

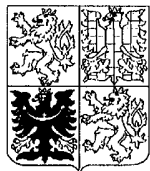
# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2000 - 2339**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.12.1997 11.06.1998  
25.11.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/068601 1998/088859  
1998/109940**

(33) Země priority: **US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**  
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/27299**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/32116**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**A 61 K 31/44**

**A 61 P 3/10**

(71) Přihlašovatel:

ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US;

(72) Původce:

Brader Mark Laurence, Indianapolis, IN, US;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nerozpustné kompozice pro ovlivňování glukózy  
v krvi**

(57) Anotace:

Řešení se týká nerozpustných kompozic, obsahujících protein zvolený ze souboru, zahrnujícího inzulín, inzulínové analogy a proinzulíny; derivatizovaný protein zvolený ze souboru, zahrnujícího derivatizovaný inzulín, derivatizovaný inzulínový analog a derivatizovaný proinzulín; komplexující sloučeninu; hexamer-stabilizující sloučeninu; a divalentní kationt kovu. Přípravky s obsahem nerozpustné kompozice jsou vhodné pro parenterální i neparenterální podávání pro léčení hyperglykémie a diabetu. Mikrokrystalická forma nerozpustného precipitátu je farmaceuticky analogická neutrální protaminové Hagedornově (NPH) formě krystalů inzulínu. Překvapivě bylo zjištěno, že suspenzní přípravky s obsahem takových nerozpustných kompozic mají jedinečné a kontrolovatelné vlastnosti rozpouštění, které umožňují terapeuticky výhodnou glukodynamiku ve srovnání s inzulínovými NPH přípravky.

CZ 2000 - 2339 A3

## **Nerozpustné kompozice na ovlivňování glukózy v krvi**

### **Oblast techniky**

Vynález se týká nerozpustných kompozic na ovlivňování glukózy v krvi. Obecněji se vynález týká oblasti farmaceutického léčení onemocnění diabetu a hyperglykémie.

### **Dosavadní stav techniky**

Po dlouhou dobu bylo cílem inzulínové terapie napodobování způsobu endogenní sekrece inzulínu u normálních osob. Denní fyziologická potřeba inzulínu se mění a může být rozdělena na dvě fáze:

- 1) absorpční fáze, vyžadující příliv inzulínu pro zpracování dávky glukóza v krvi, vztahující se k příjmu potravy, a
- 2) post-absorpční fáze, vyžadující udržované dodávání inzulínu pro regulaci výstupu hepatické glukózy pro udržování optimální hladiny glukózy v krvi v období bez příjmu potravy. V souladu s tím účinná terapie pro osoby trpící diabetem obvykle zahrnuje kombinované používání dvou typů exogenních inzulínových přípravků: rychle působící inzulín pro podávání v době jídla, podávaný jednorázovou injekcí a dlouhodobě působící, tak zvaný bazální inzulín, podávaný injekcí jednou nebo dvakrát denně pro řízení hladiny glukózy v krvi mezi jídly. Ideální bazální inzulín by měl poskytnout prodlouženou a "plochou" dobu působení - to znamená, že bude řídit hladinu glukózy v krvi po alespoň 12 hodin a výhodně po 24 hodin nebo více, aniž by docházelo

k riziku hypoglykémie. Kromě toho by měl být ideální bazální inzulín mísitelný s rozpustným inzulínem podávaným v době jídla a neměl by způsobovat podráždění nebo reakci v místě podávání. Nakonec by mělo být pro pacienta možné bazální inzulín snadno a stejnoměrně resuspendovat před podáním.

Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že inzulínové přípravky s dlouhým působením se získají upravením normálního inzulínu ve formě mikrokrystalických suspenzí pro podkožní injekce. Příklady komerčních bazálních inzulínových přípravků zahrnuje NPH (Neutral Protamine Hagedorn) inzulín, protaminový zinkový inzulín (PZI) a ultralente (UL).

Časně verze současných komerčních NPH inzulínů, které obsahovaly velké množství protamin byly vyvinuty v třicátých letech Scottem a kol. [J. Pharmacol. Exp. Ther. 58:78 a následující (1936)] a Hagedornem a kol. [J. Am. Med. Assoc. 106:177-180 (1936)]. V roce 1946 byl vyvinut NPH inzulín, který měl isofanový poměr inzulínu a protaminu, spolu se zinkem, Krayenbuhl a kol. [Rep. Steno Mam. Hosp. Nord. Inzulínlab. 1:60 a následující (1946)]. Tito výzkumníci zjistili, že pokud inzulín a protamin byly kombinovány v tak zvaném isofanovém poměru při neutrálním pH, v přítomnosti zinku a fenolové sloučeniny, vytvořil se amorfní precipitát a v klidu se amorfní precipitát přeměnil na podlouhlé tetragonální krystaly, které měly pyramidově tvarované konce. Tyto krystaly byly popsány jako tyčinkovité (rod-like). Bylo pozorováno, že isofanový poměr inzulínu a protaminsulfátu je zhruba 0,09 mg protaminsulfátu na jeden mg inzulínu. Zinek je třeba v množství alespoň zhruba 3,5 µg na jeden mg inzulínu a fenolová sloučenina v koncentraci

vyšší než zhruba 0,1 %.

Inzulín NPH je nejčastěji používaný inzulínový přípravek, který představuje 50 až 70 procent světově používaného inzulínu. Jedná se o suspenzi mikrokrystalického komplexu inzulínu, zinku, protaminu a jednoho nebo více fenolových konzervačních činidel. NPH inzulínové přípravky, které jsou komerčně dostupné, obsahují lidský inzulín, prasečí inzulín, hovězí inzulín nebo jejich směsi. Přípravku NPH podobné přípravky obsahující monomerní inzulínový analog, LysB298, ProB29-analog lidského inzulínu, jsou také v oboru známy [a jsou dále označovány jako "NPL"; De Felippis, M. R., U.S. patent č. 5,461,031, vydaný 24. října 1995; De Felippis, M. R., U.S. patent č. 5,650,486, vydaný 22. července 1997; a De Felippis, M. R., U.S. patent č. 5,747,642, vydaný 5. května 1998]. Obecně se uznává, že inzulín NPH přináší prodlouženou kontrolu glukózy v krvi ve srovnání s obvyklým inzulínem, neboť inzulín se nejprve musí rozpustit z NPH mikrokrystalů inzulínu předtím, než je absorbován. V případě obvyklého inzulínu není před absorpcí potřeba žádného rozpouštění. U inzulínu NPH je rozpouštění faktor, řídící rychlost při určování farmakodynamiky a farmakokinetiky.

Mikrokrystaly NPH inzulínu mají výraznou tyčinkovou morfologii s typickými rozměry zhruba 5 mikronů délka, 1 mikron tloušťka a 1 mikron šířka. K prodlouženému trvání působení mikrokrystalů NPH inzulínu dochází v důsledku jejich pomalé absorpce z místa podkožní injekce.

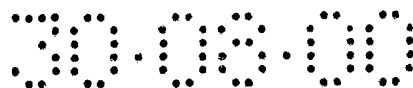
Terapie, která využívá současné NPH inzulínové přípravky ale

neumožňuje dosáhnout ideální "plochou" farmakokinetiku, nutnou k udržování optimální hladiny glukóza v krvi během hladovění po prodlouženou dobu mezi jídly. Následkem toho může léčení pomocí NPH inzulínu vést k nežádoucím vysokým hladinám inzulínu v krvi, což může způsobit život ohrožující hypoglykémii.

Kromě toho, že nemůže dosáhnout ideální plochý farmakokinetický profil, trvání působení NPH inzulínu také není ideální. Konkrétně největší problém spojený s NPH terapií je tak zvaný "dawn phenomenon", což je hyperglykémie, která vede ke ztrátě účinné kontroly glukózy přes noc, kdy pacient spí. Tyto nedostatky glykemické kontroly přispívají k vážným dlouhodobým lékařským komplikacím diabetu a přináší značné nevýhody a snížení kvality života pacient.

Protaminový zinkový inzulín (PZI) má složení podobné jako NPH, ale obsahuje vyšší množství protaminu a zinku než NPH. PZI přípravky mohou být vytvořeny jako amorfní precipitáty se střední dobou působení nebo krystalický materiál s dlouhodobým působením. PZI však není ideální bazální inzulín, protože není mísitelný s rozpustným inzulínem určeným pro dobu jídla a vysoký obsah zinku a protaminu mohou způsobovat podráždění nebo reakce v místě podávání.

Lidský inzulín ultralente je mikrokrystalický inzulínový přípravek, který obsahuje vyšší hladinu zinku než NPH a neobsahuje ani protamin ani fenolové konzervační činidlo zabudované do mikrokrystalu. Lidské ultralente přípravky přinášejí střední dobu působení, která není vhodně plochá a



nevytvářejí stabilní směsi s inzulínem. Kromě toho je obtížné je resuspendovat.

Byly činěny pokusy odstranit přetrvávající nedostatky známých inzulínových suspenzí. Mastnou kyselinou acylované inzulíny byly zkoumány pro bazální kontrolu glukózy v krvi [Havelund, S. a kol., WIPO publikovaná přihláška WO95/07931, 23. březen 1995]. Jejich prodloužená doba působení je způsobena vazbou části těchto molekul, tvořené mastnou kyselinou, k sérovému albuminu. Délka mastného acylového řetězce těchto molekul je taková, aby byla využita výhoda vazby mastné kyseliny k sérovému albuminu. Řetězce mastných kyselin, použité v mastnou kyselinou acylovaných inzulínech jsou typicky delší než zhruba deset atomů uhlíku a délka řetězce rovnající se čtrnácti až šestnácti atomům uhlíku je optimální pro vazbu mastné kyseliny k sérovému albuminu a k prodloužené době působení.

Na rozdíl od NPH inzulínu, který nerozpustný, výše uvedené mastnou kyselinou acylované inzulíny jsou rozpustné při obvyklých terapeutických koncentracích inzulínu. Avšak doba působení těchto přípravků může být nedostatečně krátká a nebo není dostatečně plochá, pro zajištění ideální bazální kontroly a jsou slabší než inzulín, což vyžaduje podávání větších množství léčiva [Radziuk, J. a kol., Diabetologia 41:116-120, 489-490 (1998)].

Whittingham, J. L. a kol. [Biochemistry 36:2826-2831 (1997)] krystalizovali B29-Nε-tetradekanoyl-des(B30)-analog lidského inzulínu jako hexamerový komplex se zinkem a fenolem pro účely strukturálních studií rentgenovou krystalografií. Bylo



zjištěno, že hexamer má R6 konformace a že má jisté vlastnosti, kterými se odlišuje od hexamerů lidského inzulínu. Whittingham a kol. nepopisují žádné farmaceutické nebo farmakologické vlastnosti krystalů, které byly vytvořeny, ani nenaznačují, že by krystaly měly výhodné vlastnosti pro léčení diabetu nebo hyperglykémie. Z práce Whittinghama a kol. není možné předpovídat, že protamin obsahující krystaly NPH typu by mohly být vytvořeny z derivatizovaných inzulínů a inzulínových analogů nebo jaká by mohla být farmakokinetická nebo farmakodynamická odezva takových krystalů.

Přetrvává tedy potřeba identifikovat inzulínové přípravky, které by měly plošší a delší dobu působení než NPH inzulín, které by byly mísitelné s vodou rozpustnými inzulíny pro dobu jídla, které by bylo možno snadno resuspendovat a které by nepřinášely nebezpečí podráždění nebo reakce v místě podávání. Přihlašovatel zcela neočekávaně zjistil, že tyto vlastnosti je možno zajistit použitím nerozpustných kompozice, které obsahují derivatizovaný protein, nederivatizovaný protein, zinek, protamin a fenolové konzervační činidlo. Kromě výše uvedených vlastností mají nerozpustný kompozice podle vynálezu flexibilitu trvání kontroly a tvaru profilu glukodynamické odezvy. Jsou považovány za kompozice, které pracují s řízeným uvolňováním a u kterých je rychlost uvolňování řízena poměrem a povahou derivatizovaného proteinu. Jedním předmětem předloženého vynálezu je tedy nerozpustná kompozice, obsahující nederivatizovaný protein, derivatizovaný protein, komplexující sloučeninu, hexamer-stabilizující sloučeninu a divalentní kationt kovu. Dalšími předměty předloženého



vynálezu, které budou dále diskutovány, jsou příprava, vytváření farmaceutických přípravků a použití takových kompozic.

Přihlašovatelé nejsou známy příklady směsí derivatizovaných a nederivatizovaných inzulinů, jak jsou uvedené výrazy chápány v předloženém textu. Jsou známy krystaly skládající se z proinzulinu a inzulinu [Steiner, D. F., Nature 243:528-530 (1973); Low, B. W. a kol., Nature 248:339-340 (1974)] a krystaly skládající se z inzulinu nebo inzulinového analogu o přibližně stejném isoelektrickém bodu jako inzulin a inzulinový analog, obsahující dodatečné základní aminokyseliny [Dörschug, M. a kol., U.S. patent č. 5,028,587, vydaný 2. července 1991].

Steiner vytvářel krystaly, skládající se z proinzulinu a inzulinu s molárními poměry zhruba 1:11, 1:5, 1:2 a 1:1 (to znamená 0,5, 1, 2 a 3 moly proinzulinu na 6 molů celkového souhrnu inzulinu a proinzulinu) v 0,095 M citrátu sodném, pH 6,0, 0,03 M NaCl, 0,012 M ZnCl<sub>2</sub> a 16% acetonu. Množství proinzulinu silně ovlivňovalo rychlost krystalizace. Krystaly se velmi lišily od krystalů čistého inzulinu za stejných podmínek a byly charakterizovány jako rhomboedrální krystaly se zaoblenými okraji. Uvnitř a mezi jednotlivými přípravky docházelo k velkým rozdílům. Užitečnost, připisovaná krystalizaci proinzulinu a inzulinu spočívala v tom, že usnadňovala izolaci malých množství proinzulinu a k němu se vztahující struktura z extraktů slinivky břišní. Autor uvažoval o tom, zda může dojít ke krystalizaci mezi prekurzory a výslednými peptidy a mezi dalšími úzce příbuznými proteiny.



Low, B. W. a kol. vytvořili velmi velké krystaly, sestávající z ekvimolárních podílů hovězího nebo prasečího inzulín a jejich odpovídajících proinzulínů, přičemž proinzulín a inzulín byly před krystalizací tvarovány do homogenních hexamerů. RTG krystalografická analýza a kvantitativní elektroforéza podpořily závěr, že jednotkové buňky v krystalech byly vytvořeny dvanácti inzulínovými hexamery a dvanácti proinzulínovými hexamery. Specificky bylo konstatováno, že nebyly známy žádné studie, které by naznačovaly, že inzulín a proinzulín vytvářejí smíšené dimery a hexamery v roztoku.

Dörschug, M. a kol. popsali krystaly, sestávající z inzulínu, des(PheB1) inzulínu, des(ThrB30) lidského inzulínu nebo des(AlaB30) hovězího inzulínu a alespoň jednoho inzulínu, který má bázičnou modifikaci na C-terminálním konci B řetězce ("modifikovaný inzulín"). Takové modifikované inzulíny jsou popsány například v evropské patentové přihlášce č. 132,765. Globin nebo protaminsulfát byly uvedeny jako pomocné sloučeniny, které mohou být použity v krystalických přípravcích. Nejsou uvedeny žádné příklady použití protaminu ani žádný náznak toho, že by vynálezci uvažovali účinek přidání takových sloučenin. Kromě toho jsou modifikované inzulíny, používané v Dörschug a kol., odlišné od derivátů používaných podle předloženého vynálezu.

Jak bylo uvedeno výše, přihlašovatel neočekávaně pozoroval, že pokud protein, zvolený ze souboru, zahrnujícího inzulín, inzulínový analog a proinzulín se učiní méně rozpustný ve

vodném rozpouštědle nebo více lipofilní derivatizací skupiny v jednom nebo více jeho reaktivních míst, derivatizovaný protein a nederivatizovaný protein zvolené ze souboru, zahrnujícího inzulín, inzulínový analog a proinzulín mohou být vloženy do nerozpustných precipitátů a do krystalů podobných NPH, s obsahem protaminu. Pokud jsou takové proteiny společně precipitovány nebo krystalizovány pro vytvoření nerozpustných kompozic, rychlost rozpouštění, kterou se proteiny rozpouštějí z nerozpustných kompozic je značně snížena ve srovnání s rychlostí, kterou se rozpouštějí fyzicky podobné nerozpustné kompozice, obsahující nederivatizovaný protein.

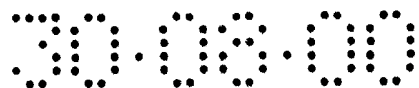
Přihlašovatel také objevil, že jak amorfni precipitáty, tak i mikrokristaly s obsahem derivatizovaného proteinu, proteinu, komplexující sloučeniny, divalentního kationtu kovu a hexamer-stabilizující sloučeniny přinášejí plošší a delší dobu působení, než k jaké dochází u fyzikálně podobných mikrokristalů, tvořených výhradně nederivatizovaným proteinem. Navíc přihlašovatel neočekávaně zjistil, že výhoda plošší a delší doby působení může být dosažena dokonce i u amorfni precipitátů, obsahujících jeden z proteinů a derivatizovaný protein.

#### Podstata vynálezu

Předložený vynález se ve svém nejširším rozsahu týká nerozpustných kompozic, obsahujících derivatizovaný protein, zvolen ze souboru, zahrnujícího inzulínový derivát, derivát inzulínového analogu a proinzulínový derivát, protein zvolený ze souboru, zahrnujícího inzulín, inzulínové analogy

a proinzulíny, komplexující sloučeninu, hexamer-stabilizující sloučeninu a divalentní kationt kovu. Derivatizovaný protein je buď méně rozpustný ve vodném rozpouštědle než nederivatizovaný protein, je více lipofilní, než nederivatizovaný inzulin, nebo vytváří komplex se zinkem a protaminem, který je méně rozpustný než odpovídající komplex s nederivatizovaným proteinem. Nerozpustné kompozice podle předloženého vynálezu mohou být ve formě amorfních precipitátů nebo výhodněji ve formě mikrokryсталů. Mikrokryсталy mohou mít tyčinkový tvar nebo mít nepravidelnou morfologii. Tyto nerozpustné kompozice jsou použitelné pro léčení diabetu a hyperglykémie a přináší výhodu plošší a delší doby působení než NPH inzulin. Nerozpustné kompozice jsou mísitelné do přípravku s rozpustným proteinem nebo s rozpustným derivatizovaným proteinem nebo oběma. Změnou poměru mezi proteinem a derivatizovaným proteinem může být hodnota prodloužení doby působení jemně řízena ve velmi širokém rozmezí dob působení od přibližně stejné jako u NPH inzulinu do daleko více než u NPH inzulin.

Konkrétněji předložený vynález přináší nerozpustné kompozice proteinů a mastnou kyselinou acylovaných proteinů, které jsou použitelné pro léčení diabetu a hyperglykémie. Tyto kompozice sestávají z mastnou kyselinou acylovaného proteinu, zvoleného ze souboru, zahrnujícího mastnou kyselinou acylovaný inzulin, mastnou kyselinou acylovaný inzulinový analog a mastnou kyselinou acylovaný proinzulin, protein zvolený ze souboru, zahrnujícího inzulin, inzulinové analogy a proinzulin, protamin, fenolové konzervační činidlo a zinek. Předložený vynález se odlišuje od předchozích

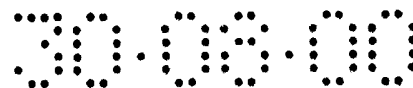


technik mastnou kyselinou acylovaných inzulinů tím, že prodloužená doba působení podle předloženého vynálezu se neváže nutně na vazbu albuminu, ačkoliv vazba k albuminu může dále prodloužit dobu působení jistých kompozic podle předloženého vynálezu.

Předložený vynález se týká mikrokrystalů obsahujících protein zvolený ze souboru, zahrnujícího inzulin, inzulinový analog a proinzulin, derivatizovaný protein zvolený ze souboru, zahrnujícího derivatizovaný inzulin, derivatizovaný inzulinový analog a derivatizovaný proinzulin, komplexující sloučeninu, divalentní kationt kovu a hexamer-stabilizující sloučeninu. Mikrokrystaly podle předloženého vynálezu jsou použitelné pro léčení diabetu a pro řízení hladiny glukózy v krvi u pacienta, který má jejich potřebu.

Předložený vynález se týká amorfního precipitátu obsahujícího protein zvolený ze souboru, zahrnujícího inzulin, inzulinový analog a proinzulin; derivatizovaný protein zvolený ze souboru, zahrnujícího derivatizovaný inzulin, derivatizovaný inzulinový analog a derivatizovaný proinzulin, komplexující sloučeninu, divalentní kationt kovu a hexamer-stabilizující sloučeninu. Amorfní precipitáty podle předloženého vynálezu jsou použitelné pro léčení diabetu a pro řízení hladiny glukózy v krvi u pacienta, který má jejich potřebu. Jsou také použitelné jako meziprodukty pro vytváření mikrokrystalů podle předloženého vynálezu.

Předložený vynález se týká vodných suspenzních přípravků, obsahujících nerozpustnou kompozici a vodné rozpouštědlo.

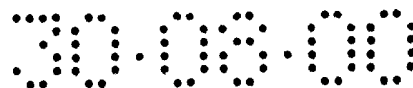


Jeden takový vodný suspenzní přípravek sestává z mikrokryystalické kompozice podle předloženého vynálezu a vodného rozpouštědla. Jiný takový vodný suspenzní přípravek sestává z amorfního precipitátu podle předloženého vynálezu a vodného rozpouštědla. Rozpustná vodná fáze popisovaných suspenzních přípravků může popřípadě sestávat z proteinu jako je lidský inzulin nebo rozpustný analog lidského inzulinu, jako je monomerní inzulinový analog, které řídí hladinu glukózy v krvi okamžitě po jídle a mohou dodatečně nebo alternativně obsahovat derivatizovaný protein. Přípravky podle předloženého vynálezu mají výrazně lepší farmakodynamiku ve srovnání s lidským inzulinem NPH a jejich doba působení může být záměrně volena v širokém rozmezí, od malého prodloužení ve srovnání s lidským inzulinem NPH po velmi prodloužené ve srovnání s lidským inzulinem NPH.

Předložený vynález se také týká způsobů přípravy hybridních hexamerů, smíšených hexamerů, amorfních precipitátů a kokryystalů podle předloženého vynálezu,

Předložený vynález se týká způsob léčeni diabetu nebo hyperglykémie který zahrnuje podávání pacientovi, který má jeho potřebu, dostatečného množství nerozpustné kompozice podle předloženého vynálezu pro regulaci hladiny glukózy v krvi pacienta.

Předložený vynález zahrnuje hybridní hexamerové kompozice sestávající z proteinu zvoleného ze souboru, zahrnujícího inzulin, inzulinový analog a proinzulin; derivatizovaný protein zvolený ze souboru, zahrnujícího derivatizovaný inzulin, derivatizované inzulinové analogy a derivatizované



proinzulíny a zinek. Hybridní hexamery podle předloženého vynálezu jsou použitelné pro léčení diabetu a pro řízení hladiny glukózy v krvi u pacienta, který má jejich potřebu. Jsou také použitelné jako meziprodukty při vytváření nerozpustných kompozice podle předloženého vynálezu, které jsou samy o sobě použitelné pro léčení diabetu a pro řízení hladiny glukózy v krvi u pacienta, který má jejich potřebu. Předpokládá se, že hybridní hexamery se vytvářejí když protein a derivatizovaný protein se nejprve smíchají spolu za podmínek, které silně napomáhají rozpouštění v nižších stavech agregace než je hexamerní stav a potom se podmínky změni pro napomáhání hexamerního agregacího stavu.

Předložený vynález zahrnuje smíšené hexamerové kompozice, obsahující zinkové hexamery proteinu, zvoleného ze souboru, zahrnujícího inzulin, inzulinový analog nebo proinzulin a zinkové hexamery derivatizovaného proteinu, zvoleného ze souboru, zahrnujícího derivatizovaný inzulin, derivatizovaný inzulinový analog nebo derivatizovaný proinzulin. Smíšené hexamery podle předloženého vynálezu jsou použitelné pro léčení diabetu a pro řízení hladiny glukózy v krvi u pacienta, který má jejich potřebu. Jsou také použitelné jako meziprodukty při vytváření nerozpustných kompozice podle předloženého vynálezu, které jsou samy o sobě použitelné pro léčení diabetu a pro řízení hladiny glukózy v krvi u pacienta, který má jejich potřebu. Předpokládá se, že smíšené hexamery se vytvoří, pokud protein a derivatizovaný protein se nejprve odděleně rozpustí za podmínek které napomáhají hexamernímu agregacího stavu a potom se spolu smíchají za podmínek nadále napomáhají hexamernímu agregacího stavu.

Předložený vynález zahrnuje použití nerozpustných kompozice podle předloženého vynálezu pro přípravu léčiva pro léčení diabetu nebo hyperglykémie.

### Přehled obrázků na výkresech

Vynález bude blíže vysvětlen prostřednictvím konkrétních příkladů provedení znázorněných na výkresech, na kterých

Obr. 1 znázorňuje rozpouštění v průběhu periody pěti hodin pro kokrystaly podle předloženého vynálezu, které mají poměr lidského inzulínu k B29-Nε-oktanoyl-lidskému inzulínu rovný 3:1 (přerušovaná čára), 1:1 (plná čára) a 1:3 (silná plná čára), ve srovnání s rozpouštěním přípravku krystalů lidského inzulínu a protaminu (tečkovaná čára).

Obr. 2 znázorňuje rozpouštěcí data u stejných pokusů jako na Obr. 1, ale s časovou osou prodlouženou pro znázornění dat pro 1:3 kokrystaly až na zhruba 13,5 hodin. Rozpouštění kokrystalů podle předloženého vynálezu, které mají poměr lidského inzulínu k B29-Nε-oktanoyl-lidskému inzulínu 3:1 (přerušovaná čára), 1:1 (plná čára) a 1:3 (silná plná čára) je srovnáváno s rozpouštěním přípravku krystalů lidského inzulínu a protaminu (tečkovaná čára).

Obr. 3 znázorňuje rozpouštění kokrystalů podle předloženého vynálezu, které mají poměr lidského inzulínu k B29-Nε-oktanoyl-lidskému inzulínu 1:1 (tenká plná čára) a 1:3 (silnější plná čára), ve srovnání s rozpouštěním mikrokystalů sestávajících pouze z B29-Nε-oktanoyl-lidského



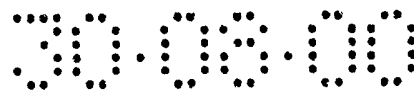
inzulínu (tlustá plná čára) nebo přípravku krystalů lidského inzulínu a protaminu (tečkovaná čára).

Obr. 4 znázorňuje rozpouštění kokrystalů podle předloženého vynálezu, které mají poměr 1:3 lidského inzulínu k B29-Nε-oktanoyl-lidskému inzulínu (tlustá plná čára), ve srovnání s přípravky krystalů lidského inzulínu a protaminu (tečkovaná čára), lidského inzulínu ultralente (slabá plná čára) a hovězího ultralente (plná čára).

