

8. Specificky glykosylovaný insulin podle bodů 1 až 7, vyznačující se tím, že v poloze B10 obsahuje Asp.

9. Specificky glykosylovaný insulin podle bodů 1 až 8, vyznačující se tím, že je odvozen od lidského insulinu.

10. Lidský Phe(B1) glukosoinulin.

11. Lidský Phe(B1),Gly(A1) diglukosoinulin.

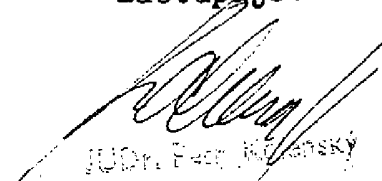
12. Prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje alespoň 90 %, s výhodou alespoň 95 %, a zvláště alespoň 99 % specificky glykosylovaného insulinu podle bodů 1 až 11.

13. Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje specificky glykosylovaný insulin podle bodů 1 až 12, nebo jeho sůl, přijatelnou z farmaceutic-

kého hlediska, popřípadě spolu s obvyklými pomocnými látkami, přísadami a konzervačními látkami.

14. Způsob výroby specificky glykosylovaného insulínu podle bodů 1 až 9, vyznačující se tím, že se odpovídající insulin uvede do reakce ve vodném nebo organickém prostředí s monosacharidem, který obsahuje volnou aldehydovou skupinu nebo oligosacharidem, který obsahuje volnou aldehydovou skupinu, a až tři zbytky cukru, načež se výsledný produkt z reakční směsi izoluje.

Zastupuje:


JUDr. Petr Křížanský