Podrobný popis předloženého vynálezu

Výraz "smíšené hexamery" se vztahuje k směsi hexamerů proteinů a hexamerů derivatizovaných proteinů, ve kterých hexamery proteinů sestávají ze zinku a z proteinu, zvoleného ze souboru, zahrnujícího inzulín, inzulínové analogy a proinzulíny a ve kterých hexamery derivatizovaných proteinů sestávají ze zinku a derivatizovaného proteinu, zvoleného ze souboru, zahrnujícího derivatizovaný inzulín, derivatizované inzulínové analogy a derivatizované proinzulíny. Úroveň zinku, skutečně zabudovaného do hexameru je v rozmezí mezi zhruba 2 a zhruba 4 atomy zinku na jeden hexamer.

Výraz "hybridní hexamer" se vztahuje k hexameru sestávajícího ze šesti monomerů a zinku, kde alespoň jeden monomer je zvolen ze souboru, zahrnujícího inzulín, inzulínové analogy a proinzulíny a alespoň jeden monomer je zvolen ze souboru, zahrnujícího derivatizovaný inzulín, derivatizované inzulínové analogy a derivatizované proinzulíny. Úroveň zinku, skutečně zabudovaného do hexameru je obvykle v rozmezí mezi zhruba 2 a zhruba 4 atomy zinku na



jeden hexamer.

Jak je zde používán, výraz "kokrystal" znamená mikrokystal podle předloženého vynálezu.

Výraz "nerozpustná kompozice" se vztahuje k látce buď v mikrokystalickém stavu nebo ve stavu amorfního precipitátu. Přítomnost mikrokystalů nebo amorfního precipitátu může být zjištěna vizuálně průzkumem pod mikroskopem. Rozpustnost závisí na rozpouštědle a daná kompozice může být nerozpustná v jednom rozpouštědle, ale být rozpustná v jiném.

Výraz "mikrokystal" znamená pevnou látku, která sestává především z látky v krystalickém stavu, přičemž jednotlivé krystaly mají převážně jediné krystalografické složení a mikroskopickou velikost, typicky s největším rozměrem v rozmezí od 1 mikronu do 100 mikronů. Výraz "mikrokystalický" se vztahuje ke stavu nacházení se jako mikrokystal.

Výraz "tyčinkovitý" znamená určitou mikrokystalickou morfologií, kterou je také možno popsat jako pyramidovitě zakončené tetragonální tyčinky. Morfologii mikrokystalů podle předloženého vynálezu je možno snadno určit průzkumem pod mikroskopem.

Výraz "nepravidelná morfologie" je charakterizace mikrokystalů, jejichž morfologie, jak se určí průzkumem pod mikroskopem, není snadno klasifikovatelná žádným dobře známým typem krystalů, nepředstavuje jediný typ krystalové morfologie nebo není snadno určitelná vzhledem k tomu, že

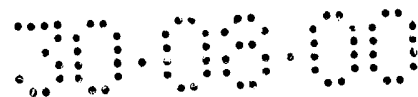
krystaly jsou příliš malé pro určitou klasifikaci.

Výraz "amorfní precipitát" se vztahuje k nerozpustnému materiálu, který není v krystalické podobě. Běžně školená osoba může odlišit krystaly od amorfního precipitátu. Amorfní precipitáty podle předloženého vynálezu mají samy o sobě výhodné farmakologické vlastnosti a představují také meziprodukty při vytváření mikrokystalů podle předloženého vynálezu.

Výraz "protein" může mít svůj obvyklý význam, to jest polymer aminokyselin. Výraz "protein" jak je zde používán, má také užší význam, to jest protein zvolený ze souboru, zahrnujícího inzulin, inzulinové analogy a proinzulíny. Výraz "nederivatizovaný protein" se také se vztahuje k proteinu, zvolenému ze souboru, zahrnujícího inzulin, inzulinové analogy a proinzulíny.

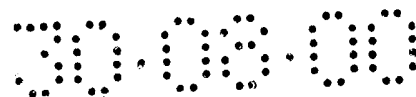
Jak je používán v patentových nárocích a i všude jinde, kde to vyplývá z kontextu, výraz "celkový protein" se vztahuje k souhrnnému množství proteinu (inzulin, inzulinový analog nebo proinzulin) a derivatizovaného proteinu (derivatizovaný inzulin, derivatizovaný inzulinový analog, nebo derivatizovaný proinzulin). Ačkoliv protamin a další známé komplexující sloučeniny jsou také proteiny v nejširším významu, výraz "celkový protein" je nezahrnuje.

Výraz "derivatizovaný protein" se vztahuje k proteinu zvolenému ze souboru, zahrnujícího derivatizovaný inzulin, derivatizované inzulinové analogy a derivatizovaný proinzulin, které jsou derivatizovány funkční skupinou tak,



že derivatizovaný protein je buď méně rozpustný ve vodném rozpouštědle než je nederivatizovaný protein nebo je více lipofilní než nederivatizovaný inzulín nebo vytváří komplex se zinkem a protaminem, který je méně rozpustný než odpovídající komplex s nederivatizovaným proteinem. Určení rozpustnosti nebo lipofilnosti proteinů a derivatizovaných proteinů je dobře známo odborníkovi v oboru. Rozpustnost derivatizovaných proteinů a proteinů v komplexech se zinkem a protaminem může být snadno určena dobře známými způsoby [Graham a Pomeroy, v Pharm. Pharmacol. 36:427-430 (1983), jak bylo modifikována v DeFelippis, M. R. a Frank, B., EP 735,048] nebo procedury zde popsané.

Mnoho příkladů takových derivatizovaných proteinů je známo ze stavu techniky, včetně benzoylových, p-tolyl-sulfonamidových, karbonylových a indolylových derivátů inzulínu a inzulínových analogů [Havelund, S. a kol., WO95/07931, publikováno 23. března 1995]; alkyloxykarbonylových derivátů inzulínu [Geiger, R. a kol., U.S. patent č. 3,684,791, vydaný 15. srpna 1972; Brandenburg, D. a kol., U.S. 3,907,763, vydaný 23. září 1975]; aryloxykarbonylových derivátů inzulínu [Brandenberg, D. a kol., U.S. 3,907,763, vydaný 23. září 1975]; alkylkarbamylových derivátů [Smyth, D. G., U.S. patent č. 3,864,325, vydaný 4. února 1975; Lindsay, D. G. a kol., U.S. patent č. 3,950,517, vydaný 13. dubna 1976]; karbamylových, O-acetylových derivátů inzulínu [Smyth, D. G., U.S. patent č. 3,864,325 vydaný 4. února 1975]; zesíťovaných alkyldikarboxylových derivátů [Brandenberg, D. a kol., U.S. patent č. 3,907,763, vydaný 23. září 1975]; N-carbamylových, O-acetylovaných inzulínových derivátů [Smyth, D. G., U.S.



patent č. 3,868,356, vydaný 25. února 1975]; různých O-alkylových esterů [Markussen, J., U.S. patent č. 4,343,898, vydaný 10. srpna 1982; Morihara, K. a kol., U.S. patent č. 4,400,465, vydaný 23. srpna 1983; Morihara, K. a kol., U.S. patent č. 4,401,757, vydaný 30. srpna 1983; Markussen, J., U.S. patent č. 4,489,159, vydaný 18. prosince 1984; Obermeier, R. a kol., U.S. patent č. 4,601,852, vydaný 22. července 1986; a Andresen, F. H. a kol., U.S. patent č. 4,601,979, vydaný 22. července 1986]; alkylamidových derivátů inzulínu [Balschmidt, P. a kol., U.S. patent č. 5,430,016, vydaný 4. července 1995]; různých dalších derivátů inzulínu [Lindsay, D. G., U.S. patent č. 3,869,437, vydaný 4. března 1975]; a mastnou kyselinou acylovaných proteinů které jsou popsány v této přihlášce.

Výraz "acylovaný protein", jak je zde používán, se vztahuje k derivatizovanému proteinu, zvolenému ze souboru, zahrnujícího inzulín, inzulínové analogy a proinzulín, který je acylovaný organickou kyselinou, která je vázána k proteinu prostřednictvím amidové vazby, vytvořené mezi kyselou skupinou organické kyseliny a aminovou skupinou proteinu. Obecně aminovou skupinou může být  $\alpha$ -aminová skupina N-terminální aminokyseliny proteinu nebo může být  $\epsilon$ -aminovou skupinou zbytku Lys proteinu. Acylovaný protein může být acylovaný v jedné nebo více ze tří aminových skupin, které jsou přítomny v inzulínu a většině inzulínových analogů. Monoacylované proteiny jsou acylované v jediné aminové skupině. Diacylované proteiny jsou acylované ve dvou aminových skupinách. Triacylované proteiny jsou acylované ve třech aminových skupinách. Organickou kyselou sloučeninou může být například mastná kyselina,

aromatická kyselina nebo libovolná jiná organická sloučenina, která nese karboxylovou kyselou funkční skupinu, která může vytvořit amidovou vazbu s aminovou skupinou proteinu a která snižuje rozpustnost ve vodě, zvýší lipofilitu nebo snižuje rozpustnost zinko-protaminových komplexů derivatizovaného proteinu ve srovnání s nederivatizovaným proteinem.

Výraz "mastnou kyselinou acylovaný protein" se vztahuje k acylovanému proteinu, zvolenému ze souboru, zahrnujícího inzulin, inzulinové analogy a proinzulíny, který je acylovaný mastnou kyselinou, která je k proteinu vázána prostřednictvím amidové vazby, vytvořené mezi kyselou skupinou mastné kyseliny a aminovou skupinou proteinu. Obecně aminová skupina může být  $\alpha$ -aminová skupina N-terminální aminokyseliny proteinu nebo jí může být  $\epsilon$ -aminová skupina zbytku Lys proteinu. Mastnou kyselinou acylovaný protein může být acylovaný v jedné nebo více ze tří aminových skupin, které jsou přítomny v inzulinu a ve většině inzulinových analogů. Monoacylované proteiny jsou acylovány v jediné aminové skupině. Diacylované proteiny jsou acylovány ve dvou aminových skupinách. Triacylované proteiny jsou acylovány ve třech aminových skupinách. Mastnou kyselinou acylovaný inzulin je popsán v japonské patentové přihlášce 1-254,699. Viz také Hashimoto, M. a kol., *Pharmaceutical Research*, 6:171-176 (1989) a Lindsay, D. G. a kol., *Biochemical J.* 121:737-745 (1971). Další objevy mastnou kyselinou acylovaných inzulinů a mastnou kyselinou acylovaných inzulinových analogů a způsobů jejich syntézy mohou být nalezeny v Baker, J. C. a kol., U.S. 08/342,931, podaná 17. listopadu 1994 a vydaná jako U.S.

patent č. 5,693,609, 2. prosinec 1997; Havelund, S. a kol., WO95/07931, publikovaná 23. března 1995 a odpovídající U.S. patent č. 5,750,497, 12. květen 1998; a Jonassen, I. a kol., WO96/29342, publikovaná 26. září 1996. Tyto objevy jsou zde výslovně uvedeny jako reference popisující mastnou kyselinou acylované inzulíny a mastnou kyselinou acylované inzulinové analogy a umožňující syntézu těchto látek.

Výraz "mastnou kyselinou acylovaný protein" zahrnuje farmaceuticky přijatelné soli a komplexy mastnou kyselinou acylovaných proteinů. Výraz "mastnou kyselinou acylovaný protein" také zahrnuje přípravky acylovaných proteinů, ve kterých je populace molekul acylovaných proteinů homogenní vzhledem k místu nebo místům acylace. Například Nε-monoacylovaný protein, B1-Nα-monoacylovaný protein, A1-Nα-monoacylovaný protein, A1,B1-Nα-diacylovaný protein, Nε,A1-Nα,diacylovaný protein, Nε,B1-Nα,diacylovaný protein a Nε,A1,B1-Nα,triacylovaný protein jsou všechny zahrnuty pod výraz "mastnou kyselinou acylovaný protein" pro účely popisu předloženého vynálezu. Výraz se také vztahuje k přípravkům, ve kterých populace molekul acylovaných proteinů má heterogenní acylaci. V posledně uvedeném případě výraz "mastnou kyselinou acylovaný protein" zahrnuje směsi monoacylovaných a diacylovaných proteinů, směsi monoacylovaných a triacylovaných proteinů, směsi diacylovaných a triacylovaných proteinů a směsi monoacylovaných, diacylovaných a triacylovaných proteinů.

Výraz "inzulín" jak je zde používán, se vztahuje k lidskému inzulinu, jehož sekvence aminokyselin a speciální struktura jsou dobře známy. Lidský inzulín sestává z dvaceti jedné

aminokyseliny A-řetězce a třiceti aminokyselin B-řetězce, které jsou zesíťovány disulfidovými vazbami. Správně zesíťovaný inzulín obsahuje tři disulfidové můstky: jeden mezi polohou 7 A-řetězce a polohou 7 B-řetězce, druhý mezi polohou 20 A-řetězce a polohou 19 B-řetězce a třetí mezi polohami 6 a 11 A-řetězce.

Výraz "inzulínový analog" znamená proteiny, které mají A-řetězec a B-řetězec, které mají v zásadě stejné sekvence aminokyselin jako A-řetězec a B-řetězec lidského inzulínu, ale odlišují se od A-řetězce a B-řetězce lidského inzulínu tím že zahrnují jednu nebo více aminokyselinových delecí, jednu nebo více aminokyselinových náhrad, a/nebo jednu nebo více aminokyselinových adicí, které neničí inzulínovou aktivitu inzulínového analogu.

"Zvířecí inzulíny" jsou analogy lidského inzulínu a proto jsou inzulínovými analogy, jak bylo definováno výše. Čtyři takové zvířecí inzulíny jsou králičí, prasečí, hovězí a ovčí inzulín. Aminokyselinové substituce, které odlišují tyto zvířecí inzulíny od lidského inzulínu jsou pro pohodlí čtenáře uvedeny dále.

	Poloha aminokyseliny			
	A8	A9	A10	B30
lidský inzulín	Thr	Ser	Ile	Thr
králičí inzulín	Thr	Ser	Ile	Ser
prasečí inzulín	Thr	Ser	Ile	Ala
hovězí inzulín	Ala	Ser	Val	Ala
ovčí inzulín	Ala	Gly	Val	Ala

Jiný typ inzulínového analogu, "monomerní inzulínový analog" je dobře znám v oboru. Monomerní inzulínové analogy jsou strukturálně podobné lidskému inzulínu a mají aktivitu, která je podobná nebo stejná lidskému inzulínu, ale obsahují jednu nebo více aminokyselinových delecí, náhrad nebo adicí, které způsobují uvolnění kontaktu zahrnutého při dimerizaci a hexamerizaci, což vede k tomu, že mají menší tendenci vytvářet vyšší agregované stavy. Monomerní inzulínové analogy jsou rychle působící analogy lidského inzulínu a jsou popsány například v Chance, R. E. a kol., U.S. patent č. 5,514,646, 7. květen 1996; Brems, D. N. a kol. Protein Engineering, 5:527-533 (1992); Brange, J. J. V. a kol., EPO publikace č. 214,826, publikovaná 18. března 1987; Brange, J. J. V. a kol., U.S. patent č. 5,618,913, 8. duben 1997; a Brange, J. a kol., Current Opinion in Structural Biology 1:934-940 (1991). Příklad monomerního inzulínového analogu je popsán jako lidský inzulín, ve kterém Pro v poloze B28 je nahrazen zbytkem Asp, Lys, Leu, Val nebo Ala a kde Lys v poloze B29 je Lys nebo je nahrazen zbytkem Pro a dále AlaB26-lidský inzulín, des(B28-B30)-lidský inzulín a des(B27)-lidský inzulín. Monomerní inzulínové analogy používané jako deriváty v krystalech nebo používané

nederivatizované v roztokové fázi suspenzních formulací jsou správně zesíťované ve stejných polohách jako lidský inzulin.

Jiná skupina inzulinových analogů pro použití podle předloženého vynálezu jsou analogy, u kterých isoelektrický bod inzulinového analogu je v rozmezí mezi zhruba 7,0 a zhruba 8,0. Tyto analogy jsou označovány jako "pI-posunuté inzulinové analogy." Příklady takových inzulinových analogů zahrnuje ArgB31,ArgB32-lidský inzulin, GlyA21,ArgB31,ArgB32-lidský inzulin, ArgA0,ArgB31,ArgB32-lidský inzulin a ArgA0,GlyA21,ArgB31,ArgB32-lidský inzulin.

Další skupina inzulinových analogů je tvořena inzulinovými analogy, které mají jednu nebo více aminokyselinových delecí, které významně neporušují aktivitu molekuly. Tato skupina inzulinových analogů je dále označována jako "deleční analogy." Například inzulinové analogy s delecí jedné nebo více aminokyselin v polohách B1-B3 jsou aktivní. Podobně inzulinové analogy s delecí jedné nebo více aminokyselin v polohách B28-B30 jsou aktivní. Příklady "delečních analogů" zahrnující des(B30)-lidský inzulin, desPhe(B1)-lidský inzulin, des(B27)-lidský inzulin, des(B28-B30)-lidský inzulin a des(B1-B3)-lidský inzulin. Deleční analogy používané jako derivát v současných krystalech nebo používané nederivatizované v roztokové fázi suspenzních přípravků jsou správně zesíťované ve stejných polohách jako lidský inzulin.

Amidované aminokyseliny a obzvláště asparaginové zbytky v inzulinu jsou známy jako chemicky nestabilní [Jorgensen, K. H. a kol. U.S. patent č. 5,008,241, vydaný 16. dubna 1991;

Dorschug, M., U.S. patent č. 5,656,722, vydaný 12. srpna 1997]. Jsou obzvláště náchylné k deamidaci a různým reakcím změny uspořádání za jistých podmínek, které jsou dobře známy. Z tohoto důvodu může popřípadě inzulínovým analogem být inzulín nebo inzulínový analog, který má jeden nebo více amidovaných zbytků nahrazen dalšími aminokyselinami s cílem dosažení chemické stability. Například Asn nebo Gln mohou být nahrazeny neamidovanými aminokyselinami. Výhodné aminokyselinové náhrady jsou pro Asn nebo Gln jsou Gly, Ser, Thr, Asp nebo Glu. Je výhodné nahradit jeden nebo více Asn zbytků.

Obzvláště AsnA18, AsnA21 nebo AsnB3 nebo libovolná kombinace těchto zbytků může být nahrazen například zbytkem Gly, Asp, nebo Glu. Také GlnA15 nebo GlnB4 nebo oba mohou být nahrazeny buď Asp nebo Glu. Výhodné náhrady jsou Asp v B21 a Asp v B3. Výhodný jsou také náhrady, které nemění náboj proteinové molekuly, takže náhrada Asn nebo Gln neutrálními aminokyselinami je také výhodná.

Výraz "proinzulín" znamená peptidovou molekulu s jediným řetězcem, která je prekurzor inzulínu. Proinzulín může být přeměněn na inzulín nebo na inzulínový analog chemickými nebo výhodně enzymově katalyzovanými reakcemi. V proinzulín se vytvoří správné disulfidové vazby, jak bylo popsáno výše. Proinzulín obsahuje inzulín nebo inzulínový analog a spojovací vazbu nebo spojovací peptid. Spojovací peptid má mezi 1 a zhruba 35 aminokyselinami. Spojovací vazba nebo spojovací peptid se připojují k terminální aminokyselině A-řetězce a k terminální aminokyselině B-řetězce  $\alpha$ -amidovou vazbou nebo dvěma  $\alpha$ -amidovými vazbami. Výhodně není žádná

z aminokyselin ve spojovacím peptidu cystein. Výhodně je C-terminální aminokyselina spojovacího peptidu Lys nebo Arg. Proinzulín může mít obecný vzorec X-B-C-A-Y nebo může mít obecný vzorec X-A-C-B-Y, kde X představuje atom vodíku nebo je to peptid s od 1 do zhruba 100 aminokyselin, který má Lys nebo Arg jako C-terminální aminokyselinu, Y představuje hydroxy nebo je to peptid, která má od 1 do zhruba 100 aminokyselin, který má buď Lys nebo Arg jako N-terminální aminokyselinu, A je A-řetězec inzulinu nebo A-řetězec inzulinového analogu, C je peptid s od 1 do zhruba 35 aminokyselin, z nichž žádná není cystein, kde C-terminální aminokyselina je Lys nebo Arg a B je B-řetězec inzulinu nebo B-řetězec inzulinového analogu.

"Farmaceuticky přijatelná sůl" znamená sůl vytvořenou mezi libovolnou jednou nebo více nabitými skupinami v proteinu a libovolným jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými netoxickými kationty nebo anionty. Organické a anorganické soli zahrnují například soli připravené na základě kyselin jako jsou kyselina chlorovodíková, sírová, sulfonová, vinná, fumarová, bromovodíková, glykolová, citronová, maleinová, fosforečná, jantarová, octová, dusičná, benzoová, askorbová, p-toluensulfonová, benzensulfonová, naftalensulfonová, propionová, uhličitá a podobně nebo například soli amonné, sodné, draselné, vápenaté nebo hořečnaté.

Sloveso "acylovat" znamená vytvářet amidovou vazbu mezi mastnou kyselinou a aminovou skupinou proteinu. Protein je "acylovaný" pokud jedna nebo více jeho aminových skupin je kombinována amidovou vazbou s kyselou skupinou mastné kyseliny.

Výraz "mastná kyselina" znamená mastnou kyselinu s nasyceným nebo nenasyceným přímým řetězcem nebo rozvětveným řetězcem, který obsahuje od jednoho do osmnácti atomů uhlíku.

Výraz "C1 až C18 mastná kyselina" se vztahuje k mastné kyselině s nasyceným nebo nenasyceným přímým řetězcem nebo rozvětveným řetězcem, který obsahuje od jednoho do osmnácti atomů uhlíku.

Výraz "divalentní kationt kovu" se vztahuje k iontu nebo iontům, které se podílejí na vytváření komplexu s množstvím proteinových molekul. Přechodové kovy, alkalické kovy a kovy alkalických zemin jsou příklady kovů, které jsou známy tím, že vytvářejí komplexy s inzulinem. Přechodové kovy jsou výhodný. Zinek je obzvláště výhodný. Další přechodové kovy, které mohou být farmaceuticky přijatelné pro vytváření komplexů s inzulinovými proteiny zahrnují měď, kobalt a železo.

Výraz "komplex" má v předloženém vynálezu dva významy. V prvním se výraz se vztahuje ke komplexu vytvořenému mezi jedním nebo více atomy v proteinech, které vytvářejí komplex a jedním nebo více divalentními kationty kovů. Atomy v proteinech slouží jako elektronově donorové ligandy. Proteiny typicky vytvářejí hexamerové komplexy s divalentními kationty přechodových kovů. Druhý význam výrazu "komplex" v předloženém vynálezu je asociace mezi komplexující sloučeninou a hexamery. "Komplexující sloučenina" je organická molekula, která má typicky větší množství kladných nábojů, které se váží nebo komplexují s

hexamery v nerozpustné kompozici, čímž je stabilizují proti rozpouštění. Příklady komplexujících sloučenin, vhodných podle předloženého vynálezu zahrnují protamin, surfen, různé globinové proteiny [Brange, J., Galenics of Inzulín, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1987)] a různé polykationtové polymerické sloučeniny, o kterých je známo, že komplexují s inzulínem.

Výraz "protamin" se vztahuje ke směsi silně bázických proteinů, získaných z rybího spermatu. Střední molekulová hmotnost proteinů v protaminu je zhruba 4,200 [Hoffmann, J. A. a kol., Protein Expression and Purification, 1:127-133 (1990)]. "Protamine" se může vztahovat k relativně solí prostých přípravkům proteinů, často nazývané "protaminové báze." Protamin se také vztahuje k přípravkům obsahujícím soli proteinů. Komerční přípravky se silně liší svým obsahem solí.

Protaminy jsou dobře známy odborníkům v oboru inzulínu a jsou běžně vkládány do NPH inzulínových produktů. Čistá protaminová frakce je použitelná podle předloženého vynálezu, stejně tak jako směsi protaminů. Komerční protaminové přípravky však nejsou typicky homogenní vzhledem k podávanými proteiny. Ty jsou nicméně použitelné podle předloženého vynálezu. Protamin sestávající s protaminové báze je použitelný podle předloženého vynálezu, stejně tak jako jsou použitelné protaminové přípravky obsahující soli protaminu a přípravky, které jsou směsmi protaminové báze a protaminových solí. Protaminsulfát je často používanou protaminovou solí. Všechny hmotnostní poměry, vztahující se k protaminu jsou stanoveny vzhledem k protaminové volná

báze. Odborník v oboru může určit množství dalších protaminových přípravků, které mají konkrétní poměr hmotností vzhledem k protaminu.

Výraz "suspenze" se vztahuje ke směsi kapalně fáze a pevně fáze, která obsahuje nerozpustné nebo málo rozpustné částice, které jsou větší než koloidní velikost. Směsi NPH mikrokrystalů a vodného rozpouštědla vytvářejí suspenze. Směsi amorfního precipitátu a vodného rozpouštědla také vytvářejí suspenze. Výraz "suspenzní přípravek" znamená farmaceutickou kompozici, ve které účinné činidlo je přítomno v pevně fázi, například mikrokrystalická pevná látka, amorfni precipitát nebo oba, která je jemně dispergována ve vodném rozpouštědle. Jemně dispergovaná pevná látka je taková, že může být suspendována velmi stejným způsobem ve vodném rozpouštědle působením jemného míchání směsi, což vede k vytvoření rozumně stejnoměrné suspenze, ze které může být odebrán objem léčebné dávky. Příklady komerčně dostupných inzulínových suspenzních přípravků zahrnují například NPH, PZI a ultralente. Malý podíl pevné látky v mikrokrystalickém suspenzním přípravku může být amorfni. Výhodně je podíl amorfniho materiálu méně než 10% a nejvýhodněji méně než 1% pevné látky v mikrokrystalické suspenzi. Podobně může být malé množství látky v amorfni precipitátové suspenzi mikrokrystalické.

"NPH inzulín" se vztahuje k "Neutral Protamine Hagedorn" inzulínovému přípravku. Synonyma zahrnují mezi mnoha ostatními lidský inzulín NPH a inzulín NPH. Humulin N je komerční přípravek NPH inzulínu. Související výraz je "NPL",

který se vztahuje k NPH podobnému přípravku LysB28, ProB29-analogu lidského inzulínu. Význam těchto výrazů a způsoby uvedených inzulínových přípravků jsou dobře známy odborníkům v oboru inzulínových přípravků.

Výraz "vodné rozpouštědlo" se vztahuje ke kapalnému rozpouštědlu, které obsahuje vodu. Systém vodného rozpouštědla může být představován výhradně vodou, může obsahovat vodu a jedno nebo více s vodou mísitelných rozpouštědel a může obsahovat rozpuštěné látky. Nejčastěji používaná mísitelná rozpouštědla jsou organické alkoholy s krátkým řetězcem, jako je methanol, ethanol, propanol, ketony s krátkým řetězcem jako je aceton a polyalkoholy jako je glycerol.

"Isotonické činidlo" je sloučenina, která je fyziologicky tolerována a dodává vhodnou tonicitu přípravku pro zabránění toku vody buněčnými membránami, které jsou v kontaktu s podávaným přípravkem. Glycerol, který je také znám jako glycerin, je běžně používán jako isotonické činidlo. Další isotonická činidla zahrnují soli, například chlorid sodný a monosacharidy, například dextrózu a laktózu.

Nerozpustné kompozice podle předloženého vynálezu obsahují hexamer-stabilizující sloučeninu. Výraz "hexamer-stabilizující sloučenina" se vztahuje k neproteinovým sloučeninám o malé molekulové hmotnosti, které stabilizují protein nebo derivatizovaný protein v hexamerním agregačním stavu. Fenolové sloučeniny, obzvláště fenolová konzervační činidla, jsou nejlepšími známými stabilizujícími sloučeninami pro inzulín a inzulínové deriváty. Hexamer-

stabilizující sloučeniny stabilizují hexamer tím, že se k němu váží prostřednictvím specifických intermolekulárních kontaktů. Příklady hexamer-stabilizujících činidel zahrnují: různé fenolové sloučeniny, fenolová konzervační činidla, resorcinol, 4'-hydroxyacetanilid, 4-hydroxybenzamid a 2,7-dihydroxynaftalen. Víceúčelové přípravky nerozpustných kompozice podle předloženého vynálezu obsahují konzervační činidlo, navíc k hexamer-stabilizující sloučenině. Konzervační činidlo používané v přípravcích podle předloženého vynálezu může být a fenolové konzervační činidlo a může být stejné nebo odlišné od hexamer-stabilizující sloučeniny.

Výraz "konzervační činidlo" se vztahuje k sloučenině přidané k farmaceutickému přípravku pro působení jako antimikrobiální činidlo. Parenterální přípravek musí vyhovovat požadavkům na účinnost konzervačních činidel k tomu, aby mohlo být použitelné jako komerčně využitelný produkt pro různé použití. Mezi konzervačními činidly známými v oboru jako účinné a přijatelné pro parenterální přípravky jsou benzalkoniumchlorid, benzethonium, chlorhexidin, fenol, m-kresol, benzylalkohol, methylparaben, chlorbutanol, o-kresol, p-kresol, chlorkresol, dusičnan fenylrtuťný, thimerosal, benzoová kyselina a jejich různé směsi. Viz například Wallhäusser, K.-H., Develop. Biol. Standard, 24:9-28 (1974) (S. Krager, Basel).

Výraz "fenolové konzervační činidlo" zahrnuje sloučeniny fenol, m-kresol, o-kresol, p-kresol, chlorkresol, methylparaben a jejich směsi. Jisté fenolové konzervační činidla jako jsou fenol a m-kresol jsou známa tím, že se

váží k molekulám inzulínového typu a tím indukují konformační změny, které zvyšují buď fyzikální nebo chemickou stabilitu nebo oboje [Birnbbaum, D. T. a kol., *Pharmaceutical Res.* 14:25-36 (1997); Rahuel-Clermont, S. a kol., *Biochemistry* 36:5837-5845 (1997)].

Výraz "pufr" nebo "farmaceuticky přijatelný pufr" se vztahuje ke sloučeninám, které jsou známy jako bezpečné pro použití v inzulínových přípravcích a které působí jako kontrola pH přípravku a udržuje jej na pH požadovaném pro přípravek. pH přípravku podle předloženého vynálezu je od zhruba 6,0 do zhruba 8,0. Výhodně mají přípravky podle předloženého vynálezu pH v rozmezí mezi zhruba 6,8 a zhruba 7,8. Farmaceuticky přijatelné pufrы pro udržování pH na hodnotách od mírně kyselého pH do mírně zásaditého pH zahrnují sloučeniny jako fosforečnany, octany, citronany, arginin, TRIS a histidin. "TRIS" se vztahuje k 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiolu a k jeho libovolné farmakologicky přijatelné soli. Volná báze a hydrochloridová forma jsou dvě běžné formy TRIS. TRIS je také v oboru znám jako trimethylolaminomethan, tromethamin a tris(hydroxymethyl)aminomethan. Další pufrы, které jsou farmaceuticky přijatelné a které jsou vhodné pro kontrolu pH na požadované úrovni jsou známy běžným chemikům.

Výraz "podávat" znamená uvést přípravek podle předloženého vynálezu do těla pacienta, který má jeho potřebu, pro léčbu onemocnění nebo stavu.

Výraz "léčení" se vztahuje k péči o pacienta, který má diabetes nebo hyperglykémii nebo další stav, u kterého je

indikováno podávání inzulínu pro účely zvládnutí nebo úlevu symptomů a komplikací spojených s tímto stavem. Léčení zahrnuje podávání přípravku podle předloženého vynálezu pro prevenci vzniku symptomů nebo komplikací, úlevu symptomů nebo komplikací nebo eliminaci onemocnění, stavu nebo poruchy.

Jak bylo uvedeno výše, předložený vynález se týká nerozpustných kompozic, které mají vlastnosti podobné v jistých ohledech NPH inzulínu a předčí NPH inzulín v jiných ohledech. Jsou podobné NPH inzulínu v tom, že mají obdobné fyzikální vlastnosti, jak je uvedeno dále. Pro zkoumání mikrokystalů obsahujících B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulín, inzulín, zinek, protamin a fenol, připravených podle předloženého vynálezu byl používán světelný mikroskop vybavený objektivem s olejovou imerzí a křížovým polarizátorem. Zkoumání při zvětšení 1000x ukázalo, že tyto mikrokristaly byly jednoduché a tyčinkovité a vykazovaly stejnou krystalovou morfologii. Velikosti těchto mikrokystalů obecně spadaly do rozmezí délky od přibližně 2 mikronů do 8 mikronů. Přímé srovnání použitím tohoto mikroskopu ukázalo, že morfologie těchto mikrokystalů se zdála být podobná jako u mikrokystalů komerčně vyráběného prasečího NPH, který byl jinde popsán jako tyčinkovitý. Rozmezí velikosti těchto mikrokystalů bylo také podobné velikosti komerčně vyráběných NPH mikrokystalů, které mají obecně střední délku zhruba 5 mikronů. Komerční výrobní specifikace pro střední délku NPH mikrokystalů je od 1 mikronu do 40 mikronů.

Mikrokristaly podle předloženého vynálezu jsou však

neočekávaně a nepředvídatelně odlišné od krystalů NPH inzulínu svými vlastnostmi, týkajícími se rozpouštění a v jejich době působení. Konkrétně se mikrokrystaly podle předloženého vynálezu rozpouštějí mnohem pomaleji za podmínek, které simulují fyziologické podmínky, než je tomu u krystalů NPH inzulínu a poskytují delší a plošší profil kontroly glukózy v krvi, než je tomu u NPH inzulínu. To bylo demonstrováno následujícími pokusy.

Bylo zjištěno, že jisté derivatizované proteiny, v rozpustné formě, mají doby působení, které nejsou významně odlišné od obvyklého lidského inzulínu. Byly použity tři skupiny zvířat. Každé zvíře v první skupině dostalo dávku (0,75 nmol/kg) Humulinu<sup>®</sup> (rozpustný lidský inzulín), každé zvíře v druhé skupině dostalo dávku (0,75 nmol/kg) rozpustného B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu ("C8-hI") a každé zvíře ve třetí skupině dostalo dávku (0,75 nmol/kg) rozpustného B29-Nε-dekanoyl-lidského inzulínu ("C10-hI"). Pokusy byly prováděny v zásadě jak je popsáno v Příkladu 5, s pěti psy ve skupině. Proteiny byly podávány podkožně. Koncentrace glukóza v krvi byly určovány a jsou uvedeny v tabulce uvedené níže.

Tabulka 1. Koncentrace glukózy v krvi před a po podávání Humulinu<sup>®</sup>, rozpustného B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu ("C8-hI") nebo rozpustného B29-Nε-dekanoyl-lidského inzulínu ("C10-hI") u normálních psů současně s podáváním somatostatin pro vytvoření přechodného diabetického stavu. Jsou udávány střední hodnoty ± standardní chyba.

Doba (h)	Glukóza v krvi Koncentrace (mg/dl)		
	Humulin®	Rozpustný C8-hI	Rozpustný C10-hI
-0,5	110 ± 2	115 ± 4	108 ± 2
0	101 ± 2	101 ± 7	96 ± 4
0,5	83 ± 5	80 ± 5	85 ± 6
1	54 ± 6	52 ± 4	70 ± 5
1,5	49 ± 4	51 ± 2	57 ± 4
2	48 ± 4	51 ± 2	52 ± 3
2,5	55 ± 4	60 ± 3	56 ± 4
3	59 ± 2	65 ± 4	58 ± 4
3,5	65 ± 2	73 ± 5	63 ± 4
4	71 ± 2	85 ± 6	68 ± 4
5	87 ± 2	110 ± 8	79 ± 3
6	104 ± 3	124 ± 4	91 ± 7
7	119 ± 8	145 ± 14	106 ± 8
8	144 ± 5	153 ± 16	119 ± 11

Tato data jasně ukazují, že rozpustný B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulin a B29-Nε-dekanoyl-lidský inzulin, podávané podkožně normálním psům v přechodném diabetickém stavu, přinášejí snížení hladiny glukózy zhruba srovnatelné se snížením, které je možno dosáhnout s rozpustným lidským inzulinem. Především vykazuje rozpustný B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulin rychlejší nástup a kratší dobu působení než lidský inzulin.

V druhém pokusu bylo zjištěno, že rychlost rozpouštění kokrytalů inzulinu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulinu,

připravených podle předloženého vynálezu je znatelně delší než u komerčně vyráběného NPH-prasečího inzulínu. Toto bylo nejpřekvapivější ve světle výše uvedených dat. Rychlost rozpouštění může být měřena použitím dobře známých procedur [Graham a Pomeroy, v Pharm. Pharmacol. 36:427-430 (1983), jak byla modifikována v De Felippis, M. R. a Frank, B., EP 735,048] nebo pomocí zde popsaných procedur.

Rychlost rozpouštění mikrokystalů prasečího NPH inzulínu byla umístěna umístěním 5 mikrolitrů U100 prasečího NPH inzulínu do 3 ml Dulbecco fosforečnanem pufovaného fyziologického roztoku (bez vápníku nebo hořčíku) v 1 cm čtvercové křemíkové kyvetě při teplotě 22 °C. Tento roztok byl míchán konstantní rychlostí použitím magnetického míchadla. Měření absorbance na vlnové délce 320 nm byly prováděny v jednominutových intervalech. Absorbance na vlnové délce 320 nm odpovídá světlu rozptýlenému nerozpustnými částicemi přítomnými ve vodné suspenzi. V důsledku toho jak se mikrokristaly rozpouštějí, absorbance se blíží nule. Mikrokristaly prasečího NPH inzulínu se úplně rozpustily po zhruba 20 minutách.

Bylo zjištěno, že rychlost rozpouštění protamin-zinkových krystalů lidského inzulínu, které neobsahovaly kokrystalizovaný acylovaný lidský inzulín, byla také zhruba 20 minut, jak bylo určeno výše uvedenou procedurou. Tyto krystaly NPH lidského inzulínu byly připraveny v zásadě způsobem podle Přípravy číslo 1 uvedené níže s tou výjimkou, že nebyl použit acylovaný protein a bylo použito 7 částí lidského inzulínu. Data získaná z tohoto pokusu jsou uvedena na Obr. 1 jako přerušovaná čára.

Kokrystaly podle předloženého vynálezu, sestávající z lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-LysB29 lidského inzulínu byly připraveny jak je popsáno v Přípravách číslo 2, 4 a 5 uvedených níže. V těchto přípravách byly lidský inzulín a acylovaný inzulín použity s překrystalizačními hmotnostními poměry 3:1, 1:1 a 1:3.

Způsob popsaný výše byl použit pro měření rychlosti rozpouštění těchto kokrystalů. Stručně řečeno byl objem 12 mikrolitrů každé kokrystalické suspenze obsahující protamin, zinek, B29-Nε-oktanoyl-LysB29 lidský inzulín a lidský inzulín (s obsahem ne více než 50 U/ml) umístěn do 3 ml Dulbecco fosforečnanem pufrovaného solného roztoku (bez obsahu vápníku nebo hořčíku) v 1 cm čtvercové křemíkové kyvetě. Tento roztok byl míchán stejnou konstantní rychlostí při stejné teplotě 22 °C. Data získaná z tohoto pokusu jsou uvedena na Obr. 1 a ukazují, že 3:1 kokrystaly vyžadovaly více než 100 minut pro rozpuštění, že 1:1 kokrystaly vyžadovaly více než 150 minut pro rozpuštění a že 1:3 kokrystaly se úplně nerozpustily ani po 400 minutách.

Doba potřebná k tomu, aby absorbance v průběhu rozpouštění dosáhla poloviny hodnoty mezi výchozí absorbancí a konečnou absorbancí je definována jako hodnota  $t_{1/2}$ . Hodnoty  $t_{1/2}$  pro tyto přípravky jsou uvedeny dále v Tabulce 2.

Tabulka 2. Hodnoty  $t_{1/2}$  pro rozpouštění pro Iletin NPH, lidský inzulín NPH a kokrystaly B29-oktanoyl-lidského inzulínu a lidského inzulínu

Látka	%B29- oktanoyl- lidský inzulín	% lidský inzulín	% vepřový inzulín	hodnoty $t_{1/2}$ (minuty)
Iletin NPH	0	0	100	6
Lidský NPH	0	100	0	7
3:1 kokrystal	25	75	0	38
1:1 kokrystal	50	50	0	117
1:3 kokrystal	75	25	0	>400

Tyto pokusy ukazují, že v Dulbecco fosforečnanem pufovaném solném roztoku (bez obsahu vápníku a hořčíku), což je roztok, který v jistých aspektech napodobuje intersticiální tekutinu, je rychlost rozpouštění 3:1, 1:1 a 1:3 kokrystalů významně pomalejší než prasečí NPH mikrokrystaly. Tyto pokusy také dokazují, že rychlost rozpouštění mikrokrystalů obsahujících protamin, zinek a lidský inzulin je velmi podobná rychlosti u prasečího NPH inzulinu (Iletin NPH). Tyto výsledky dále určují, že rychlost rozpouštění kokrystalů protaminu, zinku, B29-Nε-oktanoyl-LysB29-lidského inzulinu a lidského inzulinu závisí na poměru lidského inzulinu k B29-Nε-oktanoyl-LysB29-lidskému inzulinu, přítomnému v kokrystalech a obzvláště že rychlost rozpouštění kokrystalů protaminu, zinku, B29-Nε-oktanoyl-LysB29 lidského inzulinu a lidského inzulinu klesá, jak klesá podíl lidského inzulinu.

Jiný způsob rozpouštění, založený na HPLC určování rozpuštěného proteinu a derivatizovaného proteinu, byl použit pro srovnání rychlosti rozpouštění 1:3 mikrokrystalů

popsaných výše s komerčními přípravky lidského NPH inzulínu, lidského inzulínu ultralente a hovězího ultralente a také pro studium účinků na rychlost rozpouštění při různých změnách poměru proteinu k derivatizovanému proteinu.

Objem (0,5 ml) U100 přípravku byl suspendován v 200 ml Dulbecco fosforečnanem pufovaného solného roztoku upravený na hodnotu pH 7,4 ve vodou opláštěném rozpouštěcím zařízení udržovaném na 25 °C. Rozpouštěcí pufr také obsahoval 1 mg/ml lidského sérového albuminu pro zabránění adsorpčních ztrát rozpuštěných inzulínů. Rozpouštěcí prostředí bylo mícháno konstantní rychlostí 180 otáček za minutu. V pravidelných intervalech bylo 3,5 ml tohoto roztoku odebíráno a filtrováno přes 0,22  $\mu$ m filtr který vázal nízkomolekulové proteiny. Prvních 0,5 ml filtrátu bylo odstraněno a následujících 1,5 ml filtrátu bylo okyseleno 4 ml 5 N HCl a podrobena HPLC analýze. Koncentrace rozpuštěných inzulínů byly určeny na základě ploch píků HPLC a výsledky byly vyjádřeny jako procento rozpuštěné látky v závislosti na čase, přičemž 100% byla celková plocha inzulínů v nefiltrovaných vzorcích. Jestliže celková plocha nefiltrovaných vzorků mírně poklesla v závislosti na čase, byla lineárně korigovaná hodnota použita jako 100% pro výpočet procenta rozpuštěného v každý okamžik. Výsledky těchto studií jsou uvedeny na Obr. 3 a 4.

Data na Obr. 3 ukazují, že čím je větší frakce derivatizovaného proteinu vloženého do mikrokrystalu, tím pomalejší je rychlost rozpouštění. Data Obr. 4 ukazují, že 1:3 mikrokrystal lidského inzulínu a B29-oktanoyl-lidského inzulínu se rozpouští významně pomaleji než jak lidský

inzulín NPH, tak i lidský inzulín ultralente. Nejvýznamnější je, že 1:3 mikrokrystal má rychlost rozpouštění velmi podobnou, jako je rychlost rozpouštění hovězího ultralente. Hovězí ultralente byl po dlouhou dobu považován za takřka ideální dlouho působící inzulínový přípravek, jednak pro jeho velmi prodlouženou biologickou aktivitu a také pro plochost farmakodynamické odezvy po jeho podávání. Je tedy možno předpovědět, že tyto mikrokrystaly se mohou přiblížit nebo překonat hovězí ultralente ve schopnosti přinést kontrolu hladiny bazální glukózy po velmi dlouhé časové intervaly.

Vzhledem k tomu, že profil doby působení NPH přípravků je velmi silně vázán s rychlostí rozpouštění mikrokrystalů v podkožní intersticiální tekutině, je z výše uvedených pokusů vyvozováno, že mikrokrystalické kompozice podle předloženého vynálezu se vyznačují více prodlouženou dobou trvání působení, pokud jsou podávány podkožně diabetickým pacientům, než je tomu u existujících komerčních NPH inzulínových přípravků. Je důležité, že tyto výsledky také ukazují, že předložený vynález umožňuje kontrolovat a dokonce optimalizovat trvání působení u pacientů manipulací poměru proteinu k derivatizovanému proteinu.

Tato schopnost manipulovat dobou trvání působení jednoduchými změnami poměrů proteinu a derivatizovaného proteinu je nejvýznamnější, pokud je nahlížena s přihlédnutím k historii problémů s inzulínovými přípravky. Historicky spočívala hlavní překážka vývoje inzulínových přípravků pro kontrolu bazální glukózy v tom, že jejich časové působení bylo neproměnlivě vázáno k vlastním

molekulárním vlastnostem proteinu, například afinitě vazby k albuminu, isoelektrickému bodu nebo rozpustnosti. V důsledku toho byla u každého přípravku možná pouze jediná doba působení pro každou molekulu nebo přípravek a jediný možný přístup pro zlepšení farmakokinetiky spočíval v další modifikaci molekuly.

Dlouho hledaným cílem byl vývin systémů s řízeným uvolňováním, jejichž farmakokinetika by mohla být přesně a snadno upravena manipulací s matricí přípravku. Mnoho akademického a průmyslového výzkumu v této oblasti bylo v posledních 15 letech zaměřeno na inzulín, avšak cíl kontrolovaného uvolňování se ukázal obzvláště těžko dosažitelný v důsledku extrémně úzkého terapeutického indexu inzulínu, požadavku jeho chronického užívání, stejně tak jako v důsledku ekonomických úvah, které působí proti sofistikovaným a drahým výrobním způsobům a přípravkům.

Hlavní výhoda předloženého vynálezu spočívá v tom, že představuje systém s kontrolovaným uvolňováním, ve kterém farmakokinetika uvolňování inzulínu může být snadněji řízena než u dalších navržených systémů technologií řízeného uvolňování. Nerozpustné kompozice složené z inzulínového proteinu spolu s derivatizovaným proteinem představují výhodný prostředek pro upravení rychlosti rozpouštění a tudíž umožňují kontrolované uvolňování. Ačkoliv není úmyslem situaci zjednodušovat a omezovat, předpokládá se, že farmakologická účinnost nerozpustných kompozice podle předloženého vynálezu je založena na pomalém uvolňování konzistentního poměru proteinu a derivatizovaného proteinu z kompozice. Dále se předpokládá, aniž by tím byl předložený

vynález jakkoli omezován, že významným základním znakem předloženého vynálezu je úplná nebo takřka úplná homogenita nerozpustných kompozic.

U mikrokryсталů se předpokládá, že každý jednotlivý mikrokryстал v suspenzi sestává z takřka stejného poměru proteinu a derivatizovaného proteinu. Tento poměr úzce odráží poměr proteinu k derivatizovanému proteinu, kombinovaných v roztoku před krystalizací. Také se předpokládá, že jak se mikrokryсталy rozpouštějí, odpovídající a předem určená část proteinu a derivatizovaného proteinu se uvolňuje po celou dobu trvání rozpouštění. Význam tohoto typu chování je značný, neboť vede ke konstantní, ale snížené rychlosti uvolňování dvou účinných molekul z místa provedení injekce do krevního oběhu. Pro dosažení tohoto cíle musí být obzvláštní pozornost věnována způsobu přípravy kompozic.

Předkládaný objev, že je možno krystalizovat protein s derivatizovaným proteinem a tímto způsobem získat homogenní kokryсталy, byl překvapujícím zjištěním, uváží-li se složitost parametrů, ovlivňujících krystalizaci proteinu: specifické a nespecifické mezimolekulární interakce, jako jsou vazba vodíku, elektrostatické interakce, hydrofobní interakce, van der Waalsovy síly, efekt vyloučeného objemu, rozpustnost a stérická hmota. Ačkoliv je základní chápání procesu krystalizace malých molekul relativně pokročilé, u komplexních makromolekul se jedná stále ještě o kvalitativní vědu a současná praxe spočívá v empirickém aplikování velkého souboru krystalizačních receptů.

Hydrofobní efekt byl navržen jako hlavní prostředek pro asociaci proteinů [Chothia, C. a kol., Nature 256:705-708 (1975)]. Kromě toho byla pozorována silná korelace mezi povrchovou hydrofobností a kontaktem protein-protein [Young, L. a kol., Protein Science 3:717-729 (1994)]. Kromě toho, vzhledem ke složitosti krystalizace proteinů, je objev, že derivatizované inzulíny mohou kokrystalizovat s nederivatizovaným proteinem způsobem izomorfním nebo takřka izomorfním s normálním inzulínem, překvapující.

Kokrystalizace dvou příbuzných terapeutických proteinů s cílem modifikace terapeutického chování je nový koncept. Je tomu tak do značné míry proto, že velká většina práce v oblasti krystalizace proteinů je motivována cílem dosažení jednotlivých velkých a homogenních krystalů vhodných pro rentgenovou difrakční strukturální analýzu. Ačkoliv proteinové kokrystalizace jsou známy, takové kokrystalizované systémy jsou charakterizovány jako komplexy hostitel-substrát, například protein a jeho receptor, komplexy protein-DNA a komplexy protein receptorová látka. Tyto komplexy kokrystalizace hostitel-substrát jsou zásadně odlišné od kokrystalizace podle předloženého vynálezu, protože se nevytváří žádný komplex mezi proteinem a derivatizovaným proteinem.

Předvídatelnost vlastností proteinu a derivatizovaného proteinu a homogenity nerozpustných kompozic podle předloženého vynálezu byly demonstrovány měřením (pomocí HPLC) koncentrací proteinu a derivatizovaného proteinu během studií rozpouštění použitím dvou preparátů mikrokystalů,

kteře byly pŕipraveny ze známých množství lidského inzulinu (protein) a B29-oktanoyl-lidského inzulinu (derivatizovaný protein). V prvním preparátu byl hmotnostní poměr proteinu pŕidaného k derivatizovanému protein 1:3. V druhém preparátu byl tento poměr 55:45. U 1:3 mikrokrystalů pŕedstavoval B29-oktanoyl-lidský inzulin mezi zhruba 73% a 76% celkového proteinu u 14 měření v průběhu 10 hodin během rozpouštění za podmínek, které byly popsány pro rozpouštěcí test uvedený výše. V datech nebyl pozorován žádný trend. V pŕípadě 55:45 mikrokrystalů pŕedstavoval B29-oktanoyl-lidský inzulin mezi zhruba 43% a 47% celkového proteinu pro 9 měření prováděných během periody zhruba 3,75 hodin v průběhu rozpouštění za podmínek, které byly popsány v rozpouštěcím testu uvedeném výše. Opětně nebyl v datech pozorován žádný trend.

Ner rozpustné kompozice podle pŕedloženého vynálezu mohou tvořit krystaly s tyčinkovitou morfologií nebo s nepravidelnou morfologií nebo mohou být pŕedstavovány amorfními precipitáty. Výhodné ner rozpustné kompozice jsou sestávají z acylovaného inzulinu nebo acylovaného inzulinového analogu, iontů zinku, které jsou pŕítomny v množství zhruba 0,3 až zhruba 0,7 molů na jeden mol celkového proteinu a fenolového konzervačního činidla, zvoleného ze souboru, zahrnujícího fenol, m-kresol, o-kresol, p-kresol, chlorkresol, methylparaben a jejich směsi a pŕítomného v dostatečném množství vzhledem k celkovému proteinu pro stabilizaci T3R3 nebo R6 hexamerové konformace a z protaminu, který je pŕítomen v množství zhruba 0,15 až zhruba 0,7 molů na jeden mol celkového proteinu.

Výhodná skupina inzulinových analogů pro pŕípravu

derivatizovaných inzulínových analogů, používaných pro vytváření nerozpustných kompozic sestává ze zvířecích inzulínů, delečních analogů a pI-posunutých analogů. Výhodnější skupina sestává ze zvířecích inzulínů a delečních analogů. Deleční analogy jsou ještě výhodnější.

Další výhodná skupina inzulínové analogy pro použití v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu zahrnuje monomerní inzulínové analogy. Obzvláště výhodné jsou ty monomerní inzulínové analogy, ve kterých aminokyselinový zbytek v poloze B28 je Asp, Lys, Leu, Val nebo Ala, aminokyselinový zbytek v poloze B29 je Lys nebo Pro, aminokyselinový zbytek v poloze B10 je His nebo Asp, aminokyselinový zbytek v poloze B1 je Phe, Asp nebo je vynechán sám nebo v kombinaci s delecí zbytku v poloze B2, aminokyselinový zbytek v poloze B30 je Thr, Ala, Ser nebo je vynechán a aminokyselinový zbytek v poloze B9 je Ser nebo Asp; za předpokladu, že buď poloha B28 nebo B29 je Lys.

Další výhodná skupina inzulínových analogů pro použití podle předloženého vynálezu spočívá v těch, u nichž isoelektrický bod inzulínového analogu je v rozmezí mezi zhruba 7,0 a zhruba 8,0. Tyto analogy jsou označovány jako "pI-posunutý inzulínové analogy." Příklady pI-posunutých inzulínových analogů zahrnují například ArgB31,ArgB32-lidský inzulín, GlyA21,ArgB31,ArgB32-lidský inzulín, ArgA0,ArgB31,ArgB32-lidský inzulín a ArgA0,GlyA21,ArgB31,ArgB32-lidský inzulín.

Další výhodná skupina inzulínových analogů zahrnuje LysB28,ProB29-lidský inzulín (B28 je Lys; B29 je Pro); AspB28-lidský inzulín (B28 je Asp), AspB1-lidský inzulín,

ArgB31,ArgB32-lidský inzulin, ArgA0-lidský inzulin, AspB1,GluB13-lidský inzulin, AlaB26-lidský inzulin, GlyA21-lidský inzulin, des(ThrB30)-lidský inzulin a GlyA21,ArgB31,ArgB32-lidský inzulin.

Obzvláště výhodné inzulinové analogy zahrnují LysB28,ProB29-lidský inzulin, des(ThrB30)-lidský inzulin, AspB28-lidský inzulin a AlaB26-lidský inzulin. Další obzvláště výhodný inzulinový analog je GlyA21,ArgB31,ArgB32-lidský inzulin [Dörschug, M., U. S. patent č. 5,656,722, 12. srpna 1997]. Nejvýhodnější inzulinový analog je LysB28,ProB29-lidský inzulin.

Výhodné derivatizované proteiny jsou acylované proteiny a výhodné acylované proteiny pro mikrokrystaly a přípravky podle předloženého vynálezu jsou mastnou kyselinou acylované inzulíny a mastnou kyselinou acylované inzulinové analogy. Mastnou kyselinou acylovaný lidský inzulin je vysoce výhodný. Mastnou kyselinou acylované inzulinové analogy jsou stejně vysoce výhodné.

Konkrétní skupina používané pro derivatizaci inzulinu, inzulinového analogu nebo proinzulinu (kolektivně označované jako protein) může být libovolná chemická skupina, která nesnižuje významně biologickou aktivitu proteinu, je netoxická, pokud není vázána k proteinu a nejvýznamněji snižuje vodnou rozpustnost, zvyšuje lipofilitu nebo snižuje rozpustnost zinek-protaminových komplexů derivatizovaného proteinu.

Jedna výhodná skupina acylačních skupin jsou mastné

kyseliny, které mají přímý řetězec a jsou nasycené. Tato skupina zahrnuje methanovou kyselinu (C1), ethanovou kyselinu (C2), propanovou kyselinu (C3), n-butanovou kyselinu (C4), n-pentanovou kyselinu (C5), n-hexanovou kyselinu (C6), n-heptanovou kyselinu (C7), n-oktanovou kyselinu (C8), n-nonanovou kyselinu (C9), n-dekanovou kyselinu (C10), n-undekanovou kyselinu (C11), n-dodekanovou kyselinu (C12), n-tridekanovou kyselinu (C13), n-tetradekanovou kyselinu (C14), n-pentadekanovou kyselinu (C15), n-hexadekanovou kyselinu (C16), n-heptadekanovou kyselinu (C17) a n-oktadekanovou kyselinu (C18). Tomu odpovídají formyl (C1), acetyl (C2), propionyl (C3), butyryl (C4), pentanoyl (C5), hexanoyl (C6), heptanoyl (C7), oktanoyl (C8), nonanoyl (C9), dekanoyl (C10), undekanoyl (C11), dodekanoyl (C12), tridekanoyl (C13), tetradekanoyl (C14) nebo myristoyl, pentadekanoyl (C15), hexadekanoyl (C16) nebo palmitoyl, heptadekanoyl (C17) a oktadekanoyl (C18) nebo stearoyl.

Výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají sudý počet atomů uhlíku - to znamená C2, C4, C6, C8, C10, C12, C14, C16 a C18 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají lichý počet atomů uhlíku - to znamená C1, C3, C5, C7, C9, C11, C13, C15 a C17 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají více než 5 atomů uhlíku - to znamená C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17 a C18 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají méně než 9 atomů uhlíku - to znamená C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 a C8 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají mezi 6 a 8 atomy uhlíku - to znamená C6, C7 a C8 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají více než mezi 4 a 6 atomů uhlíku - to znamená C4, C5 a C6 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají více než mezi 2 a 4 atomů uhlíku - to znamená C2, C3 a C4 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají méně než 6 atomů uhlíku - to znamená C1, C2, C3, C4 a C5 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají méně než 4 atomů uhlíku - to znamená C1, C2 a C3 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají více než 9 atomů uhlíku - to znamená C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17 a C18 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají sudý počet atomů uhlíku a více než 9 atomů uhlíku - to znamená C10, C12, C14, C16 a C18 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají 12, 14 nebo 16 atomů uhlíku, to znamená C12, C14 a C16 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají 14 nebo 16 atomů uhlíku, to znamená C14 a C16 nasycené mastné kyseliny. Mastná kyselina s 14 atomy uhlíku je obzvláště výhodná. Mastná kyselina s 16 atomy uhlíku je také obzvláště výhodná.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v nasycených mastných kyselinách, které mají mezi 4 a 10 atomů uhlíku, to jest C4, C5, C6, C7, C8, C9 a C10 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v nasycených mastných kyselinách, které mají sudý počet atomů uhlíku mezi 4 a 10 atomů uhlíku, to jest C4, C6, C8 a C10 nasycené mastné kyseliny.

Další výhodná skupina mastných kyselin pro vytváření mastnou kyselinou acylovaných proteinů používaných v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu spočívá v mastných kyselinách, které mají mezi 6, 8 nebo 10 atomů uhlíku. Mastná kyselina s 6 atomy uhlíku je obzvláště výhodná. Mastná kyselina s 8 atomy uhlíku je také obzvláště výhodná. Mastná kyselina s 10 atomy uhlíku je obzvláště výhodný.

Odborníkovi je zřejmé, že užší výhodné skupiny jsou vytvořeny kombinací výhodných skupin mastných kyselin

popsaných výše.

Další výhodná skupina acylačních skupin spočívá v nasycených mastných kyselinách, které jsou rozvětvené. Rozvětvená mastná kyselina má alespoň dvě větve. Délka "větve" rozvětvené mastné kyseliny může být popsána počtem atomů uhlíku ve větvi, počínaje uhlíkem karboxylové skupiny. Například rozvětvená mastná kyselina 3-ethyl-5-methylhexanová kyselina má tři větve, jejichž délka je jsou pět, šest a šest atomů uhlíku. V tomto případě "nejdelší" větev obsahuje šest atomů uhlíku. Jako jiný příklad, 2,3,4,5-tetraethyloktanová kyselina má pět větví, jejichž délka je 4, 5, 6, 7 a 8 atomů uhlíku. "Nejdelší" větev obsahuje osm atomů uhlíku. Výhodná skupina rozvětvených mastných kyselin jsou kyseliny, které mají od tří do deseti atomů uhlíku v nejdelší větvi.

Bude podán reprezentativní výčet takových nasycených mastných kyselin, aby byla vyloučena možnost nedorozumění o rozsahu mastných kyselin, které mohou být použity jako acylační skupiny pro proteiny podle předloženého vynálezu: 2-methyl-propionová kyselina, 2-methyl-máselná kyselina, 3-methyl-máselná kyselina, 2,2-dimethyl-propionová kyselina, 2-methyl-pentanová kyselina, 3-methyl-pentanová kyselina, 4-methyl-pentanová kyselina, 2,2-dimethyl-máselná kyselina, 2,3-dimethyl-máselná kyselina, 3,3-dimethyl-máselná kyselina, 2-ethyl-máselná kyselina, 2-methyl-hexanová kyselina, 5-methyl-hexanová kyselina, 2,2-dimethyl-pentanová kyselina, 2,4-dimethyl-pentanová kyselina, 2-ethyl-3-methyl-máselná kyselina, 2-ethyl-pentanová kyselina, 3-ethyl-pentanová kyselina, 2,2-dimethyl-3-methyl-máselná

kyselina, 2-methyl-heptanová kyselina, 3-methyl-heptanová  
 kyselina, 4-methyl-heptanová kyselina, 5-methyl-heptanová  
 kyselina, 6-methyl-heptanová kyselina, 2,2-dimethyl-hexanová  
 kyselina, 2,3-dimethyl-hexanová kyselina, 2,4-dimethyl-  
 hexanová kyselina, 2,5-dimethyl-hexanová kyselina, 3,3-  
 dimethyl-hexanová kyselina, 3,4-dimethyl-hexanová kyselina,  
 3,5-dimethyl-hexanová kyselina, 4,4-dimethyl-hexanová  
 kyselina, 2-ethyl-hexanová kyselina, 3-ethyl-hexanová  
 kyselina, 4-ethyl-hexanová kyselina, 2-propyl-pentanová  
 kyselina, 2-ethyl-hexanová kyselina, 3-ethyl-hexanová  
 kyselina, 4-ethyl-hexanová kyselina, 2-(1-propyl)pentanová  
 kyselina, 2-(2-propyl)pentanová kyselina, 2,2-diethyl-  
 máselná kyselina, 2,3,4-trimethyl-pentanová kyselina, 2-  
 methyl-oktanová kyselina, 4-methyl-oktanová kyselina, 7-  
 methyl-oktanová kyselina, 2,2-dimethyl-heptanová kyselina,  
 2,6-dimethyl-heptanová kyselina, 2-ethyl-2-methyl-hexanová  
 kyselina, 3-ethyl-5-methyl-hexanová kyselina, 3-(1-propyl)-  
 hexanová kyselina, 2-(2-butyl)-pentanová kyselina, 2-(2-(2-  
 methylpropyl))pentanová kyselina, 2-methyl-nonanová  
 kyselina, 8-methyl-nonanová kyselina, 6-ethyl-oktanová  
 kyselina, 4-(1-propyl)-heptanová kyselina, 5-(2-propyl)-  
 heptanová kyselina, 3-methyl-undekanová kyselina, 2-pentyl-  
 heptanová kyselina, 2,3,4,5,6-pentamethyl-heptanová  
 kyselina, 2,6-diethyl-oktanová kyselina, 2-hexyl-oktanová  
 kyselina, 2,3,4,5,6,7-hexamethyl-oktanová kyselina, 3,3-  
 diethyl-4,4-diethyl-hexanová kyselina, 2-heptyl-nonanová  
 kyselina, 2,3,4,5-tetraethyl-oktanová kyselina, 2-oktyl-  
 dekanová kyselina a 2-(1-propyl)-3-(1-propyl)-4,5-diethyl-6-  
 methyl-heptanová kyselina.

Ještě další výhodná skupina acylačních skupin zahrnuje

cyklické alkylové kyseliny, obsahující od 5 do 24 atomů uhlíku, ve kterých cyklická alkylová část nebo části obsahují 5 až 7 atomů uhlíku. Bude podán reprezentativní výčet takových cyklických alkylových kyselin, aby byla vyloučena možnost nedorozumění o rozsahu mastných kyselin, které mohou být použity jako acylační skupiny pro proteiny podle předloženého vynálezu: cyklopentyl-mravenčí kyselina, cyklohexyl-mravenčí kyselina, 1-cyklopentyl-octová kyselina, 2-cyklohexyl-octová kyselina, 1,2-dicyklopentyl-octová kyselina a podobně.

Výhodná skupina derivatizovaných proteinů pro použití v nerozpustných kompozicích podle předloženého vynálezu zahrnuje monoacylované proteiny. Monoacylace v  $\epsilon$ -aminové skupině je nejvýhodnější. V případě inzulínu je monoacylace v LysB29 výhodná. Podobně pro jisté inzulínové analogy, jako jsou LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu, je monoacylace v  $\epsilon$ -aminové skupině LysB28 nejvýhodnější. Monoacylace v  $\alpha$ -aminové skupině B-řetězce (B1) je také výhodná. Monoacylace v  $\alpha$ -aminové skupině A-řetězce (A1) je také výhodná.

Další výhodná skupina acylovaných proteinů pro použití v nerozpustných kompozicích podle předloženého vynálezu zahrnuje diacylované proteiny. Diacylace může být například v  $\epsilon$ -aminové skupině Lys a v  $\alpha$ -aminové skupině B-řetězce nebo může být v  $\epsilon$ -aminové skupině Lys a v  $\alpha$ -aminové skupině A-řetězce nebo může být v  $\alpha$ -aminové skupině A-řetězce a v  $\alpha$ -aminové skupině B-řetězce.

Další výhodná skupina acylovaných proteinů pro použití v

nerozpustných kompozicích podle předloženého vynálezu zahrnuje triacylované proteiny. Triacylované proteiny jsou proteiny, které jsou acylované v  $\epsilon$ -aminové skupině Lys, v  $\alpha$ -aminové skupině B-řetězce a v  $\alpha$ -aminové skupině A-řetězce.

Je také výhodné používat acylované proteiny, které jsou směs monoacylovaných a diacylovaných proteinů.

Je také výhodné používat acylované proteiny, které jsou směs monoacylovaných a triacylovaných proteinů.

Další výhodná skupina acylovaných proteinů sestává ze směsi diacylovaných a triacylovaných proteinů.

Také je výhodné používat acylované proteiny, které jsou směsí monoacylovaných, diacylovaných a triacylovaných proteinů.

Jisté mastnou kyselinou acylované proteiny používané v mikrokrystalech podle předloženého vynálezu budou uvedeny pro zajištění porozumění rozsahu předloženého vynálezu. Tento seznam je ilustrativní a fakt, že jisté mastnou kyselinou acylované proteiny nejsou uvedeny v tomto seznamu neznámá, že by mikrokrystal takový protein obsahující nebyl v rozsahu předloženého vynálezu.

B29-N $\epsilon$ -formyl-lidský inzulín.

B1-N $\alpha$ -formyl-lidský inzulín.

A1-N $\alpha$ -formyl-lidský inzulín.

B29-N $\epsilon$ -formyl-, B1-N $\alpha$ -formyl-lidský inzulín.

- B29-Nε-formyl-, A1-Nα-formyl-lidský inzulín.
- A1-Nα-formyl-, B1-Nα-formyl-lidský inzulín.
- B29-Nε-formyl-, A1-Nα-formyl-, B1-Nα-formyl-lidský inzulín.
- B29-Nε-acetyl-lidský inzulín.
- B1-Nα-acetyl-lidský inzulín.
- A1-Nα-acetyl-lidský inzulín.
- B29-Nε-acetyl-, B1-Nα-acetyl-lidský inzulín.
- B29-Nε-acetyl-, A1-Nα-acetyl-lidský inzulín.
- A1-Nα-acetyl-, B1-Nα-acetyl-lidský inzulín.
- B29-Nε-acetyl-, A1-Nα-acetyl-, B1-Nα-acetyl-lidský inzulín.
- B29-Nε-propionyl-lidský inzulín.
- B1-Nα-propionyl-lidský inzulín.
- A1-Nα-propionyl-lidský inzulín.
- B29-Nε-propionyl-, B1-Nα-propionyl-lidský inzulín.
- B29-Nε-propionyl-, A1-Nα-propionyl-lidský inzulín.
- A1-Nα-propionyl-, B1-Nα-propionyl-lidský inzulín.
- B29-Nε-propionyl-, A1-Nα-propionyl-, B1-Nα-propionyl-lidský inzulín.
- B29-Nε-butyryl-lidský inzulín.
- B1-Nα-butyryl-lidský inzulín.
- A1-Nα-butyryl-lidský inzulín.
- B29-Nε-butyryl-, B1-Nα-butyryl-lidský inzulín.
- B29-Nε-butyryl-, A1-Nα-butyryl-lidský inzulín.
- A1-Nα-butyryl-, B1-Nα-butyryl-lidský inzulín.
- B29-Nε-butyryl-, A1-Nα-butyryl-, B1-Nα-butyryl-lidský inzulín.
- B29-Nε-pentanoyl-lidský inzulín.
- B1-Nα-pentanoyl-lidský inzulín.

A1-N $\alpha$ -pentanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -pentanoyl-, B1-N $\alpha$ -pentanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -pentanoyl-, A1-N $\alpha$ -pentanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -pentanoyl-, B1-N $\alpha$ -pentanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -pentanoyl-, A1-N $\alpha$ -pentanoyl-, B1-N $\alpha$ -pentanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -hexanoyl-lidský inzulín.  
B1-N $\alpha$ -hexanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -hexanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -hexanoyl-, B1-N $\alpha$ -hexanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -hexanoyl-, A1-N $\alpha$ -hexanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -hexanoyl-, B1-N $\alpha$ -hexanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -hexanoyl-, A1-N $\alpha$ -hexanoyl-, B1-N $\alpha$ -hexanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -heptanoyl-lidský inzulín.  
B1-N $\alpha$ -heptanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -heptanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -heptanoyl-, B1-N $\alpha$ -heptanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -heptanoyl-, A1-N $\alpha$ -heptanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -heptanoyl-, B1-N $\alpha$ -heptanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -heptanoyl-, A1-N $\alpha$ -heptanoyl-, B1-N $\alpha$ -heptanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -oktanoyl-lidský inzulín.  
B1-N $\alpha$ -oktanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -oktanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -oktanoyl-, B1-N $\alpha$ -oktanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -oktanoyl-, A1-N $\alpha$ -oktanoyl-lidský inzulín.

- A1-N $\alpha$ -oktanoyl-, B1-N $\alpha$ -oktanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -oktanoyl-, A1-N $\alpha$ -oktanoyl-, B1-N $\alpha$ -oktanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -nonanoyl-lidský inzulín.  
B1-N $\alpha$ -nonanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -nonanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -nonanoyl-, B1-N $\alpha$ -nonanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -nonanoyl-, A1-N $\alpha$ -nonanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -nonanoyl-, B1-N $\alpha$ -nonanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -nonanoyl-, A1-N $\alpha$ -nonanoyl-, B1-N $\alpha$ -nonanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -dekanoyl-lidský inzulín.  
B1-N $\alpha$ -dekanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -dekanoyl-lidský inzulín.  
B29 -N $\epsilon$ -dekanoyl-, B1, N $\alpha$ -dekanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -dekanoyl-, A1-N $\alpha$ -dekanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -dekanoyl-, B1-N $\alpha$ -dekanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -dekanoyl-, A1-N $\alpha$ -dekanoyl-, B1-N $\alpha$ -dekanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -undekanoyl-lidský inzulín.  
B1-N $\alpha$ -undekanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -undekanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -dodekanoyl-lidský inzulín.  
B1-N $\alpha$ -dodekanoyl-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -dodekanoyl-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -tridekanoyl-lidský inzulín.  
B1-N $\alpha$ -tridekanoyl-lidský inzulín.

- A1-N $\alpha$ -tridekanoyl-lidský inzulín.
- B29-N $\epsilon$ -tetradekanoyl-lidský inzulín.
- B1-N $\alpha$ -tetradekanoyl-lidský inzulín.
- A1-N $\alpha$ -tetradekanoyl-lidský inzulín.
- B29-N $\epsilon$ -pentadekanoyl-lidský inzulín.
- B1-N $\alpha$ -pentadekanoyl-lidský inzulín.
- A1-N $\alpha$ -pentadekanoyl-lidský inzulín.
- B29-N $\epsilon$ -hexadekanoyl-lidský inzulín.
- B1-N $\alpha$ -hexadekanoyl-lidský inzulín.
- A1-N $\alpha$ -hexadekanoyl-lidský inzulín.
- B29-N $\epsilon$ -heptadekanoyl-lidský inzulín.
- B1-N $\alpha$ -heptadekanoyl-lidský inzulín.
- A1-N $\alpha$ -heptadekanoyl-lidský inzulín.
- B29-N $\epsilon$ -oktadekanoyl-lidský inzulín.
- B1-N $\alpha$ -oktadekanoyl-lidský inzulín.
- A1-N $\alpha$ -oktadekanoyl-lidský inzulín.
- B28-N $\epsilon$ -formyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -formyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -formyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -formyl-, B1-N $\alpha$ -formyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -formyl-, A1-N $\alpha$ -formyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -formyl-, B1-N $\alpha$ -formyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -formyl-, A1-N $\alpha$ -formyl-, B1-N $\alpha$ -formyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.

- B28-N $\epsilon$ -acetyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -acetyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -acetyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -acetyl-, B1-N $\alpha$ -acetyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -acetyl-, A1-N $\alpha$ -acetyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -acetyl-, B1-N $\alpha$ -acetyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -acetyl-, A1-N $\alpha$ -acetyl-, B1-N $\alpha$ -acetyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -propionyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -propionyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -propionyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -propionyl-, B1-N $\alpha$ -propionyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -propionyl-, A1-N $\alpha$ -propionyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -propionyl-, B1-N $\alpha$ -propionyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -propionyl-, A1-N $\alpha$ -propionyl-, B1-N $\alpha$ -propionyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -butyryl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -butyryl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -butyryl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -butyryl-, B1-N $\alpha$ -butyryl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -butyryl-, A1-N $\alpha$ -butyryl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.

- inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -butyryl-, B1-N $\alpha$ -butyryl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -butyryl-, A1-N $\alpha$ -butyryl-, B1-N $\alpha$ -butyryl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -pentanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -pentanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -pentanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -pentanoyl-, B1-N $\alpha$ -pentanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -pentanoyl-, A1-N $\alpha$ -pentanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -pentanoyl-, B1-N $\alpha$ -pentanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -pentanoyl-, A1-N $\alpha$ -pentanoyl-, B1-N $\alpha$ -pentanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -hexanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -hexanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -hexanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -hexanoyl-, B1-N $\alpha$ -hexanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -hexanoyl-, A1-N $\alpha$ -hexanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -hexanoyl-, B1-N $\alpha$ -hexanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -hexanoyl-, A1-N $\alpha$ -hexanoyl-, B1-N $\alpha$ -hexanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -heptanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.

- B1-N $\alpha$ -heptanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -heptanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -heptanoyl-, B1-N $\alpha$ -heptanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -heptanoyl-, A1-N $\alpha$ -heptanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -heptanoyl-, B1-N $\alpha$ -heptanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -heptanoyl-, A1-N $\alpha$ -heptanoyl-, B1-N $\alpha$ -heptanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -oktanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -oktanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -oktanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -oktanoyl-, B1-N $\alpha$ -oktanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -oktanoyl-, A1-N $\alpha$ -oktanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -oktanoyl-, B1-N $\alpha$ -oktanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -oktanoyl-, A1-N $\alpha$ -oktanoyl-, B1-N $\alpha$ -oktanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -nonanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -nonanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -nonanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -nonanoyl-, B1-N $\alpha$ -nonanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -nonanoyl-, A1-N $\alpha$ -nonanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.

- A1-N $\alpha$ -nonanoyl-, B1-N $\alpha$ -nonanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -nonanoyl-, A1-N $\alpha$ -nonanoyl-, B1-N $\alpha$ -nonanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -dekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -dekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -dekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -dekanoyl-, B1-N $\alpha$ -dekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -dekanoyl-, A1-N $\alpha$ -dekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -dekanoyl-, B1-N $\alpha$ -dekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -dekanoyl-, A1-N $\alpha$ -dekanoyl-, B1-N $\alpha$ -dekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -undekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -undekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -undekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -dodekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -dodekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -dodekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -tridekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -tridekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -tridekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B28-N $\epsilon$ -tetradekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- B1-N $\alpha$ -tetradekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.
- A1-N $\alpha$ -tetradekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.

B28-N $\epsilon$ -pentadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
B1-N $\alpha$ -pentadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
A1-N $\alpha$ -pentadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
B28-N $\epsilon$ -hexadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
B1-N $\alpha$ -hexadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
A1-N $\alpha$ -hexadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
B28-N $\epsilon$ -heptadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
B1-N $\alpha$ -heptadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
A1-N $\alpha$ -heptadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
B28-N $\epsilon$ -oktadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
B1-N $\alpha$ -oktadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
A1-N $\alpha$ -oktadekanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.  
B29-N $\epsilon$ -pentanoyl-GlyA21, ArgB31, ArgB32-lidský inzulín.  
B1-N $\alpha$ -hexanoyl-GlyA21, ArgB31, ArgB32-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -heptanoyl-GlyA21, ArgB31, ArgB32-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -oktanoyl-, B1-N $\alpha$ -oktanoyl-GlyA21, ArgB31, ArgB32-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -propionyl-, A1-N $\alpha$ -propionyl-GlyA21, ArgB31, ArgB32-lidský inzulín.  
A1-N $\alpha$ -acetyl, B1-N $\alpha$ -acetyl-GlyA21, ArgB31, ArgB32-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -formyl-, A1-N $\alpha$ -formyl-, B1-N $\alpha$ -formyl-GlyA21, ArgB31, ArgB32-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -formyl-des (TyrB26)-lidský inzulín.  
B1-N $\alpha$ -acetyl-AspB28-lidský inzulín.  
B29-N $\epsilon$ -propionyl-, A1-N $\alpha$ -propionyl-, B1-N $\alpha$ -propionyl-AspB1, AspB3, AspB21-lidský inzulín.

A1-N $\alpha$ -butyryl-AspB10-lidský inzulín.

B29-N $\epsilon$ -pentanoyl-GlyA21-lidský inzulín.

B1-N $\alpha$ -hexanoyl-GlyA21-lidský inzulín.

A1-N $\alpha$ -heptanoyl-GlyA21-lidský inzulín.

B29-N $\epsilon$ -oktanoyl-, B1-N $\alpha$ -oktanoyl-GlyA21-lidský inzulín.

B29-N $\epsilon$ -propionyl-, A1-N $\alpha$ -propionyl-GlyA21-lidský inzulín.

A1-N $\alpha$ -acetyl, B1-N $\alpha$ -acetyl-GlyA21-lidský inzulín.

B29-N $\epsilon$ -formyl-, A1-N $\alpha$ -formyl-, B1-N $\alpha$ -formyl-GlyA21-lidský inzulín.

B29-N $\epsilon$ -butyryl-des(ThrB30)-lidský inzulín.

B1-N $\alpha$ -butyryl-des(ThrB30)-lidský inzulín.

A1-N $\alpha$ -butyryl-des(ThrB30)-lidský inzulín.

B29-N $\epsilon$ -butyryl-, B1-N $\alpha$ -butyryl-des(ThrB30)-lidský inzulín.

B29-N $\epsilon$ -butyryl-, A1-N $\alpha$ -butyryl-des(ThrB30)-lidský inzulín.

A1-N $\alpha$ -butyryl-, B1-N $\alpha$ -butyryl-des(ThrB30)-lidský inzulín.

B29-N $\epsilon$ -butyryl-, A1-N $\alpha$ -butyryl-, B1-N $\alpha$ -butyryl-des(ThrB30)-lidský inzulín.

Vodné kompozice obsahující vodu jako hlavní rozpouštědlo jsou výhodné. Vodné suspenze, ve kterých voda je rozpouštědlo jsou vysoce výhodné.

Kompozice podle předloženého vynálezu jsou používány pro léčení pacientů, kteří mají diabetes nebo hyperglykémii. Přípravky podle předloženého vynálezu typicky poskytují derivatizovaný protein v koncentracích od zhruba 1 mg/ml do zhruba 10 mg/ml. Současné přípravky s obsahem inzulínových produktů jsou typicky charakterizovány užívající koncentraci jednotek aktivity inzulínu (jednotek/ml), jako například

U40, U50, U100 a podobně, což zhruba odpovídá přibližně přípravkům 1,4, 1,75 a 3,5 mg/ml. Dávka, způsob podávání a počet podávání denně bude určen lékařem s uvážením takových faktorů jako je léčebný cíl, povaha a příčina pacientova onemocnění, pacientovo pohlaví a hmotnost, úroveň zaškolení, zvyky v jídlu, postup při podávání a další faktory, známé školenému lékaři. Zhruba uvedeno může být denní dávka v rozmezí od zhruba 1 nmol/kg tělesné hmotnosti do zhruba 6 nmol/kg tělesné hmotnosti (6 nmol je považován za ekvivalent zhruba 1 jednotce aktivity inzulínu). Dávka v rozmezí mezi zhruba 2 a zhruba 3 nmol/kg je typická pro současnou inzulínovou terapii.

Lékař s obvyklými znalostmi léčení diabetu je schopen zvolit terapeuticky nejvýhodnější prostředky pro podávání přípravků podle předloženého vynálezu.

Parenterální způsob podávání je výhodný. Typické cesty pro parenterální podávání suspenzních přípravků inzulínu jsou podkožní a intramuskulární cesta. Kompozice a přípravky podle předloženého vynálezu mohou také být podávány cestou nasální, bukální, pulmonární nebo okulární.

Glycerol v koncentraci od 12 mg/ml do 25 mg/ml je výhodný jako isotonické činidlo. Ještě výhodnější jako isotonické činidlo je použití glycerolu v koncentraci od zhruba 15 mg/ml do zhruba 17 mg/ml.

M-kresol a fenol nebo jejich směsi, jsou výhodná konzervační činidla v přípravcích podle předloženého vynálezu.

Inzulín, inzulínové analogy nebo proinzulíny používané pro přípravu derivatizovaných proteinů mohou být připraveny libovolnou z řady uznávaných technik syntézy peptidů včetně klasických způsobů (v roztoku), syntézy v pevné fázi, semisyntetických způsobů a v novější době rekombinantních DNA způsobů. Viz například Chance, R. B. a kol., U.S. patent č. 5,514,646, 7. květen 1996; EPO publikační číslo 383,472, 7. února 1996; Brange, J. J. V. a kol. EPO publikační číslo 214,826, 18. března 1987; a Belagaje, R. M. a kol., U.S. patent č. 5,304,473, 19. dubna 1994, které popisují přípravu různých proinzulínů a inzulínových analogů. Tyto reference jsou zde výslovně zahrnuty jako reference.

Obecně se derivatizované proteiny připraví použitím způsobů známých ze stavu techniky. Výše uvedený list publikací uvedený výše popisuje derivatizované proteiny a obsahuje vhodné způsoby přípravy derivatizovaných proteinů. Tyto reference jsou zde výslovně zahrnuty jako reference pro způsoby přípravy derivatizovaných proteinů. Pro přípravu acylovaných proteinů se protein nechá reagovat s aktivovanou organickou kyselinou, jako je například aktivovaná mastná kyselina. Aktivované mastné kyseliny jsou deriváty běžně používaných acylačních činidel a zahrnují aktivované estery mastných kyselin, halogenidy mastných kyselin, aktivované amidy mastných kyselin, jako je aktivovaný azolidový derivát [Hansen, L. B., WIPO Publikace No. 98/02460, 22 January 1998] a anhydridy mastných kyselin. Použití aktivovaných esterů, obzvláště N-hydroxysukcinimidových esterů mastných kyselin je obzvláště výhodný prostředek pro acylaci volné aminokyseliny mastnou kyselinou. Lapidot a kol. popisují přípravu N-hydroxysukcinimidových esterů a

jejich použití při přípravě N-lauroyl-glycinu, N-lauroyl-L-serinu a N-lauroyl-L-glutamové kyseliny. Výraz "aktivovaný ester mastné kyseliny" znamená mastnou kyselinu, která byla aktivována použitím obecných technik, známých v oboru [Riordan, J. F. a Vallee, B. L., *Methods in Enzymology*, XXV:494-499 (1972); Lapidot, Y. a kol., *J. Lipid Res.* 8:142-145 (1967)]. Hydroxybenzotriazid (HOBT), N-hydroxysukcinimid a jejich deriváty jsou obzvláště dobře známy pro vytváření aktivovaných kyselin pro syntézu peptidů.

Pro selektivní acylaci  $\epsilon$ -aminové skupiny mohou být použity různé ochranné skupiny pro blokování  $\alpha$ -aminových skupin během kopulace. Volba vhodné ochranné skupiny je známa odborníkovi v oboru a zahrnuje p-methoxybenzoxykarbonyl (pmZ). Výhodně se  $\epsilon$ -aminová skupina acyluje v syntéze o jednom kroku bez použití skupin chránících aminové skupiny. Způsob selektivní acylace  $\epsilon$ -aminové skupiny zbytku Lys je popsán a nárokován v Baker, J. C. a kol., U.S. patent č. 5,646,242, 8. července 1997, který je zde výslovně zahrnut ve své celistvosti jako reference. Způsob přípravy suchého prášku acylovaného proteinu je popsán a nárokován v Baker, J. C. a kol., U.S. patent č. 5,700,904, 23. prosince 1997, který je zde výslovně zahrnut ve své celistvosti jako reference.

Primární role zinku v předloženém vynálezu je usnadnit vytváření zinečnatých hexamerů proteinu a derivatizovaného proteinu, buď odděleně jako smíšených hexamerů nebo společně jako hybridních hexamerů. Zinek usnadňuje vytváření hexamerů inzulinu a inzulinových analogů. Zinek také napomáhá vytváření hexamerů derivatizovaných inzulinů a inzulinových

analogů. Vytváření hexamerů se vhodně dosahuje upravením pH roztoku obsahujícího protein nebo derivatizovaný protein nebo oba do neutrální oblasti v přítomnosti iontů dvojmocného zinku nebo přidáním dvojmocného zinku po upravení pH do neutrální oblasti.

Pro účinný výtěžek mikrokrystalů nebo amorfního precipitátu je molární poměr zinku k celkovému proteinu v mikrokrystalech a amorfním precipitátu podle předloženého vynálezu omezen spodní mezí zhruba 0,33, to znamená přibližně dva atomy zinku na jeden hexamer, které jsou nutné pro účinnou hexamerizaci. Kompozice mikrokrystalů a amorfních precipitátů se vhodně vytváří se zhruba 2 až zhruba 4-6 atomy zinku za situace, kdy není přítomna žádná jiná sloučenina, která by byla v kompetici s inzulinem pro zinek. Ještě více zinku může být ve způsobu použito, pokud je přítomna sloučenina, která je v kompetici s proteinem o vazbu se zinkem, jako je například sloučenina obsahující citrát nebo fosfát. Přebytek zinku nad minimální množství nutné pro účinnou hexamerizaci může být žádoucí pro rychlejší průběh hexamerizace. Přebytek zinku nad uvedené minimální množství může také být v přípravku podle předloženého vynálezu přítomen a může být žádoucí pro zlepšení chemických a fyzikálních vlastností jako je stabilita, pro zlepšení suspendovatelnosti a možná i pro další prodloužení doby působení. V důsledku toho jsou přípustné poměry zinek:protein ve velmi širokých rozmezích pro použití v nerozpustných kompozicích, způsobech a přípravcích podle předloženého vynálezu.

V souladu s předloženým vynálezem je zinek přítomen

v přípravku v množství od zhruba 0,3 molu do zhruba 7 molů na jeden mol celkového proteinu a výhodněji zhruba od 0,3 molu do zhruba 1,0 molu celkového proteinu. Ještě výhodněji je poměr zinku k derivatizovanému proteinu v rozmezí od zhruba 0,3 do zhruba 0,7 molu atomů zinku na jeden mol celkového proteinu. Nejvýhodněji je poměr zinku k celkovému proteinu od zhruba 0,30 do zhruba 0,55 molu atomů zinku na jeden mol celkového proteinu.

U přípravků s vyšším obsahem zinku, které jsou podobné PZI přípravkům je poměr zinku od zhruba 5 do zhruba 7 molů zinku na jeden mol celkového proteinu.

Sloučeniny zinku, které dodávají zinek podle předloženého vynálezu mohou být libovolné farmaceuticky přijatelné sloučeniny zinku. Přidávání zinku do inzulínových přípravků je v oboru známo stejně tak jako jsou známy farmaceuticky přijatelné zdroje zinku. Výhodné sloučeniny zinku pro dodávání zinku podle předloženého vynálezu zahrnují chlorid zinečnatý, octan zinečnatý, citronan zinečnatý, oxid zinečnatý a dusičnan zinečnatý.

Komplexující sloučenina je požadována pro vytváření mikrokryсталů a precipitátů podle předloženého vynálezu. Komplexující sloučenina musí být přítomna v dostatečném množství k tomu, aby způsobila podstatnou precipitaci a krystalizaci hexamerů. Taková množství mohou být snadno určena pro každou konkrétní přípravu konkrétní komplexující sloučeniny prostými titračními pokusy. Ideálně se koncentrace komplexující sloučeniny nastaví tak, aby pouze zanedbatelné množství komplexující sloučenina zůstalo v

rozpuštěné fázi po dokončení procesů precipitace a krystalizace. To vyžaduje použití komplexující sloučeniny v množství založeném na pokusně určeném "isofanovém" poměru. Očekává se, že tento poměr bude velmi podobný obdobnému poměru pro NPH a NPL. Může však být mírně odlišný, neboť derivatizace může ovlivnit povahu interakce protein-protamin.

Pokud protamin je komplexující sloučeninou, je přítomen v mikrokryystalu v množství od zhruba 0,15 mg do zhruba 0,5 mg na 3,5 mg celkového proteinu. Poměr protaminu k celkovému proteinu je výhodně od zhruba 0,25 do zhruba 0,40 (mg/mg). Výhodněji je tento poměr od zhruba 0,25 do zhruba 0,38 (mg/mg). Výhodně je protamin použit v množství od 0,05 mg do zhruba 0,2 mg na jeden mg celkového proteinu a výhodněji od zhruba 0,05 do zhruba 0,15 miligramu protaminu na jeden miligram celkového proteinu. Protaminsulfát je výhodná forma soli protaminu pro použití podle předloženého vynálezu. Pokud je použit protaminsulfát nebo jiná sůl protamin, hmotnost použité soli se musí upravit vzhledem k hmotnosti protaminové volné báze, která by byla použita v téže přípravku v závislosti na poměru molekulových hmotností soli a protaminu.

Pro další prodloužení doby působení kompozic podle předloženého vynálezu nebo pro zlepšení jejich suspendovatelnosti mohou být po krystalizaci použity další protamin a zinek. V rozsahu předmětu předloženého vynálezu jsou proto také přípravky, obsahující vyšší množství protaminu než je isofanový poměr. U těchto přípravku je poměr protaminu od 0,25 mg do zhruba 0,5 mg protaminu na

jeden mg celkového proteinu.

Požadovanou složkou mikrokystalů a precipitátů podle předloženého vynálezu je hexamery stabilizující sloučenina. V literatuře byly charakterizovány struktury tří hexamerových konformací, označované jako T6, T3R3 a R6. V přítomnosti hexamer stabilizující sloučeniny, jako jsou různé fenolové sloučeniny, je R6 konformace stabilizována. Je proto vysoce pravděpodobné, že hexamery jsou v R6 konformaci nebo v T3R3 konformaci v krystalech a precipitátech vytvořených v přítomnosti hexamer stabilizující sloučeniny, jako je mezi jinými fenol nebo m-kresol. Je vhodné široké spektrum hexamer stabilizujících sloučenin. Tyto sloučeniny musí být přítomny v dostatečných poměrech vzhledem k celkovému proteinu, aby stabilizovaly R6 hexamerovou konformaci. K tomu jsou požadovány alespoň 2 nebo alespoň 3 moly hexamer stabilizující sloučeniny na hexamer pro účinnou stabilizaci hexamerů. Je výhodný aby alespoň 3 moly hexamer stabilizující sloučenina na hexamer byly přítomny v mikrokrystalech a precipitátech podle předloženého vynálezu. Přítomnost vyšších poměrů hexamer stabilizující sloučeniny, alespoň až do 25 až 50-násobku, v roztoku, ze kterého se vytvářejí mikrokrystaly a precipitáty, neovlivňuje nepříznivě stabilizaci hexamerů.

V přípravcích podle předloženého vynálezu může být přítomno konzervační činidlo, obzvláště jestliže je přípravek zamýšlen pro několikanásobné použití. Jak bylo uvedeno výše, je známa široká řada konzervačních činidel. Výhodně je konzervační činidlo přítomno v roztoku v množství vhodném pro zajištění antimikrobiálního účinku dostatečného pro

splnění farmakologických požadavků.

Výhodná konzervační činidla jsou fenolová konzervační činidla, která byla vyjmenována výše. Výhodné koncentrace fenolových konzervačních činidel jsou od zhruba 2 mg do zhruba 5 mg na jeden mililitr vodného suspenzního přípravku. Tyto koncentrace se vztahují k celkové hmotnosti fenolových konzervačních činidel, neboť jsou předpokládány i směsi jednotlivých fenolových konzervačních činidel. Vhodná fenolová konzervační činidla zahrnují například fenol, m-kresol a metylparaben. Výhodné fenolové sloučeniny jsou fenol a m-kresol. Směsi fenolových sloučenin, jako jsou fenol a m-kresol, jsou také uvažovány a jsou vysoce výhodné. Příklady směsí fenolových sloučenin jsou 0,6 mg/ml fenolu a 1,6 mg/ml m-kresolu nebo 0,7 mg/ml fenolu a 1,8 mg/ml m-kresolu.

Mikrokrystaly podle předloženého vynálezu jsou výhodně podlouhlé, také nazývané "tyčinkovité", jednotlivé krystaly, které se skládají z proteinu, derivatizovaného proteinu, divalentního kationtu a zahrnují komplexující sloučeninu a hexamer-stabilizující sloučeninu. Střední délka mikrokrystalů podle předloženého vynálezu je výhodně v rozmezí velikosti od 1 mikronu do 40 mikronů a výhodněji v rozmezí velikosti od 3 mikronů to 15 mikronů.

Výhodné kompozice obsahují zhruba 3 mg až zhruba 6 mg protaminsulfátu na 35 mg celkového proteinu a od zhruba 0,1 do zhruba 0,4 mg zinku na 35 mg celkového proteinu. Jiné výhodné kompozice obsahují od zhruba 10 mg do zhruba 17 mg protaminsulfátu 35 mg celkového proteinu a od zhruba 2,0 do

zhruba 2,5 mg zinku na 35 mg celkového proteinu. Jiné výhodné kompozice obsahují na jeden ml 0,34-0,38 mg protaminsulfátu; 0,01-0,04 mg zinku; a 3,2-3,8 mg celkového proteinu.

Jak nederivatizovaný protein, tak i derivatizovaný protein jsou nutné pro kokrystaly a amorfni precipitáty podle vynálezu. Poměr hmotností těchto dvou proteinů určuje velikost časového prodloužení přípravků. Výhodný poměr počtu molů proteinu k počtu molů derivatizovaného proteinu je v rozmezí mezi zhruba 1:100 a zhruba 100:1. Další výhodný poměr počtu molů proteinu k počtu molů derivatizovaného proteinu je v rozmezí mezi zhruba 1:1 a zhruba 100:1. Jiný výhodný poměr počtu molů proteinu k počtu molů derivatizovaného proteinu je v rozmezí mezi zhruba 1:1 a zhruba 20:1. Ještě další výhodné poměry počtu molů proteinu k počtu molů derivatizovaného proteinu: v rozmezí mezi zhruba 2:1 a zhruba 20:1; v rozmezí mezi zhruba 2:1 a 10:1; v rozmezí mezi zhruba 2:1 a 5:1; v rozmezí mezi zhruba 3:1 a 5:1; mezi 1:1 a 1:20; mezi 1:1 a 1:10; v rozmezí mezi zhruba 1:2 a zhruba 1:20; v rozmezí mezi zhruba 1:2 a 1:10; v rozmezí mezi zhruba 1:2 a 1:5; v rozmezí mezi zhruba 1:3 a 1:5; v rozmezí mezi zhruba 10:1 a zhruba 1:10; v rozmezí mezi zhruba 9:1 a zhruba 1:9; v rozmezí mezi zhruba 5 :1 a zhruba 1:5; a v rozmezí mezi zhruba 3 :1 a zhruba 1:3.

Předložený vynález se týká způsobů přípravy kompozic. Předpokládá se také použití nerozpustných kompozic podle vynálezu pro přípravu léčiv pro kontrolu hladiny glukózy v krvi a pro léčení diabetu nebo hyperglykémie. Amorfni precipitáty a mikrokristaly podle předloženého vynálezu

mohou být připraveny pro použití v léčivech nebo pro další použití řadou různých způsobů.

Souhrnně řečeno, vhodné způsoby obecně sestávají z kroků v jedné z následujících posloupností: solubilizace (pokud se vychází ze suchého materiálu), hexamerizace, homogenizace, komplexace, precipitace, krystalizace a popřípadě příprava; nebo solubilizace (pokud se vychází ze suchého materiálu), homogenizace, hexamerizace, komplexace, precipitace, krystalizace a popřípadě příprava.

Solubilizace znamená rozpuštění derivatizovaného proteinu a proteinu dostatečným způsobem, aby mohly vytvářet hexamery. Hexamerizace se vztahuje k procesu, ve kterém molekuly proteinu a derivatizovaného proteinu se váží s dvojmocnými atomy zinku a vytvářejí hexamery. Komplexace označuje vytváření nerozpustných komplexů mezi hexamery a protaminem. K precipitace dochází typicky při vytváření nerozpustných komplexů. Krystalizace zahrnuje přeměnu precipitovaných komplexů hexamerů a protaminu na krystaly, kterými jsou typicky tyčinkovité krystaly.

Solubilizace se provádí rozpuštěním derivatizovaného proteinu a proteinu ve vodném rozpouštědle. Vodné rozpouštědlo může být například kyselý roztok, neutrální roztok nebo bazický roztok. Vodné rozpouštědlo může částečně obsahovat vodou mísitelné organické rozpouštědlo, jako je ethanol, acetonitril, dimethylsulfoxid a podobně. Kyselé roztoky mohou být například roztoky HCl, výhodně od zhruba 0,01 N HCl do zhruba 1,0 N HCl. Další kyseliny, které jsou farmaceuticky přijatelné, mohou být použity také. Bazické

roztoky mohou být například roztoky NaOH, výhodně od zhruba 0,01 N NaOH do zhruba 1,0 N NaOH nebo výše. Další báze, které jsou farmaceuticky přijatelné, mohou být použity také. Z důvodů stability protein je koncentrace kyseliny nebo báze výhodně tak nízká, jak je možné, zatímco je stále ještě účinná pro dostatečné rozpuštění proteinu a derivatizovaného proteinu.

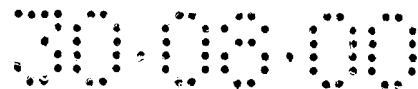
Většina proteinů (inzulín, inzulínové analogy a proinzulíny) a mnoho derivatizovaných proteinů může být rozpuštěna do vhodné koncentrace při neutrálním pH. Roztoky pro derivatizované proteiny při neutrálním pH může obsahovat pufr a popřípadě jeden nebo více dodatečných činidel jako jsou fenolové sloučeniny, zinek a isotonická činidla.

Pokud k hexamerizaci dochází před homogenizací, dvě populace homogenních hexamerů jsou vytvořeny nejdříve a potom se populace smíchají, čímž se vytvoří smíšené hexamery. Pokud jako první nastává homogenizace, hexamerizace dává hybridní hexamery. Jak bylo uvedeno výše, pro přípravu nerozpustných kompozice sestávajících z hybridních hexamerů se protein a derivatizovaný protein homogenizují za podmínek napomáhajících disociaci na monomerní nebo dimerní agregační stavy před hexamerizací s divalentním kationtem kovu. Pro dosažení potřebné disociace mohou protein a derivatizovaný protein být smíseny za silně kyselých nebo silně zásadických podmínek. Stupeň disociace a tím i stupeň homogenizace je ovlivněn podmínkami v roztoku, zvolenými pro tento krok. Inzulín a příbuzné proteiny se snadno samoasociují v sérii reakcí produkujících dimery, hexamery a další asociované formy. Rovnovážná distribuce těchto asociačních forem je

závislá na mnoha parametrech včetně pH. Obecně se předpokládá, že tyto asociační reakce zahrnují primární soustavu monomer-dimer-hexamer. V důsledku toho, v závislosti na zvolených podmínkách v roztoku, homogenizace by měla dosáhnout smíchání monomerů, dimerů nebo jejich směsí. Homogenizace například v 1 N HCl, může zahrnovat vyšší frakce monomerních směsí než v 0,1 N HCl, což by pravděpodobně zahrnulo více dimerních směsí. Pro přípravu kompozic sestávajících z hybridních hexamerů bude homogenizační proces účinný za předpokladu, že pouze velmi malá nebo zanedbatelná frakce homogenních hexamerů proteinu nebo derivatizovaného proteinu existuje za použitých homogenizačních podmínek.

Kompozice sestávající ze smíšených hexamerů zahrnují predominantně dva typy hexamerů a to hexamery proteinu a hexamery derivatizovaného proteinu. V tomto případě homogenizační krok nastává po hexamerizačním kroku a dosahuje homogenizace hexamerů před provedením komplexace s komplexující sloučeninou. Následkem toho je homogenizační krok prováděn za podmínek v roztoku, které stabilizují hexamer dvojmocného zinku a inzulínu. Podmínky v roztoku, které stabilizují hexamery inzulínu jsou dobře známy v literatuře.

Podmínky v roztoku požadované pro hexamerizaci jsou takové podmínky, které umožňují vytváření hybridních hexamerů nebo smíšených hexamerů v roztoku. Tyto podmínky budou identické nebo velmi podobné podmínkách, za kterých inzulín nebo inzulínové analogy jsou hexamerizovatelné. Typicky hexamerizace vyžaduje zinek a neutrální až mírně zásadité pH,



což znamená od zhruba pH 6,8 do zhruba pH 8,4. Přítomnost hexamer-stabilizující sloučeniny příznivě ovlivňuje hexamerizaci podporou vytváření konformací R6 nebo T3R3 derivatizovaného proteinu a za jistých okolností také proteinu. U jistých monomerních inzulínových analogů je hexamer-stabilizující sloučenina nutná pro vytváření hexamerů.

U kompozic sestávajících z hybridní hexamerů je možno očekávat sedm hexamerních druhů:  $P_6$ ,  $P_5D_1$ ,  $P_4D_2$ ,  $P_3D_3$ ,  $P_2D_4$ ,  $P_1D_5$  a  $D_6$ , kde P představuje monomer proteinu a D představuje monomer derivatizovaného proteinu. Očekává se, že statistické rozložení hexamerů vyhovuje Poissonovu rozložení a je ovlivněno relativním poměrem proteinu a derivatizovaného proteinu a stupněm disociace před hexamerizací. Například z homogenizovaného roztoku sestávajícího predominantně z dimerů lze očekávat vytvoření čtyř hlavních druhů hybridních hexamerů:  $P_6$ ,  $P_4D_2$ ,  $P_2D_4$  a  $D_6$ . U kompozic sestávajících ze smíšených hexamerů se očekává, že pouze dva druhy hexamerů budou predominantní:  $P_6$  a  $D_6$ .

Komplexační krok musí zahrnovat kombinaci komplexující sloučeniny s hexamerem za podmínek v roztoku, za kterých jsou tyto látky rozpustné. Toho může být dosaženo kombinací oddělených roztoků hexamerů a protaminu nebo nejprve vytvořením roztoku proteinu, derivatizovaného proteinu a protaminu při kyselém nebo zásadickém pH a potom posunutím pH do neutrální oblasti.

V průběhu krystalizace musí podmínky v roztoku stabilizovat krystalizující druhy a napomáhat přeměně precipitátu na

krystal. Podmínky v roztoku tedy určují rychlost a výsledný produkt krystalizace. Krystalizace obvykle zahrnuje komplexní ekvilibrium, sestávající z nekystalického precipitátu, rozpuštěných komplexů hexamer-protamin a krystalů. Pro získání mikrokystalů musí být krystalizační podmínky voleny tak, aby vedly ekvilibrium k vytváření krystalů. Kromě toho, při pohledu založeném na předpokládaném ekvilibriu, se předpokládá, že rozpustnost derivatizovaného proteinu hluboce ovlivňuje rychlost krystalizace a velikost krystalů, neboť nižší rozpustnost pravděpodobně sníží čistou přeměnu precipitátu z roztoku na krystal. Dále je dobře známo, že zpomalení rychlosti krystalizace často vede k vytváření větších krystalů. Proto se předpokládá, že rychlost krystalizace a velikost krystalů závisí na velikosti a povaze derivatizační součásti derivatizovaného proteinu.

Krystalizační parametry, které ovlivňují rychlost krystalizace a velikost krystalů podle předloženého vynálezu jsou: velikost a povaha acylové skupiny; teplota; přítomnost a koncentrace sloučenin, které jsou v kompetici s proteinem a derivatizovaným proteinem o zinek, jako jsou citrát, fosfát a podobně; povaha a koncentrace fenolové sloučeniny nebo sloučenin; koncentrace zinku; přítomnost a koncentrace vodou mísitelných organických rozpouštědel; doba dovolená pro krystalizaci; pH a ionická síla; povaha a koncentrace pufru; koncentrace precipitantů; přítomnost očkujících materiálů; tvar a materiál nádoby; rychlost míchání; a celková koncentrace proteinu. Teplota a koncentrace sloučenin v kompetici o zinek jsou považovány za obzvláště důležité.

Sloučenin v kompetici o zinek, jako je citrát, mohou ovlivnit rychlost vytváření krystalů a nepřímo velikost a kvalitu krystalů.

Tyto sloučeniny mohou projevovat svůj účinek vytvářením koordinačních komplexů se zinkem v roztoku, čímž se dostávají do kompetice s relativně slabými vazebnými místy pro zinek na povrchu hexamerů se zinkem. Obsazení těchto slabých povrchových vazebných míst pravděpodobně zabrání krystalizaci. Kromě toho je mnoho derivatizovaných proteinů částečně nerozpustných v přítomnosti o málo více než 0,333 zinku na jeden mol derivatizovaného proteinu a přítomnost sloučenin v kompetici obnovuje rozpustnost a dovoluje krystalizaci. Optimální koncentrace sloučenin v kompetici může být určena použitím obvyklých technik pro libovolnou kombinaci proteinu a derivatizovaného proteinu. Horní mezí je pochopitelně koncentrace, při které je zinek precipitován sloučeninou v kompetici nebo koncentrace při které by byla reziduální sloučenina v kompetici farmaceuticky nepřijatelný, jako například když by vyvolávala bolest nebo podráždění v místě podávání.

Následuje příklad způsob přípravy precipitátů a krystalů podle předloženého vynálezu. Měřené množství derivatizovaného proteinu a měřené množství proteinu se rozpuštěn nebo jsou jinak kombinovány, aby vytvořily roztok ve vodném rozpouštědle, obsahující hexamer-stabilizující sloučeninu, jako je například fenolová sloučenina. Do tohoto roztoku se přidá roztok zinku ve formě jeho rozpustných solí, například  $ZnCl_2$ , pro získání zhruba 0,3 molů zinku na

jeden mol derivatizovaného inzulínu nebo až do zhruba 0,7 molů nebo až 1,0 molů zinku na jeden mol celkového proteinu (protein + derivatizovaný protein). Absolutní ethanol nebo jiné mísitelné organické rozpouštědlo může být popřípadě přidán do tohoto roztoku v množství nutném k tomu, aby roztok obsahoval zhruba 5% až zhruba 10% obj. organického rozpouštědla. Tento roztok potom může být filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Protaminový roztok se připraví rozpuštěním odměřeného množství protaminu ve vodném rozpouštědle. Tento roztok může být filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Roztok proteinu a derivatizovaného proteinu a protaminový roztok jsou kombinovány, poté se nejprve vytvoří precipitát. Výsledná suspenze se pomalu míchá při teplotě okolí (typicky zhruba 20-25 °C) a poté se mikrokrystaly vytvoří v průběhu doby od zhruba 4 hodin do zhruba 10 dní.

Mikrokrystaly mohou potom být separovány z matečné tekutiny a vloženy do odlišného rozpouštědla pro uchování a podávání pacientovi. Příklady vhodných vodných rozpouštědel jsou následující: voda pro injekce obsahující 25 mM TRIS, 5 mg/ml fenolu a 16 mg/ml glycerolu; voda pro injekce obsahující 2 mg/ml dibázického fosforečnanu sodného, 1,6 mg/ml m-kresolu, 0,65 mg/ml fenolu a 16 mg/ml glycerolu; a voda pro injekce obsahující 25 mM TRIS, 5 mg/ml fenolu, 0,1 M citrátu sodného a 16 mg/ml glycerolu.

V jiném způsobu přípravy nerozpustných kompozic podle předloženého vynálezu se například odměřené množství suchého derivatizovaného proteinu a odměřené množství suchého

proteinu rozpustí společně v kyselém vodném rozpouštědle jako je 0,1 N - 1,0 N HCl. Tento roztok se míchá pro zajištění důkladného promíchání derivatizovaného proteinu a proteinu. Poměr prášku derivatizovaného proteinu k prášku proteinu v této směsi směs je předem definována pro dosažení podobného poměru derivatizovaného proteinu k proteinu v nerozpustné kompozici, která má být vytvořena. Odděleně připravený vodný roztok sestávající z fenolového konzervačního činidla a popřípadě z farmaceuticky přijatelného pufru se zkombinuje s kyselým roztokem proteinů. pH výsledného roztoku se potom upraví na zhruba 6,8 až zhruba 8,4, výhodně od zhruba 6,8 do zhruba 8,0, nebo výhodně na pH od zhruba 7,2 do zhruba 7,8 a nejvýhodněji od zhruba 7,4 do zhruba 7,8. Do tohoto roztoku se přidá roztok zinku ve formě jeho rozpustné soli, například  $ZnCl_2$ , pro dodání zhruba od 0,3 molů zinku na jeden mol celkového inzulínu až do zhruba 4 molů zinku na jeden mol celkového inzulínu. pH tohoto roztoku se upraví na hodnotu uvedenou výše a výhodně na zhruba 7,4 - 7,6 a může potom být filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Roztok protaminu se připraví rozpuštěním odměřené množství protaminu ve vodném rozpouštědle. Protaminový roztok může být filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Roztok proteinu a derivatizovaného proteinu a protaminový roztok se spojí a poté se začne vytvářet precipitát. Výsledná suspenze se pomalu míchá při teplotě okolí (typicky zhruba 20-25 °C), poté se mikrokrystaly vytváří v průběhu periody zhruba 4 hodiny až zhruba 10 dní.

V jiném způsobu přípravy nerozpustných kompozic podle

předloženého vynálezu se odměřené množství derivatizovaného proteinu nejprve rozpustí ve vodném rozpouštědle obsahující fenolové konzervační činidlo. Do tohoto roztoku se přidá roztok zinku ve formě jeho rozpustné soli, například  $ZnCl_2$ , pro dodání zhruba 0,3 molů zinku na jeden mol derivatizovaného proteinu až do zhruba 4 molů zinku na jeden mol derivatizovaného proteinu. pH výsledného roztoku se potom upraví na hodnotu zhruba 6,8 až zhruba 8,4, výhodně od zhruba 6,8 do zhruba 8,0, nebo výhodně na pH od zhruba 7,2 do zhruba 7,8 a nejvýhodněji od zhruba 7,4 do zhruba 7,8. Druhý roztok se připraví odděleně, přičemž odměřené množství proteinu zvoleného ze souboru, zahrnujícího inzulin, inzulinové analogy a proinzulin, se rozpustí ve vodném rozpouštědle obsahující fenolové konzervační činidlo. Do tohoto roztoku se přidá roztok zinku ve formě jeho rozpustné soli, například  $ZnCl_2$ , pro dodání od zhruba 0,3 molů zinku na jeden mol proteinu do zhruba 4 molů zinku na jeden mol proteinu. pH výsledného roztoku se potom upraví na hodnotu zhruba 6,8 do zhruba 8,4, výhodně od zhruba 6,8 do zhruba 8,0, nebo výhodně na pH od zhruba 7,2 do zhruba 7,8 a nejvýhodněji od zhruba 7,4 do zhruba 7,8 nebo 7,4 - 7,6. Části roztoku derivatizovaného proteinu a roztoku proteinu se potom spojí v poměru, který je předdefinován pro dosažení podobného poměru derivatizovaného proteinu k proteinu v nerozpustné kompozici. Tento roztok se míchá pro zajištění důkladného smíchání derivatizovaného proteinu a proteinu. Tento roztok se potom upraví na hodnotu pH zhruba 7,6 a může potom být filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Protaminový roztok se připraví odděleně rozpuštěním odměřené množství protaminu ve vodném rozpouštědle. Tento protaminový roztok může být filtrován

přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Roztok proteinu a derivatizovaného proteinu a protaminový roztok se spojí a poté dochází k iniciálnímu vytváření precipitát. Výsledná suspenze se pomalu míchá při teplotě okolí (typicky zhruba 20-25 °C) a poté se vytváří mikrokrystaly v průběhu periody od zhruba 4 hodin do zhruba 10 dní.

I když nebudou popsány všechny z velkého množství způsobů, které vedou na přípravu nerozpustných kompozic podle předloženého vynálezu, následující postupy podávají další způsoby podle předloženého vynálezu:

- rozpuštění proteinu, derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, které má pH umožňující vytváření hexamerů a přidání komplexující sloučeniny;
- rozpuštění proteinu, derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, které má pH, které neumožňuje vytváření hexamerů, úprava pH na hodnotu v rozmezí mezi zhruba 6,8 a zhruba 7,8 a přidání komplexující sloučeniny;
- rozpuštění proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, které má pH umožňující vytváření hexamerů, odděleně rozpuštění derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, které má pH umožňující vytváření hexamerů, důkladné míchání těchto dvou roztoků navzájem a potom přidání komplexující sloučeniny;
- rozpuštění proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny, divalentního kationtu kovu a komplexující sloučeniny ve

vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH, při kterém nenastává precipitace, oddělené rozpuštění derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny, divalentního kationtu kovu a komplexující sloučeniny ve vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH, při kterém nenastává precipitace, důkladné míchání těchto dvou roztoků navzájem a úprava hodnoty pH roztoku na hodnotu, při které nastává precipitace;

rozpuštění proteinu, derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny, divalentního kationtu kovu a komplexující sloučeniny ve vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH, při kterém nenastává precipitace a úprava hodnoty pH roztoku na hodnotu, při které nastává precipitace;

rozpuštění proteinu, derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH při kterém nedochází k precipitaci, pokud je přidáno komplexující činidlo, přidání komplexující sloučeniny a úprava hodnoty pH roztoku z kroku b) na hodnotu, při které nastává precipitace;

rozpuštění proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, přičemž výsledný roztok má pH při kterém nenastává precipitace, pokud je přidána komplexující sloučenina, oddělené rozpuštění derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, přičemž výsledný roztok má pH při kterém nenastává precipitace, pokud je přidána komplexující sloučenina, důkladné míchání těchto dvou roztoků navzájem, přidání komplexující sloučeniny do roztoku a úprava pH na

hodnotu při které nastává precipitace;  
rozpuštění proteinu, proteinového derivátu, hexamer-  
stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve  
vodném rozpouštědle, přičemž výsledný roztok má pH při  
kterém nenastává precipitace, pokud je přidána komplexující  
sloučenina, úprava hodnoty pH roztoku na hodnotu, při které  
dojde k precipitaci, pokud je přidána komplexující  
sloučenina a přidání komplexující sloučeniny do roztoku;  
rozpuštění proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a  
divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, přičemž  
výsledný roztok má pH při kterém nenastává precipitace,  
pokud je přidána komplexující sloučenina, oddělené  
rozpuštění derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující  
sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném  
rozpuštědle, přičemž výsledný roztok má pH při kterém  
nenastává precipitace, pokud je přidána komplexující  
sloučenina; důkladné míchání těchto dvou roztoků navzájem,  
úprava hodnoty pH roztoku z kroku c) na hodnotu, při které  
dojde k precipitaci, pokud je přidána komplexující  
sloučenina a přidání komplexující sloučeniny do roztoku;

Ve výhodném provedení se mikrokrystaly připraví způsobem,  
který odstraňuje potřebu separace mikrokrystalů z matečné  
tekutiny. Je výhodné, aby matečná tekutina sama byla vhodná  
pro podávání pacientovi nebo aby matečná tekutina mohla být  
upravena na tekutinu vhodnou pro podávání zředěním vhodným  
ředidlem. Výraz ředidlo přitom znamená roztok obsahující  
vodné rozpouštědlo, ve kterém jsou rozpuštěny různé  
farmaceuticky přijatelné excipienty, v to počítaje  
neomezujícím způsobem pufr, isotonické činidlo, zinek,  
konzervační činidlo, protamin a podobně.

Kromě proteinu, derivatizovaného proteinu, divalentního kationtu, komplexující sloučeniny a hexamer-stabilizující sloučeniny, mohou farmaceutické kompozice upravené pro parenterální podávání podle předloženého vynálezu zahrnovat dodatečné excipienty a nosiče jako jsou s vodou mísitelná organická rozpouštědla jako je glycerol, sezamový olej, vodný propylenglykol a podobně. Pokud jsou přítomna, taková činidla jsou obvykle použita v množství méně než zhruba 2,0% hmot., vztaženo k výslednému přípravku. Pro další informaci o množství technik používajících konvenčních excipientů nebo nosičů pro parenterální produkty, se uvádí monografie Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. vydání, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA (1985), která je zde zahrnuta jako reference.

V obecném použití předloženého vynálezu se také předpokládá, že přípravek může obsahovat směs mikrokryсталů a rozpustné frakce proteinu, zvolené ze souboru, zahrnujícího inzulín, derivatizovaný inzulín, inzulínové analogy a derivatizované inzulínové analogy. Příklady takových farmaceutických kompozice zahrnují sterilní, isotonické, vodné solné roztoky inzulínu, inzulínového analogu, derivatizovaného inzulínu nebo derivatizovaného inzulínového analogu, pufované farmaceuticky přijatelným puforem a nepyrogeční. Výhodné rozpustný fáze jsou inzulín nebo rychle působící inzulínový analog jako je LysB28,ProB29-lidský inzulín nebo AspB28-lidský inzulín. Takové směsi jsou určeny pro poskytnutí kombinace kontroly hladiny glukózy v době jídla, která je zajištěna rozpustným inzulínem a bazální kontrolu hladiny glukózy, která je zajištěna nerozpustným inzulínem. Poměr

celkového proteinu (protein plus derivatizovaný protein) v nerozpustné fázi a celkového proteinu v rozpustné fázi je v rozmezí od zhruba 9:1 do zhruba 1:9. Výhodné rozmezí tohoto poměru je od zhruba 9:1 do zhruba 1:1 a výhodněji zhruba 7:3. Další možné poměry jsou 1:1 a 3:7.

### Příklady provedení vynálezu

Následující přípravy a příklady ilustrují a vysvětlují předložený vynález. Rozsah předmětu předloženého vynálezu není omezen těmito přípravami a příklady. Reference na "část" u pevných látek znamená hmotnostní část. Reference na "části" pro kapaliny znamená objemové části. Procenta, pokud jsou používána pro vyjádření koncentrací, znamenají hmotnost na jednotku objemu ( $\times 100$ ). Všechny teploty jsou uváděny ve stupních Celsia ( $^{\circ}\text{C}$ ). "TRIS" se vztahuje k 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiolu. 1000 částí na milion (part-per-million - ppm) zinkového roztoku bylo připraveno zředěním 1,00 ml 10000 ppm zinkového atomického absorpčního standardního roztoku [Ricca Chemical Company, zinek ve zředěné kyselině dusičné] vodou na konečný objem 10,00 ml.

V mnoha přípravách uvedených dále byl odhadnut výtěžek precipitátů a krystalů. Odhad výtěžku se vztahuje k určení množství celkového proteinu v precipitátu nebo krystalech a v odhadu množství proteinu, který byl na počátku v roztoku. Pro určení množství celkového proteinu byly vzorky opětně rozpuštěného precipitátu nebo krystalů a supernatantu nad precipitátem nebo krystaly analyzovány gradientovou HPLC s obrácenými fázemi, jak je popsáno dále.

Stručně řečeno analytický systém spočívá na CS koloně s obrácenými fázemi při teplotě 23 °C. Průtok byl 1,0 ml/min a UV detekce byla prováděna při vlnové délce 214 nm. Rozpouštědlo A byla 0,1% (obj.:obj.) trifluoroctová kyselina ve směsi 10:90 (obj.:obj.) acetonitril:voda. Rozpouštědlo B byla 0,1% (obj.:obj.) trifluoroctová kyselina ve směsi 90:10 (obj.:obj.) acetonitril:voda. Vydávající program byl (minuty, %B): (0,1; 0); (45,1;75); (50,1;100); (55;100); (57;0); (72;0). Všechny změny byly lineární. Odborník může pro dosažení stejného cíle použít i jiné analytické systémy.

Pro přípravu HPLC analýzy byly alikvoty dobře promíchané suspenze rozpuštěny zředěním buď 0,01 N HCl nebo 0,03 N HCl. Výsledky HPLC analýzy těchto roztoků dovozovaly výpočet celkového proteinu. Alikvoty suspenzí byly centrifugovány po přibližně 5 minut v Eppendorfově 5415C mikrocentrifuze při 14,000 otáčkách za minutu. Usazený supernatant byl zředěn buď 0,01 N nebo 0,1 N HCl a analyzován pomocí HPLC. Precipitát byl promýván resuspendováním v Dulbecco fosforečnanem pufovaném solném roztoku (bez obsahu vápníku nebo hořčíku) a repeletováním centrifugací. Pufra byl dekantován a pevná látka byla znovu rozpuštěna v 0,01 N HCl. Znovu rozpuštěný precipitát byl analyzován pomocí HPLC.

HPLC byla používána pro potvrzení přítomnosti očekávaných proteinů v okyselené suspenzi, znovu rozpuštěném precipitátu a supernatantu a také pro určení proteinových koncentrací. Retenční doby píků v chromatogramech znovu rozpuštěných precipitátů byly porovnávány s retenčními dobami pozorovanými pro protamin a aktivní sloučeniny použité pro výrobu přípravků. Souhlas retenčních časů byl vždy dobrý,

což dokazovalo, že protamin, protein a derivatizované proteiny byly skutečně zabudovány do mikrokrytalů. Koncentrace proteinu a derivatizovaného proteinu byly určeny porovnáním odpovídajících ploch píků se standardy. 0,22 mg/ml roztok derivatizovaného inzulínu byl používán jako standard. Standard obsahující protamin byl také použit, ale pouze pro určení retenční doby. Protaminové koncentrace nebyly určovány.

V mnoha dále popsaných přípravách byl použit standardní spektrofotometrický test pro určení, jak rychle se krystaly rozpouští v Dulbecco fosforečnanem pufovaném solném roztoku (pH 7,4) při teplotě okolí. Významné odchylky od procedury popsané bezprostředně dále jsou uvedeny, pokud je to nutné, v popisu jednotlivých příprav. Spektrofotometr vhodný pro měření v ultrafialové oblasti a vybavený 1 cm kyvetou a magnetickým míchačem byl použit ve všech testech rozpouštění. Kyveta, obsahující malou míchací tyčinku a 3,00 ml fosforečnanem pufovaného solného roztoku (PBS), byla umístěna do oddílu spektrofotometru. Přístroj byl nastaven na 320 nm a vynulován proti samotnému pufru. Potom bylo 4,0 mikrolitrů dobře suspendovaného přípravku, obvykle obsahujícího koncentraci přibližně ekvivalentní U50 přípravku nebo zhruba 1,6 až 1,8 mg/ml, přidáno do kyvety. Po čekání 1,0 minuty na zamíchání byla zaznamenávána optická hustota na 320 nm. Jelikož proteiny uváděné v této práci neabsorbují světlo pro 320 nm, pokles optické hustoty byl způsobem snížením rozptylu světla, jak se krystaly rozpouštěly. Obvykle je udávána doba, za kterou optická hustota poklesne na polovinu své výchozí hodnoty ( $t_{1/2}$ ). Jako kontrola bylo přidáno 2,0 mikrolitrů U100 Humulinu N (to

jest lidský inzulin NPH, který je také znám jako lidský NPH inzulin) do 3,00 ml PBS pufru a optická hustota při 320 nm byla monitorována výše uvedeným způsobem. Poločas rozpouštění ( $t_{1/2}$ ) pro přípravek Humulin® byl zhruba 6 minut.

#### Příprava 1

9:1 kokrystaly lidského inzulinu a B29-Nε-oktanoyl- lidského inzulinu

Suchý prášek B29-Nε-oktanoyl-Lys829 lidského inzulinu (0,7 hmotnostních dílů) a suchý prášek lidského inzulinu (6,3 hmotnostních dílů) byly rozpuštěny v 1000 částech obj. vodného rozpouštědla, sestávajícího z 50 mM TRIS, 0,1 M citrátu sodného a 10 mg/ml fenolu při pH 7,6. Do tohoto roztoku bylo přidáno 75 částí 15,3 mM roztoku chloridu zinečnatého. pH bylo upraveno na hodnotu 7,6 pomocí 1 N HCl a/nebo 1 N NaOH. Tento roztok byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Druhý roztok byl připraven rozpuštěním 7 hmotnostních dílů protaminsulfátu v 10000 objemových částech vody a potom filtrací přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Byly spojeny stejné objemy roztoku obsahujícího inzulin a acylovaný inzulin a protaminsulfátového roztoku. Na počátku se vytvářel amorfni precipitát. Tato suspenze byla ponechána v klidu zhruba 24 hodin při teplotě okolí (typicky zhruba 22 °C). Amorfni precipitát se přeměnil na kokrystalickou mikrokrystalickou pevnou látku.

#### Příprava 2

3:1 kokrystaly lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu

Způsob podle Přípravy 1 byl opakován, avšak bylo použito 1,75 hmotnostních dílů suchého prášku B29-Nε-oktanoyl-LysB29 lidského inzulínu a 5,25 hmotnostních dílů suchého prášku lidského inzulínu. Po spojení stejných objemů roztoku obsahujícího inzulín a acylovaný inzulín a protaminsulfátového roztoku se vytvářel amorfni precipitát. Tato suspenze byla ponechána v klidu zhruba 24 hodin při teplotě okolí (typicky zhruba 22 °C). Amorfni precipitát se přeměnil na kokrystalickou mikrokrystalickou pevnou látku.

#### Příprava 3

Přípravek 3:1 kokrystalů lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu

Kokrystalické mikrokrystaly, které byly připraveny způsobem podle Přípravy 1 byly separovány od supernatantu a byly získány konvenčními separačními způsoby v pevné a kapalně fázi, jako jsou filtrace, centrifugace nebo usazování. Získané kokrystalické mikrokrystaly byly potom suspendovány v roztoku obsahujícím 25 mM TRIS, 5 mg/ml fenolu a 16 mg/ml glycerolu, pH 7,8, takže výsledná koncentrace inzulínové aktivity byla zhruba 100 U/ml.

#### Příprava 4

1:1 kokrystaly lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu

Způsob podle Přípravy 1 byl opakován, avšak bylo použito 3,5

hmotnostních dílů suchého prášku B29-Nε-oktanoyl-LysB29 lidského inzulínu a 3,5 hmotnostních dílů suchého prášku lidského inzulínu. Po smíchání stejných dílů roztoku obsahujícího inzulín a acylovaný inzulín a protaminsulfátového roztoku se vytvořil amorfni precipitát. Tato suspenze byla ponechána v klidu zhruba 24 hodin při teplotě okolí (typicky zhruba 22 °C). Amorfni precipitát se přeměnil na kokrystalickou mikrokrystalickou pevnou látku.

#### Příprava 5

1:3 kokrystalaly lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu

Způsob podle Přípravy 1 byl opakován, avšak bylo použito 5,25 hmotnostních dílů suchého prášku B29-Nε-oktanoyl-LysB29 lidského inzulínu a 1,75 hmotnostních dílů suchého prášku lidského inzulínu. Po smíchání stejných dílů roztoku obsahujícího inzulín a acylovaný inzulín a protaminsulfátového roztoku se vytvořil amorfni precipitát. Tato suspenze byla ponechána v klidu zhruba 24 hodin při teplotě okolí (typicky zhruba 22 °C). Amorfni precipitát se přeměnil na kokrystalickou mikrokrystalickou pevnou látku.

#### Příprava 6

3:1 kokrystalaly lidského inzulínu a B29-Nε-hexanoyl-lidského inzulínu

Způsob podle Přípravy 1 byl opakován, avšak bylo použito 1,75 hmotnostních dílů suchého prášku B29-Nε-hexanoyl-LysB29 lidského inzulínu a 5,25 hmotnostních dílů suchého prášku lidského inzulínu. Po smíchání stejných dílů roztoku

obsahujícího inzulín a acylovaný inzulín a protaminsulfátového roztoku se vytvořil amorfni precipitát. Tato suspenze byla ponechána v klidu zhruba 24 hodin při teplotě okolí (typicky zhruba 22 °C). Amorfni precipitát se přeměnil na kokystalickou mikrokrystalickou pevnou látku.

#### Příprava 7

3:1 kokystalizace lidského inzulínu a B29-Nε-butyril-lidského inzulínu

Způsob podle Přípravy 1 byl opakován, avšak bylo použito 1,75 hmotnostních dílů suchého prášku B29-Nε-butyril-LysB29 lidského inzulínu a 5,25 hmotnostních dílů suchého prášku lidského inzulínu. Po smíchání stejných dílů roztoku obsahujícího inzulín a acylovaný inzulín a protaminsulfátového roztoku se vytvořil amorfni precipitát. Tato suspenze byla ponechána v klidu zhruba 24 hodin při teplotě okolí (typicky zhruba 22 °C). Amorfni precipitát se přeměnil na kokystalickou mikrokrystalickou pevnou látku.

#### Příprava 8

Kokystalické mikrokrystalizace protaminu, zinku, B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu a lidského inzulínu

B29-Nε-oktanoyl-LysB29 lidský inzulín (20,1 mg) byl rozpuštěn v 1 ml rozpouštědla sestávajícího z 0,1 N HCl. Lidský inzulín (19,3 mg) byl rozpuštěn v 1 ml rozpouštědla sestávajícího z

-073-

0,1 N HCl. Pět roztoků, obsahujících odlišné poměry B29-Nε-

oktanoyl-LysB29 lidského inzulinu k lidskému inzulinu byly připraven kombinováním objemů každého roztoku v poměrech uvedených níže.

Tabulka 3. Objemy roztoků lidského inzulinu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulinu, použité pro přípravu precipitátů a mikrokrystalů.

Objem (μl)	Poměr lidského inzulinu k acylovanému lidskému inzulinu				
	1:0	3:1	1:1	1:3	0:1
roztok lidského inzulinu	400	300	200	100	0
roztok B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulinu	0	100	200	300	400

Do každého z těchto pěti roztoků bylo přidáno 1,6 ml rozpouštědla sestávajícího z 50 mM TRIS pufru, 0,1 M citrátu sodného a 10 mg/ml fenolu při 7,6. Do každého z těchto pěti roztoků bylo přidáno 0,15 ml 15,3 mM roztoku chloridu zinečnatého. pH každého z výsledných pěti roztoků bylo upraveno na hodnotu 7,6 pomocí 1 N NaOH. Každý z výsledných pěti roztoků byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Dodatečný roztok byl připraven rozpouštěním 3,50 mg protaminsulfátu v 10 ml vody a potom filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Objem 1,3 ml každého z pěti roztoků a 1,9 ml protaminsulfátového roztoku byly zkombinovány, v každém z pěti roztoků došlo k okamžitému výskytu amorfního precipitátu. Těchto pět roztoků bylo ponecháno v klidu po 24 hodin při teplotě okolí (přibližně 22 °C). Tato procedura

vedla k vytváření bílé až bělavé mikrokrystalické pevné látky v každém z pěti roztoků.

#### Příprava 9

9:1 kokrystaly lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu

Suchý prášek B29-Nε-oktanoyl-LysB29 lidského inzulínu (0,7 hmotnostních dílů) byl rozpuštěn v 100 objemových částech vodného rozpouštědla, sestávajícího z 50 mM TRIS, 0,1 M citrátu sodného a 10 mg/ml fenolu při pH 7,6. Do tohoto roztoku bylo přidáno 7,5 částí 15,3 mM roztoku chloridu zinečnatého. Druhý roztok byl připraven tak, že suchý prášek lidského inzulínu (6,3 hmotnostních dílů) byl rozpuštěn v 900 objemových částech vodného rozpouštědla sestávajícího z 50 mM TRIS, 0,1 M citrátu sodného a 10 mg/ml fenolu při pH 7,6. Do tohoto roztoku bylo přidáno 67,5 částí 15,3 mM roztoku chloridu zinečnatého. Roztok acylovaného inzulínu a roztok inzulínu byly spolu zkombinovány a míchány pro zajištění smíchání obou roztoků. Tento roztok byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Protaminový roztok byl připraven rozpuštěním 7 hmotnostních dílů protaminsulfátu v 10,000 objemových částech vody a potom filtrováním přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Byly spojeny stejné objemy roztoku acylovaného inzulínu a protaminsulfátového roztoku. Vytvořil se amorfni precipitát. Tato suspenze byla ponechána v klidu zhruba 24 hodin při teplotě okolí (typicky zhruba 22 °C). Amorfni precipitát se přeměnil na kokrystalickou mikrokrystalickou pevnou látku.

#### Příprava 10

3:1 kokrystaly lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu

Suchý prášek B29-Nε-oktanoyl-LysB29 lidského inzulínu (1,75 hmotnostních dílů) byl rozpuštěn v 250 objemových částech vodného rozpouštědla sestávajícího z 50 mM TRIS, 0,1 M citrátu sodného a 10 mg/ml fenolu při pH 7,6. Do tohoto roztoku bylo přidáno 18,75 částí 15,3 mM roztoku chloridu zinečnatého. Druhý roztok byl připraven ze suchého prášku lidského inzulínu (5,25 hmotnostních dílů), který byl rozpuštěn v 750 objemových částech vodného rozpouštědla sestávajícího z 50 mM TRIS, 0,1 M citrátu sodného a 10 mg/ml fenolu při pH 7,6. Do tohoto roztoku bylo přidáno 56,25 částí 15,3 mM roztoku chloridu zinečnatého. Roztok acylovaného inzulínu a roztok inzulínu byly navzájem zkombinovány a míchány pro zajištění smíchání obou roztoků. Tento roztok byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Protaminový roztok byl připraven rozpuštěním 7 hmotnostních dílů protaminsulfátu v 10,000 objemových částech vody a potom filtrováním přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Byly zkombinovány stejné objemy roztoku acylovaného inzulínu a protaminsulfátového roztoku. Vytvořil se amorfni precipitát. Tato suspenze byla ponechána v klidu zhruba 24 hodin při teplotě okolí (typicky zhruba 22 °C). Amorfni precipitát se přeměnil na kokrystalickou mikrokrystalickou pevnou látku.

#### Příprava 11

1:1 kokrystaly lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu

Suchý prášek B29-Nε-oktanoyl-LysB29 lidského inzulínu (3,5 hmotnostních dílů) byl rozpuštěn v 500 objemových částech vodného rozpouštědla sestávajícího z 50 mM TRIS, 0,1 M citrátu sodného a 10 mg/ml fenolu při pH 7,6. Do tohoto roztoku bylo přidáno 1,75 částí 15,3 mM roztoku chloridu zinečnatého. Byl připraven druhý roztok, ve kterém suchý prášek lidského inzulínu (3,5 hmotnostních dílů) byl rozpuštěn v 500 objemových částech vodného rozpouštědla sestávajícího z 50 mM TRIS, 0,1 M citrátu sodného a 10 mg/ml fenolu při pH 7,6. Do tohoto roztoku bylo přidáno 37,5 částí 15,3 mM roztoku chloridu zinečnatého. Roztok acylovaného inzulínu a roztok inzulínu byly spolu zkombinovány a míchány pro zajištění smíchání obou roztoků. Tento roztok byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Protaminový roztok byl připraven rozpuštěním 7 hmotnostních dílů protaminsulfátu v 10,000 objemových částech vody a potom filtrováním přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Byly zkombinovány stejné objemy roztoku acylovaného inzulínu a protaminsulfátového roztoku. Vytvořil se amorfni precipitát. Tato suspenze byla ponechána v klidu po zhruba 24 hodin při teplotě okolí (typicky zhruba 22 °C). Amorfni precipitát se přeměnil na kokrystalickou mikrokrytalickou pevnou látku.

#### Příprava 12

1:3 kokrystalaly lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu

Suchý prášek B29-Nε-oktanoyl-LysB29 lidského inzulínu (5,25 hmotnostních dílů) byl rozpuštěn v 750 objemových částech

vodného rozpouštědla sestávajícího z 50 mM TRIS, 0,1 M citrátu sodného a 10 mg/ml fenolu při pH 7,6. Do tohoto roztoku bylo přidáno 56,25 částí 15,3 mM roztok chloridu zinečnatého. Byl připraven druhý roztok, ve kterém suchý prášek lidského inzulínu (1,75 hmotnostních dílů) byl rozpuštěn v 250 objemových částech vodného rozpouštědla sestávajícího z 50 mM TRIS, 0,1 M citrátu sodného a 10 mg/ml fenolu při pH 7,6. Do tohoto roztoku bylo přidáno 18,75 částí 15,3 mM roztoku chloridu zinečnatého. Roztok acylovaného inzulínu a roztok inzulínu byly spolu zkombinovány a míchány pro zajištění smíchání obou roztoků. Tento roztok byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Protaminový roztok byl připraven rozpuštěním 7 hmotnostních dílů protaminsulfátu v 10,000 objemových částech vody a potom filtrováním přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Byly zkombinovány stejné objemy roztok acylovaného inzulínu a protaminsulfátového roztoku. Vytvořil se amorfni precipitát. Tato suspenze byla ponechána v klidu zhruba 24 hodin při teplotě okolí (typicky zhruba 22 °C). Amorfni precipitát se přeměnil na kokrystalickou mikrokrystalickou pevnou látku.

### Příprava 13

Kokrystaly lidského inzulínu a B29-Nε-hexanoyl-lidského inzulínu

Kyselý roztok B29-Nε-hexanoyl-lidského inzulínu byl připraven rozpuštěním 12,3 mg B29-Nε-hexanoyl-lidského inzulínu v 0,3 ml 0,1 N HCl. Kyselý roztok lidského inzulínu byl připraven rozpuštěním 4,6 mg lidského inzulínu (zinkové krystaly) v 0,1 ml 0,1 N HCl. Oba roztoky byly spojeny na

celkový objem 0,4 ml. Tento výsledný roztok byl míchán po přibližně 5 minut. Do tohoto výsledného roztoku bylo za míchání přidáno 0,150 ml 1000 ppm roztoku dvojmocného zinku. Bylo připraveno krystalizační ředidlo obsahující 32 mg/ml glycerolu, 50 mM tris pufru, 10 mg/ml fenolu a 100 mM citrátu sodného při pH 7,6. Do roztok inzulínu bylo přidáno 1,6 ml krystalizačního ředidla. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,59 použitím 1 N NaOH a 1 N HCl. Roztok byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Protaminový roztok byl připraven rozpuštěním 7,47 mg protaminsulfátu v 10 ml vody. Dva mililitry (2 ml) protaminového roztoku byly přidány do 2 ml roztoku inzulínu. Výsledný roztok byl ponechán stát v klidu 18 hodin při řízené teplotě 25 °C.

Mikroskopická inspekce (po 18 hodinách) odhalila, že došlo ke krystalizaci a příprava dala stejnoměrně vytvořené jednotlivé tyčinkovité krystaly o střední délce přibližně 3 mikrony.

Čtyři mililitry (4 ml) krystalického přípravku vytvořeného výše po 18 hodinách byly ponechány v klidu přes noc a krystaly úplně sedimentovaly. Supernatant byl potom odebrán a nahrazen 4 ml ředidla sestávajícího z 16 mg/ml glycerolu, 20 mM tris pufru, 1,6 mg/ml m-kresolu, 0,65 mg/ml fenolu a 40 mM citrátu sodného, pH 7,6. Krystaly byly potom resuspendovány a ponechány znova sedimentovat. Tato procedura byla prováděna třikrát s tou výjimkou, že potřetí byl supernatant nahrazen pouze 3 ml ředidla.

Rychlost rozpouštění krystalů byla měřena umístěním 0,005 ml

stejněměrně suspendovaného přípravku do 3 ml Dulbecco fosforečnanem pufovaného solného roztoku (bez obsahu vápníku nebo hořčíku) v 1 cm čtvercové křemíkové kyvetě při teplotě 22 °C. Tento roztok byl míchán konstantní rychlostí použitím magnetického míchadla. Měření absorbance při 320 nm byla prováděna v jednodinutových intervalech. Absorbance při 320 nm odpovídá světlu rozptýlenému nerozpustnými částicemi, přítomnými ve vodné suspenzi. V důsledku toho, jak se mikrokrystaly rozpouští, absorbance klesá k nule. Doba potřebná k tomu aby se 0,005 ml tohoto přípravku rozpustila byla větší než 150 minut. Doba potřebná k rozpouštění 0,005 ml vzorku U100 komerčního Humulinu N, vystavenému působení stejných podmínek, byla zhruba 10 minut.

Množství celkového proteinu v přípravku bylo analyzováno pomocí HPLC pro určení celkové potence. Celková potence se vztahuje k celkové koncentraci lidského inzulinu a B29-Nε-hexanoyl-lidského inzulinu. Alikvot (0,050 ml) plně resuspendovaného přípravku byl rozpuštěn v 0,950 ml 0,01 M HCl a podroben HPLC analýze, jak je popsáno dále. Celková potence, určená touto analýzou, byla 4,54 mg/ml.

Pro HPLC analýzu byly použity následující podmínky: C8 kolona s obrácenými fázemi; konstantní teplota 23 °C; 1,0 ml/min, detekce při 214 nm; rozpouštědlo A=10% acetonitrilu (obj./obj.) v 0,1% vodné trifluoroctové kyselině; rozpouštědlo B=90% acetonitrilu (obj./obj.) v 0,1% vodné trifluoroctové kyselině; lineární gradienty (0,1 min, 0%B; 45,1 min, 75%B; 50,1 min, 100%B; 55 min 100%B; 57 min, 0%B; 72 min, 0%B). Standardy byly připraveny rozpouštěním inzulinu a acylovaného inzulinu v 0,01 N HCl. Koncentrace každého

standardu byla určena pomocí UV spektroskopie. Bylo předpokládáno, že roztok 1,0 mg/ml lidského inzulínu v 1 cm kyvetě má absorbanci 1,05 jednotek optické hustoty při maximální vlnové délce (přibližně 276 nm). To odpovídá molárnímu extinkčnímu koeficientu 6098. Předpokládalo se, že acylované inzulíny mají stejný molární extinkční koeficient jako lidský inzulín. Roztoky kalibrované pomocí UV byly potom zředěny pro získání standardů na 0,220, 0,147, 0,073 a 0,022 mg/ml. Standardy byly analyzovány pomocí HPLC a byla získána standardní křivka plochy v závislosti na koncentraci.

Supernatant byl analyzován pro určení celkové koncentrace rozpustného lidského inzulínu a B29-Nε-hexanoyl-lidského inzulínu přítomného v přípravku. Do 0,040 ml supernatantu bylo přidáno 0,160 ml 0,01 N HCl. Okyselený supernatant byl analyzován pomocí HPLC, jak je popsáno výše. Koncentrace rozpustného lidského inzulínu a B29-Nε-hexanoyl-lidského inzulínu v supernatantu byla určena jako 0,07 mg/ml.

Poměry množství B29-Nε-hexanoyl-lidského inzulínu a lidského inzulínu v krystalech byly určeny sedimentací alikvotu (0,100 ml) přípravku použitím stolní centrifugy, usazováním supernatantu, resuspendováním krystalů v 0,400 ml Dulbecco fosforečnanem pufrovaném solném roztoku, opětou centrifugací, odebráním supernatantu a nakonec rozpuštěním krystalů v 1,50 ml 0,01 N HCl. Byla provedena HPLC analýza popsaná výše. Výsledek této analýzy byl 84,2% B29-Nε-hexanoyl-lidského inzulínu a 15,8% lidského inzulínu.

#### Příprava 14

Kokrystalický suspenzní přípravek obsahující lidský inzulin a B29-Nε-dekanoyl-lidský inzulin

Kyselý roztok B29-Nε-dekanoyl-lidského inzulinu byl připraven rozpuštěním 10,4 mg B29-Nε-dekanoyl-lidského inzulinu v 0,25 ml 0,1 N HCl. Kyselý roztok lidského inzulinu byl připraven rozpuštěním 30,3 mg lidského inzulinu (zinkové krystaly) v 0,75 ml 0,1 N HCl. Oba roztoky byly spojeny na celkový objem 1 ml. Tento výsledný roztok byl míchán po dobu přibližně 5 minut. Do tohoto roztoku bylo přidáno za míchání 0,305 ml 1000 ppm roztoku dvojmocného zinku. Do výsledného roztoku byly přidány 4 ml krystalizačního ředidla (40 mg/ml glycerolu, 50 mM tris pufry, 4 mg/ml m-kresolu, 1,625 mg/ml fenolu, 100 mM citrátu sodného, pH 7,4). pH výsledného roztoku bylo upraveno na 7,58. Tento roztok byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Pět mililitrů (5 ml) protaminového roztoku (37,6 mg protaminsulfátu v 50 ml vody) bylo přidáno do 5 ml filtrovaného roztoku. Výsledný roztok byl ponechán stát v klidu po dobu 63 hodin za řízené teploty 25 °C.

Mikroskopická inspekce (po 63 hodinách) odhalila, že došlo ke krystalizaci a že příprava poskytla stejnoměrné jednotlivé tyčinkovité krystaly o přibližné střední délce 8 mikronů.

Rychlost rozpouštění krystalů byla měřena umístěním 0,006 ml stejnoměrně suspendovaného krystalického přípravku do 3 ml Dulbecco fosforečnanem pufovaného solného roztoku (bez

obsahu vápníku nebo hořčíku) v 1 cm čtvercové křemíkové kyvetě při teplotě 22 °C. Doba potřebná pro rozpuštění 0,006 ml tohoto krystalického přípravku byla větší než 300 minut. Doba potřebná pro rozpuštění 0,005 ml vzorku U100 komerčního Humulinu N pro rozpuštění za stejných podmínek byla zhruba 10 minut.

Pro přípravu HPLC analýzy byly krystaly sedimentovány ponecháním preparátu stát v klidu. Osm mililitrů (8 ml) supernatantu bylo potom odebráno a bylo nahrazeno 8 ml ředidla [16 mg/ml glycerolu, 20 mM tris pufru, 1,6 mg/ml m-kresolu, 0,65 mg/ml fenolu a 40 mM citrátu sodného, pH 7,6]. Kokrystaly byly potom resuspendovány. Tato procedura byla prováděna stejným způsobem třikrát, s tou výjimkou, že potřetí bylo 8 ml supernatantu nahrazeno 7 ml ředidla.

Potence krystalického přípravku a supernatantu byla analyzována pomocí HPLC, v zásadě jak je popsáno v Přípravě 13. Celková potence určená touto analýzou byla 3,87 mg/ml. Koncentrace rozpustného lidského inzulínu a B29-Nε-dekanoyl-lidského inzulínu v supernatantu byla určena jako 0,06 mg/ml. Poměry lidského inzulínu a B29-Nε-dekanoyl-lidského inzulínu v krystalické fázi byly určeny způsobem podle Přípravy 13 jako 74,3% lidského inzulínu a 25,7% B29-Nε-dekanoyl-lidského inzulínu.

Určování velikosti částic bylo prováděno na vzorku přípravku použitím přístroje na měření velikosti částic (Multisizer Model IIE, Coulter Corp., Miami, FL 33116-9015). Pro provádění tohoto měření bylo 0,25 ml krystalického přípravku přidáno do 100 ml ředidla sestávajícího z 14 mM dibázického

30.08.00

fosforečnanu sodného, 16 mM glycerolu, 1,6 mg/ml m-kresolu a 0,65 mg/ml fenolu, pH 7,4. Velikost trysky přístroje byla 50 mikronů. Data o velikosti částic byla shromažďována po dobu 50 sekund. Toto měření ukázalo, že střední průměr částic krystalů byl přibližně 6 mikronů s přibližně normálním rozdělením, do kterého spadaly částice velikosti od přibližně 2 mikronů do přibližně 9 mikronů. Tento výsledek je podobný jako rozdělení velikosti částic u komerčního NPH určené použitím analogického způsobu [DeFelippis, M. R. a kol. J. Pharmaceut. Sci. 87:170-176 (1998)].

#### Příprava 15

Kokrystalický suspenzní přípravek obsahující lidský inzulin a B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulin.

Kyselý roztok B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulinu byl připraven rozpuštěním 30,3 mg B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulinu v 0,75 ml v 0,1 N HCl. Kyselý roztok lidského inzulinu byl připraven rozpuštěním 59,7 mg lidského inzulinu (zinkové krystaly) v 1,5 ml 0,1 N HCl. Alikvot (0,25 ml) roztoku lidského inzulinu byl kombinován s roztokem 0,75 ml B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulinu, což dalo objem 1 ml, který byl míchán po dobu přibližně 5 minut. Do tohoto roztoku bylo z míchání přidáno 0,365 ml 1000 ppm roztoku dvojmocného zinku. Do roztoku inzulinu se zinkem byly přidány 4 ml krystalizačního ředidla (40 mg/ml glycerolu, 35 mM dibázického pufru fosforečnanu sodného, 4 mg/ml m-kresolu, 1,625 mg/ml fenolu, 15 mM citrátu sodného, pH 7,4).

~~pH výsledného roztoku bylo upraveno na 7,60. Roztok byl~~  
filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže  
nizkoproteinové složky. Pět mililitrů (5 ml) protaminového

roztoku (37,9 mg protaminsulfátu v 50 ml vody) bylo přidáno do 5 ml filtrovaného roztoku inzulínu a zinku. Výsledný roztok byl ponechán stát v klidu po dobu 48 hodin za řízené teploty 25 °C.

Mikroskopická inspekce (po 48 hodinách) odhalila, že došlo ke krystalizaci a že příprava dala stejnoměrné jednotlivé tyčinkovité krystaly o přibližné střední délce 5 mikronů.

Pro přípravu HPLC analýzy a testování rozpouštění byly krystaly sedimentovány ponecháním preparátu stát v klidu. Osm mililitrů (8 ml) supernatantu bylo potom odebráno a nahrazeno 8 ml ředidla [16 mg/ml glycerolu, 14 mM dibázického pufru fosforečnanu sodného, 1,6 mg/ml m-kresolu, 0,65 mg/ml fenolu, 6 mM citrátu sodného, pH 7,6]. Krystaly byly potom resuspendovány. Tato procedura byla prováděna stejným způsobem třikrát, s výjimkou, že potřetí bylo 8 ml supernatantu nahrazeno 7 ml ředidla.

Rychlost rozpouštění byl určen v zásadě jak je popsáno v Přípravě 13 výše. Střední doba pro rozpouštění 0,005 ml uvedeného přípravku byla více než 300 minut. Doba pro rozpouštění 0,005 ml vzorku U100 komerčního Humulinu N za stejných podmínek byla zhruba 10 minut.

Celková potence a potence v supernatantu byly určeny pomocí HPLC, v zásadě jak je popsáno v Přípravě 13. Celková potence byla 3,44 mg/ml. Koncentrace rozpustného lidského inzulínu a B29-Ne-oktanoyl-lidského inzulínu v krystalickém přípravku byla určena jako 0,01 mg/ml. Poměr množství lidského inzulínu a B29-Ne-oktanoyl-lidského inzulínu v krystalické

fázi byly určeny v zásadě způsobem podle Přípravy 13 jako 25,5% lidského inzulínu a 74,5% B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu.

Střední průměr částic krystalů, určený jak je popsáno v Přípravě 14, byl přibližně 6 mikronů, s přibližně normálním rozložením, do kterého spadaly částice o velikosti přibližně 2 mikrony až přibližně 12 mikronů. Tento výsledek je podobný rozložení velikosti částic u komerčního NPH, jak je popsáno v DeFelippis, M. R. a kol. supra.

#### Příprava 16

Tři kokrystalické přípravky ve srovnání s inzulínovým přípravkem

Kyselý roztok B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu byl připraven rozpuštěním 24,18 mg B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu v 0,6 ml 0,1 N HCl. Kyselý roztok lidského inzulínu byl připraven rozpuštěním 41,1 mg lidského inzulínu (jako zinkových krystalů) v 1 ml 0,1 N HCl. Čtyři 0,4 ml roztoků byly připraveny kombinováním různých objemů B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu a roztoku lidského inzulínu, jak je uvedeno dále v Tabulce 4.

Tabulka 4. Příprava přípravků mikrokrystalů

	Přípravek			
	D	C	B	A
Nominální hmotnostní procento B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulín	75	50	25	0

Objem přidaného roztoku B29-Nε-oktanoyl- lidského inzulínu (μl)	300	200	100	0
Objem přidaného roztok lidského inzulínu (μl)	100	200	300	400

Do každého ze čtyř 0,4 ml roztoků bylo přidáno 0,15 ml 1000 ppm roztoku dvojmocného zinku. Do každého ze čtyř 0,55 ml roztoků bylo přidáno 1,6 ml krystalizačního ředidla (50 mM tris pufr, 10 mg/ml fenolu, 100 mM citrátu sodného, pH 7,6). Každý ze čtyř roztoků byl upravený na hodnotu pH 7,6 malým množstvím 1 N NaOH a 0,1 N HCl. Každý roztok byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Dva mililitry (2 ml) každého ze čtyř proteinových roztoků byly zkombinovány s 2 ml protaminového roztoku (7,34 mg protaminsulfátu v 10 ml vody). V každém z případů se okamžitě vytvářel precipitát. Tyto čtyři 4 ml suspenze byly ponechán stát v klidu při teplotě okolí (přibližně 22 °C) po dobu 16 hodin.

Mikroskopická inspekce (po 16 hodinách) odhalila, že každá ze čtyř příprav vytvořila stejnoměrné, jednotlivé, tyčinkovité krystaly s přibližnou střední délkou zhruba 10 mikronů.

Každý 4 ml přípravek byl přenesen do testovací zkumavky a centrifugován v stolní centrifuze při 3000 otáčkách za minutu po dobu 20 minut pro úplnou sedimentaci krystalů. Z každého přípravku bylo odebráno 3 ml supernatantu a nahrazeno 3 ml ředidla (25 mM tris pufr, 5 mg/ml fenolu, 16 mg/ml glycerolu, pH 7,4). Krystaly potom byly resuspendovány. Tato procedura byla prováděna třikrát s tou

výjimkou, že potřetí bylo 3 ml supernatantu nahrazeno 2,5 ml ředidla pro každý přípravek.

Každý ze čtyř přípravků byl analyzován pomocí HPLC pro kvantitativní určení celkových potencií přípravků a kompozice jednotlivých krystalů, v zásadě jak je popsáno výše. Celková potence se vztahuje k celkové koncentraci lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu. Celková potence a procento B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu byly určeny analýzou alikvotu stejnoměrně suspendovaného přípravku. Supernatant byl analyzován pro určení celkové koncentrace rozpustného lidského inzulínu a rozpustného B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu přítomných v každém přípravku. Výsledky těchto analýz jsou podány dále. Doby rozpouštění byly určeny jak je popsáno výše v Přípravě 13.

Tabulka 5. Vlastnosti přípravků mikrokrystalů.

	Přípravek				
	D	C	B	A	NPH
B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulín v krystalech (%)	77,7	51,4	23,7	0	-
Lidský inzulín v krystalech (%)	22,3	48,6	76,3	100	-
Celková potence (mg/ml)	3,21	3,48	3,38	3,43	-
Potence supernatantu (mg/ml)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	-
Doba rozpouštění (min)	300	120	50	20	10

## Příprava 17

## Příprava nerozpustných kompozic

Následující příprava je nárys jiného způsobu, který byl používán pro přípravu precipitátů a mikrokrystalů podle předloženého vynálezu. Je třeba jej číst společně s daty v Tabulce 6 uvedené níže.

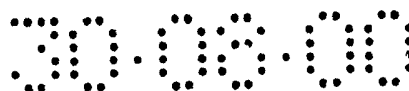
Odměřené množství derivatizovaného proteinu, připraveného jak je popsáno výše, bylo rozpuštěno v 0,6 ml 0,1 N HCl. Odměřené množství proteinu bylo rozpuštěno v 0,2 ml 0,1 N HCl (zinkové krystaly lidského inzulinu nebo LysB28,Pro29-analog lidského inzulinu). Oba roztoky byly důkladně navzájem promíchány mícháním po dobu pěti až deseti minut. Objem (0,32 ml) vodného roztoku, obsahujícího 1000 ppm dvojmocného zinku a objem (3,2 ml) roztoku ředidla (zhruba 50 mM Tris reagentu, zhruba 10 mg/ml fenolu, zhruba 16 mg/ml

glycerolu a zhruba 29,5 mg/ml citrátu sodného) byly přidány ke směsi obou proteinů. pH výsledného roztoku bylo upraveno na zhruba 7,6 (7,55-7,64) použitím 1 N HCl nebo 1 N NaOH. Roztok s upraveným pH byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Do čtyř mililitrů filtrátu byly přidány čtyři mililitry roztoku protaminu ve vodě (zhruba 37,3 mg protaminsulfátu na 100 ml, rozmezí 37,18-37,48). Precipitát se vytvořil okamžitě po přidání protaminového roztoku. Přípravek byl ponechán stát v klidu při teplotě 25 °C. Testy rozpouštění byly prováděny výše popsaným způsobem.

Za stejných podmínek se inzulin NPH rozpustil za zhruba 6 minut.

Tabulka 6. Příprava nerozpustných kompozic.

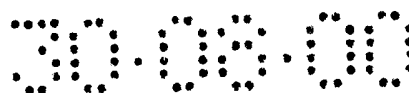
Protein	Lys (B28), Pro(B29)-analog lidského inzulinu				
Hmotnost proteinu (mg)	4,28	4,02	3,84	3,96	4,15
Derivatizovaný protein	B29acylovaný-lidský inzulin				
Derivatizující skupina	butanoyl	pentanoyl	hexanoyl	nonanoyl	dekanoyl
Hmotnost derivatizovaného proteinu (mg)	11,90	12,1	12,08	12,13	12,20
Tvar krystalu	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý
Výtěžek (%)	>80	>90	>90	>90	>90
Derivatizovaný protein v nerozpustné fázi (%)	77,5	75,1	77	76,5	76,6
Doba rozpouštění (min)	23-24	31	54	67	37-38



Protein	lidský inzulín				
Hmotnost proteinu (mg)	12,09	12,18	12,12	12,21	12,27
Derivatizovaný protein	B28-acylovaný-Lys(B28), Pro(B29)- analog lidského inzulínu			A1,B28-diacylovaný- Lys(B28), Pro(B29)- lidský inzulín	
Derivatizující skupina	butanoyl	hexanoyl	oktanoyl	dibutanoyl	dihexanoyl
Hmotnost derivatizovaného proteinu (mg)	4,39	4,21	4,28	4,11	4,23
Tvar krystalu	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý
Výtěžek (%)	>80	>90	>90	>90	>90
Derivatizovaný protein v nerozpustné fázi (%)	27,6	25	27	26,8	24,1
Doba rozpouštění (min)	16-17	10-11	27-28	10-11	20-21

-087-

Protein	lidský inzulín				
Hmotnost proteinu (mg)	4,26	4,26	4,13	4,23	12,09
Derivatizovaný protein	B29acylovaný-lidský inzulín				
Derivatizující skupina	butanoyl	pentanoyl	hexanoyl	nonanoyl	tetradekanoyl
Hmotnost derivatizovaného proteinu (mg)	12,39	12,39	12,03	12,06	4,16
Tvar krystalu	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý
Výtěžek (%)	>90 72	>90	>90	>90	
Derivatizovaný protein v nerozpustné fázi (%)	76,3	76,5	75	72,5	25,07
Doba rozpouštění (min)	45-46	62-63	77-78	77-78	61



Protein	lidský inzulin
Hmotnost proteinu (mg)	12,19
Derivatizovaný protein	B29acylovaný-lidský inzulin
Derivatizující skupina	hexadekanoyl
Hmotnost derivatizovaného proteinu (mg)	3,99
Tvar krystalu	tyčinkovitý
Výtěžek (%)	>90
Derivatizovaný protein v nerozpustné fázi (%)	24,7
Doba rozpouštění (min)	71-72

Následující příprava je nárys jiného způsobu, který byl používán pro přípravu precipitátů a mikrokrystalů podle předloženého vynálezu. Je třeba jej číst společně s daty v Tabulce 7 uvedené níže.

Odměřené množství derivatizovaného proteinu, připraveného jak je popsáno výše, bylo rozpuštěno v 3,2 ml roztoku ředidla (zhruba 50 mM Tris reagentu, zhruba 10 mg/ml fenolu, zhruba 16 mg/ml glycerolu a zhruba 29,5 mg/ml citrátu sodného). Odměřené množství proteinu bylo rozpuštěno v 0,6 ml 0,1 N HCl (zinkové krystaly lidského inzulinu nebo LysB28,Pro29-analog lidského inzulinu). Oba roztoky byly důkladně navzájem promíchány mícháním po dobu pěti až deseti

-088-

minut. pH výsledného roztoku bylo upraveno na zhruba 7,6 (7,55-7,64) použitím 1 N HCl nebo 1 N NaOH. Roztok s upraveným pH byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Do objemu filtrátu byl přidán stejný objem roztoku protaminu ve vodě (zhruba 37,3 mg protaminsulfátu na 100 ml, rozmezí 37,18-37,48).

Precipitát se vytvořil okamžitě po přidání protaminového roztoku. Přípravek byl ponechán stát v klidu při teplotě 25 °C. Testy rozpouštění byly prováděny výše uvedeným způsobem. Za stejných podmínek se inzulin NPH rozpustil po zhruba 6 minutách.

Tabulka 7. Příprava nerozpustných kompozic.

Protein	lidský inzulin				
Hmotnost proteinu	12,13	11,87	12,15	12,28	12,22
Derivatizovaný protein	A1,B29-diacyl-lidský inzulin			A1,B28-diacyl-LysB28, ProB29 lidský inzulin	B29acyl-AspB28 analog lidského inzulinu
Derivatizující skupina	dioktanoyl	dinonanoyl	didekanoyl	dioktanoyl	oktanoyl
Hmotnost derivatizovaného proteinu	4,29	4,07	4,06	4,29	3,98
Tvar krystalu	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý	tyčinkovitý
Výtěžek (%)	>90	>90	>90	>90	>90
Derivatizovaný protein v nerozpustné fázi (%)	25,2	24,6	26,6	27,4	24,4
Doba rozpouštění (min)	73-74	25	31-32	47-48	43-44

Následující příprava je nárys jiného způsobu, který byl používán pro přípravu precipitátů a mikrokrystalů podle

předloženého vynálezu. Je třeba jej číst společně s daty v Tabulce 8 uvedené níže.

Odměřené množství derivatizovaného proteinu, připraveného jak je popsáno výše, bylo rozpuštěno v odměřeném objemu 0,1 N HCl. Odměřené množství proteinu bylo rozpuštěno v odměřeném objemu 0,1 N HCl (zinkové krystaly lidského inzulinu nebo LysB28,Pro29-analog lidského inzulinu). Odměřené objemy obou roztoků byly důkladně navzájem smíchány mícháním po dobu pěti až deseti minut. Odměřené objemy vodného roztoku obsahujícího 1000 ppm dvojmocného zinku a roztok ředidla (zhruba 50 mM Tris reagentu, zhruba 10 mg/ml fenolu, zhruba 32 mg/ml glycerolu a zhruba 30 mg/ml dihydrátu citrátu sodného, pH 8,47) byly přidány do směsi obou proteinů. pH výsledného roztoku bylo upraveno na zhruba 7,6 (7,58-7,63) použitím 1 N HCl nebo 1 N NaOH. Roztok s upraveným pH byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky. Do dvou mililitrů filtrátu byly přidány dva mililitry roztoku protaminu ve vodě (zhruba 37,5 mg protaminsulfátu na 100 ml). Precipitát se vytvořil okamžitě po přidání protaminového roztoku. Přípravek byl ponechán stát v klidu při teplotě 25 °C. Testy rozpouštění byly prováděny výše popsaným způsobem. Za stejných podmínek se inzulin NPH rozpustil za zhruba 6 minut.

Tabulka 8. Příprava nerozpustných kompozic.

Protein	lidský inzulin				
Hmotnost proteinu (mg)	11,3	11,3	33,6	33,6	16,5
Objem 0,1 N HCl	0,57	0,57	1,68	1,68	0,83
Derivatizovaný protein	B29acylovaný-lidský inzulin				
Derivatizující skupina	2-methyl-hexanoyl	2-ethyl-hexanoyl	4-methyl-oktanoyl	3-methyl-dekanoyl	dodekanoyl
Hmotnost derivatizovanéh o proteinu (mg)	6,07	6,3	6,12	2,12	6,3
Objem 0,1 N HCl (ml)	0,3	0,3	0,3	0,1	0,3
ml roztoku proteinu kombinovaného s ml roztoku derivatizovanéh o proteinu	0,10 + 0,30	0,10 + 0,30	0,10 + 0,30	0,30 + 0,10	0,10 + 0,30
ml 1000 ppm zinku	0,152	0,152	0,112	0,096	0,152
ml ředidla	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Tvar krystalu	tyčinkovit ý	tyčinkovit ý	malé nepravidel né	tyčinkovit ý	tyčinkovit ý
Výtěžek (%)	>90	>90			>80
Derivatizovaný protein v nerozpustné fázi (%)	74,1	75,5			81,9
Doba rozpouštění (min)	116	236			40

Protein	lidský inzulín			
Hmotnost proteinu (mg)	22,3	22,3	22,3	22,3
Objem 0,1 N HCl	1,12	1,12	1,12	1,12
Derivatizovaný protein	B29acylovaný- králičí inzulín	B29acylovaný- prasečí inzulín	B29acylovaný- ovčí inzulín	B29acylovaný- hovězí inzulín
Derivatizující skupina	oktanoyl	oktanoyl	hexanoyl	hexanoyl
Hmotnost derivatizovanéh o proteinu (mg)	6,21	6,07	6,07	6,21
ml proteinu roztok kombinovaného s ml roztoku derivatizovanéh o proteinu	0,1 + 0,3	0,1 + 0,3	0,1 + 0,3	0,1 + 0,3
ml 1000 ppm zinku	0,152	0,152	0,152	0,152
ml přidaného ředidla	1,6	1,6	1,6	1,6
Tvar krystalu	tyčinkovitý	tyčinkovitý	malé nepravidelné	tyčinkovitý
Výtěžek (%)	>90	>90	>90	>90
Derivatizovaný protein v nerozpustné fázi (%)	74,6	74,7	75,4	75,9
Doba rozpuštění (min)	111	>300	227	>300

Protein	lidský inzulín		
Hmotnost proteinu (mg)	33,6	2,4	22,6
Objem 0,1 N HCl	1,68	0,1	1,12
Derivatizovaný protein	B29acylovaný-Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-analog lidského inzulínu	B29acylovaný-lidský inzulín	B29acylovaný-desThr(B30)-analog lidského inzulínu
Derivatizující skupina	dekanoyl	1,4-dichlor-fenyl-thioacetyl	oktanoyl
Hmotnost derivatizovaného proteinu (mg)	2,23	5,1	6,06
Objem 0,1 N HCl 0,1 ml	0,3	0,3	
ml roztoku proteinu kombinovaného s ml derivatizovaného roztoku proteinu	0,3 + 0,1	0,1 + 0,3	0,1 + 0,3
ml 1000 ppm zinku	0,096	0,152	0,152
ml přidaného ředidla	1,6*	1,6	1,6
Tvar krystalu	tyčinkovitý	malé nepravidelné krystaly	tyčinkovitý
Výtěžek (%)	>90	>90	>90
Derivatizovaný protein v nerozpustné fázi (%)	20,4	71,8	74,2
Doba rozpouštění (min)	63	66	>300

\* 2,096 ml 37,5 mg/100 ml protaminsulfátového roztoku bylo přidáno před přidáním ředidla. pH bylo upraveno po přidání ředidla.

#### Příprava 18

#### Příprava amorfni suspenze

Odměřené množství (13,84 mg proteinu) pevného B28-tetradekanoyl-Lys(B28),Pro(B29) analogu lidského inzulínu bylo rozpuštěno v 0,375 ml 0,1 N HCl. Odměřené množství zinkového lidského inzulínu (7,40 mg protein) bylo rozpuštěno v 207 mikrolitrech 0,1 N HCl. Alikvot (125  $\mu$ l) roztoku inzulínu (obsahujícího 4,47 mg lidského inzulínu) bylo přidáno do roztoku B28-tetradekanoyl-Lys(B28),Pro(B29)-analogu lidského inzulínu. Byly přidány objem (180  $\mu$ l) 1000 ppm zinku a 2,0 ml ředidla (1,6 mg/ml fenolu, 4 mg/ml m-kresolu, 40 mg/ml glycerolu, 5 mg/ml bezvodého dibázického fosforečnanu, 7,5 mg/ml dihydrátu fosforečnanu sodného, pH 7,6). pH byl zvýšeno z 5,6 na 8,0 pomocí 100 mikrolitrů 1N NaOH a sníženo zpět na 7,59 20 mikrolitry 1N HCl a 1N NaOH. Koncentrace B28-tetradekanoyl-Lys(B28),Pro(B29) analogu lidského inzulínu byla 4,94 mg/ml a koncentrace lidského inzulínu byla 1,60 mg/ml. Roztok byl ponechán procházet přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky a chlazen přes noc. Následující ráno nebyl v roztoku přítomen žádný precipitát. Do 2,50 ml roztoku bylo přidáno 2,88 ml protaminového roztoku (0,75 mg/ml pevného protaminsulfátu rozpuštěného ve vodě). Amorfni precipitát se vytvořil po přidání protaminu.

Po přidání protaminu byla znovu určena koncentrace B28-

tetradekanoyl-Lys(B28),Pro(B29) analogu lidského inzulínu a lidského inzulínu v rozpustné fázi. Vzorke pro HPLC analýzu byly připraveny ihned po přidání protaminu. Z retenčních časů píků HPLC analýza ukázala, že nerozpustný materiál v suspenzi obsahoval protamin, B28-tetradekanoyl-Lys(B28),Pro(B29) analog lidského inzulínu a lidský inzulín. Koncentrace B28-tetradekanoyl-Lys(B28),Pro(B29) analogu lidského inzulínu v rozpustné fázi byl 2,30 mg/ml a koncentrace lidského inzulínu byla 0,74 mg/ml.

Koncentrace B28-tetradekanoyl-Lys(B28),Pro(B29) analogu lidského inzulínu a lidského inzulínu v okyselených vzorcích suspenze, supernatantu a precipitátu byly určeny a jsou uvedeny v následující tabulce. Tyto hodnoty jsou v rozumném souladu s očekávanými hodnotami. Koncentrace protaminu nebyly určovány.

Tabulka 9. Příprava nerozpustných kompozic.

Vzorek	Koncentrace (mg/ml)		Hmotnost (%)
	B28-tetradekanoyl-Lys(B28),Pro(B29) analog lidského inzulínu	lidský inzulín	
Suspenze	2,52	0,79	76,2
Supernatant	0,006	0,057	8,9
Precipitát	2,29	0,60	79,2

## Příprava 19

### Příprava amorfních suspenzí

Následující příprava je nárys jiného způsobu, který byl používán pro přípravu precipitátů podle předloženého vynálezu. Způsob byl používán pro přípravu přípravků amorfních precipitátů inzulínu z každým ze tří následujících derivatizovaných proteinů: B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulín; B29-Nε-nonanoyl-lidský inzulín; a B28-Nε-oktanoyl-LysB28, ProB29-analog lidského inzulínu.

Odměřené množství pevného derivatizovaného proteinu byl rozpuštěn v 3 ml 0,1 N HCl pro vytvoření roztoku, obsahujícího přibližně 16 mg/ml derivatizovaného proteinu. Odměřené množství zinkových krystalů lidského inzulínu (73 mg, ze kterých 67,17 mg byl protein) bylo rozpuštěno v 4,198 ml 0,1 N HCl pro vytvoření roztoku obsahujícího přibližně 16 mg/ml inzulínu. Tři mililitry roztoku derivatizovaného proteinu a jeden mililitr roztoku inzulínu byly kombinovány a důkladně smíchány. Byly přidány odměřené objemy 1000 ppm roztoku zinku (1,137 ml) a ředidla (16 ml, obsahujícího na jeden ml: 1,625 mg fenolu, 4 mg m-kresolu, 40 mg glycerolu, 5 mg bezvodého dibázického fosforečnanu sodného, 7,5 mg dihydrátu citrátu sodného, pH 7,6). pH bylo upraveno na zhruba 7,6 (7,58-7,61) použitím roztoků 5 N NaOH a 5 N HCl. Objem přidávaný během úpravy pH byl od 0,11 do 0,12 ml. Roztok byl filtrován přes 0,22 mikronový filtr, který váže nízkoproteinové složky a chlazen přes noc. Následující ráno v roztoku nabyt přítomen žádný precipitát. Roztok sestával z proteinu a derivatizovaného proteinu (hmotnostní poměr přibližně 1:3) a koncentrace celkového proteinu byla

ekvivalentní zhruba 85 jednotkám na mililitr. Těsně před testováním na krysách byly zkombinovány stejné objemy roztoku a roztoku protaminsulfátu (0,352 mg/ml) a byly důkladně smíseny. Okamžitě se vytvořil amorfni precipitát. Vzorek suspenzního přípravku obsahujícího amorfni precipitát byl okamžitě injektován testovaným zvířatům. Po smíchání s protaminem byla koncentrace celkového proteinu zhruba 42,4 jednotek/ml.

#### Příprava 20

Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-analogu lidského inzulinu

Gly(A21)Arg(B31)Arg(B32)-lidský inzulin byl získán fermentací *E. coli*, ve které Gly(A21)-lidský proinzulin prekurzor molekula byl overexprimován do inkluzních tělísek. Část (94,7 g) inkluzních tělísek byla solubilizována v 500 ml 6 M hydrochloridu guanidinu obsahujícím 0,1 M TRIS, 0,27 M siřičitanu sodného a 0,1 M tetrathionátu sodného, pH 10,5 při teplotě okolí. pH bylo rychle sníženo na 8,8 pomocí 12 N HCl. Po intenzivním míchání v otevřené nádobě po 45 minut bylo pH sníženo na 2,1 pomocí kyseliny fosforečné a vzorek byl centrifugován přes noc při teplotě 4 °C. Supernatant byl dekantován a uchováván při teplotě 4 °C pro další zpracování. Pelet byl reextrahován s 200 ml dodatečného výše popsaného roztoku pH 10,5 (viz výše) a potom centrifugován pro dobu 3 hodin při teplotě 4 °C. Tento a dříve získaný supernatant byly každý zředěn 4X pomocí 100 mM fosforečnanu sodného, pH 4, čímž precipitoval produkt a další kyselé složky. Poté byl precipitát ponechán usadit se, většina supernatantu byla dekantována a vyhozena. Výsledná suspenze byla centrifugována, následovala dekantace a vyhození

dalšího supernatantu, takže zbyl mokrý pelet surového prekurzoru S-sulfonátu Gly(A21)-lidského proinzulínu. Pelety byly solubilizovány v 1,5 litrech 7 M deionizované močoviny, pH bylo upraveno na hodnotu 8 pomocí 5 N NaOH a směs byla míchána po několik hodin při teplotě 4 °C. Potom byla přidána sůl (NaCl) pro dosažení 1 M koncentrace a vzorek byl vložen do XAD-7 kolony (14 cm X 20 cm, Toso-Haas, Montgomeryville, PA), která byla předtím propláchnuta směsí 50% acetonitril/50% 50 mM hydrogenuhličitan amonný, 10% acetonitril/90% 50 mM hydrogenuhličitan amonný a nakonec 7 M deionizované močoviny/1M NaCl/20 mM TRIS, pH 8. Jakmile byla kolona naplněna, bylo do ní pumpováno 4,5 litrů 7 M deionizované močoviny/1 M NaCl/20 mM TRIS, pH 8 roztok, následovaných 2,8 litry 50 mM hydrogenuhličitanu amonného/1 M NaCl a 6,5 litry 50 mM hydrogenuhličitanu amonného. Kolona byla vymývána lineárním gradientem acetonitrilu v 50 mM hydrogenuhličitanu amonného, zatímco vymývaný produkt byl monitorován pomocí UV při 280 nm. Hledaný pík, konkrétně částečně purifikovaný prekurzor S-sulfonátu Gly(A21)-lidského proinzulínu, byl shromážděn, lyofilizován a podroben následující proceduře tvarování a vytváření disulfidových vazeb. Dávka (5,4 g) prekurzoru byla rozpuštěna ve 3 litrech 20 mM glycinu, pH 10,5, 4 °C. Potom bylo za míchání přidáno 15 ml 240 mM cysteinu HCl, udržujícíce pH na 10,5 a teplotu na 4 °C. Reakční roztok byl mírně míchán při teplotě 4 °C po dobu 27 hodin a potom byla reakce zastavena snížením pH na 3,1 přidáním kyseliny fosforečné. Byl přidán acetonitril (155 ml) a roztok byl potom vložen do 5 x 25 cm C4 kolony s obrácenými fázemi, která byla propláchnuta směsí 60% acetonitril/40% voda/0,1% TFA a ekvilibrována v 10% acetonitrilu/90% vodě/0,1% TFA. Jakmile

byla kolona naplněna, byl do ní napumpován 1 litr směsi 17,5% acetonitril/82,5% voda/0,1% TFA, potom byla vymývána lineárním gradientem acetonitrilu v 0,1% TFA za monitorování při 280 nm. Zvolené frakce byly shromážděny a lyofilizovány, přičemž bylo získáno 714 mg. Pro přeměnu proinzulínového prekurzoru na požadovaný inzulinový analog bylo 697 mg prekurzoru Gly(A21) lidského proinzulínu rozpuštěno v 70 ml 50 mM hydrogenuhličitanu amonného, potom ochlazeno na 4 °C, pH 8,3. Byla přidána dávka (0,14 ml) 1 mg/ml roztoku prasečího trypsinu (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) v 0,01 N HCl do vzorku roztoku, který byl jemně míchán při teplotě 4 °C po dobu zhruba 24 hodin. Pak bylo přidáno dalších 0,14 ml trypsinového roztoku do reakčního roztoku, který byl potom míchán po dodatečných 21 hodin a 45 minut. Reakce byla zastavena snížením pH na 3,2 přidáním 0,7 ml ledové kyseliny octové a 0,3 ml kyseliny fosforečné. Získaný vzorek roztoku Gly(A21)Arg(B31)Arg(B32)-lidského inzulínu z reakce trypsinového štěpení byl zředěn 4X směsí 30% acetonitril/70% 50 mM kyselina octové, pH 3,1 a vložen do kationtoměničové kolony 1 x 30 cm S HyperD F (Biosepra, Marlborough, MA) do které bylo předem napumpováno 30% acetonitrilu/70% 50 mM kyseliny octové/500 mM NaCl, pH 3,3 a která byla ekvilibrována v 30% acetonitrilu/70% 50 mM kyselině octové. Po naplnění bylo do kolony napumpováno zhruba 50 ml směsi 30% acetonitril/70% 50 mM kyselina octové, potom byla vymývána lineárním gradientem NaCl v 30% acetonitrilu/50 mM kyselině octové za monitorování vymývaného produktu při 276 nm. Zvolené frakce obsahující Gly(A21)Arg(B31)Arg(B32)-lidský inzulin byly sebrány, zředěny 3X purifikovanou vodou a vloženy do kolony s obrácenými fázemi 2,2 x 25 cm C4 (Vydac, Hesperia, CA)

předem naplněné směsí 60% acetonitril/40% voda/0,1% TFA a potom 10% acetonitril/90% voda/0,1% TFA. Po naplnění bylo do kolony pumpováno zhruba 200 ml směsi 10% acetonitril/90% voda/0,1% TFA, potom byla vymývána lineárním gradientem acetonitrilu v 0,1% TFA. Zvolené frakce byly sebrány a lyofilizovány a tím bylo získáno 101 mg. Analytická HPLC prokázala čistotu větší než 95% u hlavního píku. Analýza purifikovaného proteinu elektrosprejovou hmotovou spektroskopií (ESMS) určila molekulovou hmotnost 6062,9 (teorie 6063,0).

#### Příprava 21

#### Des(B30)-lidský inzulin

Des(B30)-lidský inzulin byl připraven z lidského proinzulinu říznou trypsinovou hydrolýzou. Dávka (2 g) lidského proinzulinu, který byl vytvořen biologickou syntézou v rekombinantní *E. coli* a purifikován obvyklými způsoby [Frank, B. H. a kol., v PEPTIDES: Synthesis-Structure-Function. Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium, Rich, D. H. a Gross, E. (editoři), Pierce Chemical Company, Rockford, str. 729-738, 1981; také viz Frank, B. H., U. S. patent č. 4,430,266, vydaný 7. února 1984; obě citace jsou zahrnuty jako reference] byla rozpuštěna v 400 ml 0,1 M, pH 7,5 HEPES pufru. Po přidání 8 ml 1 M  $\text{CaCl}_2$  (ve vodě) a úpravě pH na 7,5 pomocí 5 N NaOH byly 2 ml 10 mg/ml roztoku prasečího trypsinu (Sigma) v 0,01 N HCl přeneseny do vzorku roztoku za mírného míchání. Reakční roztok byl ponechán za míchání při teplotě okolí po dobu 2 hodin a 42 minut a po uplynutí této doby byl přenesen do prostředí s 37 °C za občasného míchání. Po uplynutí 1

hodiny a 45 minut při teplotě 37 °C byla enzymatická reakce zastavena snížením pH na 3,0 pomocí kyseliny fosforečné a snížení teploty na 4 °C pro skladování. Následně byla teplota roztoku zvýšena na teplotu okolí a roztok byl zředěn pomocí 50 ml acetonitrilu a potom na konečný objem 500 ml purifikovanou vodou, potom byl vložen do 2,5 x 58 cm CG-161 (Toso-Haas) kolony, která byla předtím propláchnuta 1 objemem kolony 40% acetonitrilu/60% 0,1 M síranu amonného, pH 2,5 a 2 objemy kolony 10% acetonitrilu/90% 0,1 M síranu amonného, pH 2,5. Jakmile byla kolona naplněna, byl do ní napumpován 1 objem kolony 10% acetonitrilu/90% 0,1 M síranu amonného, pH 2,5. Kolona byla vymývána lineárním gradientem acetonitrilu v 0,1 M síranu amonném, pH 2,5, při monitorování vymývaného produktu při 276 nm. Hledaný pik, částečně purifikovaný des(B30)-lidský inzulin byl získán sebráním zvolené frakce. Tento vzorek částečně purifikovaného des(B30)-lidského inzulinu byl zředěn na 1,28 litrů purifikovanou vodou, pH 3,5 a vložen do kationtoměničové kolony 1 x 29 cm S HyperD F (Biosepra) předem naplněné 1 objemem kolony 30% acetonitrilu/70% 0,1% TFA/0,5 M NaCl, pH 1,9 a 2 objemy kolony 30% acetonitrilu/70% 0,1% TFA, pH 2,3. Po naplnění byla kolona naplněna 1 objemem kolony 30% acetonitrilu/70% 0,1% TFA, pH 2,3, potom vymývána lineárním gradientem NaCl v 30% acetonitrilu/70% 0,1% TFA, pH 1,9 až 2,3, zatímco vymývaný produkt byl monitorován při 276 nm. Zvolené frakce obsahující purifikovaný des(B30)-lidský inzulin byly sebrány, zředěny 2,5X purifikovanou vodou a vloženy do kolony 35-c.c. CS SepPak (Waters, Milford, MA), předem čištěné a upravené 2 objemy kolony acetonitrilu, 2 objemy kolony směsi 60% acetonitril/40% 0,1% TFA a 2 objemy kolony

směsi 10% acetonitril/90% 0,1% TFA. Po naplnění kolony SepPak byla tato propláchnuta 3 objemy kolony směsi 10% acetonitril/90% 0,1% TFA a potom vymývána 2 objemy kolony směsi 60% acetonitril/40% 0,1% TFA. Lyofilizovaný vymytý produkt dal 500 mg. Analytická HPLC ukázala hlavní pík s více než 95%. Elektrosprejová hmotová spektroskopie (ESMS) purifikovaného proteinu ukázala molekulovou hmotnost 5706,5 (teorie 5707).

#### Příprava 22

##### Králičí inzulín

Králičí inzulín byl připraven jak je popsáno v Chance, R. E. a kol. [Proinsulin, Insulin, C-Peptide, Baba, S. a kol. (Editoři), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, str. 99-105 (1979)].

#### Příprava 23

##### Asp(B28)-analog lidského inzulínu

Asp(B28)-lidský inzulín byl připraven a purifikován v zásadě postupem podle příkladů 31 a 32 v Chance, R. E. a kol. (U. S. patent č. 5,700,662, vydaný 23. prosince 1997); citace je zde výslovně uvedena jako reference. Des(B23-30)-lidský inzulín [Bromer, W. W. a Chance, R. E., Biochim. Biophys. Acta, 133:219-223 (1967), která je zde zahrnuta jako reference] a syntetický oktapeptid Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Asp-Lys(Tfa)-Thr byly kondenzovány použitím trypsinově podporované semisyntézy, purifikovány gelovou filtrací a HPLC s obrácenými fázemi, zpracovávány 15% hydroxidem amonným (objemově) po dobu čtyř hodin při teplotě okolí pro

odstranění trifluoracetátu (Tfa) blokujícího skupinu Lys(B29), purifikovány HPLC s obrácenými fázemi a lyofilizovány.

#### Příprava 24

#### Syntézy derivatizovaných proteinů

Následující text je náčrt syntézy jistých derivatizovaných proteinů, používaných pro přípravu precipitátů a mikrokryсталů podle předloženého vynálezu. Text by měl být čten spolu s daty v Tabulce 10 uvedené níže.

Odměřené množství purifikovaného inzulínu nebo inzulínového analogu bylo rozpuštěno v odměřeném objemu dimethylsulfoxidu (DMSO) za míchání. Potom byl přidán odměřený objem hydrochloridu tetramethylguanidinu (TMG) a roztok byl důkladně promíchán. V oddělené nádobě bylo rozpuštěno odměřené množství N-acyl-sukcinimidu (NAS) v odměřeném objemu DMSO. Odměřený objem druhého roztoku byl přidán do prvního roztoku. Reakce byla prováděna při teplotě okolí a postup reakce byl monitorován analýzou vzorků reakční směsi použitím HPLC. Reakce byla zastavena odměřeným objemem ethanolaminu a potom okyselením na pH 2-3.

Reakční směs byla potom podrobena purifikaci použitím samotné chromatografie s obrácenými fázemi nebo použitím kombinace kationtoměničové chromatografie následované chromatografií s obrácenými fázemi. Purifikace chromatografií s obrácenými fázemi byla prováděna použitím systému FPLC (Pharmacia) s UV detekcí při 214 nm nebo při 280 nm, frakčním kolektorem, 2,2 x 25 cm nebo 5 x 30 cm C18

kolonou, průtokem 2,5 nebo 5 ml/min při teplotě okolí. Kapalně fáze byly směsi Roztoku A [10,1% trifluoroctová kyselina (TFA) ve směsi 10:50 acetonitril:voda (obj.:obj.)] a Roztoku B [0,1% trifluoroctová kyselina (TFA) ve směsi 70:30 acetonitril:voda (obj.:obj.)], které byly vhodné pro vymývání separaci hledaných látek. Typicky byla kolona ekvilibrována a plněna 100% Roztokem A. Potom byl lineární gradient do jisté části Roztoku B použit pro odpovídající separaci reakčních produktů. Frakce obsahující produkt byly shromážděny. Obměny purifikačních metod spadají do obvyklých znalostí v oboru.

Tabulka 10 uvedená níže podává experimentální data, získaná podle nástinu způsobu uvedeného výše, pro syntézu derivatizovaných proteinů, které byly použity pro přípravu různých provedení předloženého vynálezu. Výchozí proteiny byly připraveny jak je popsáno výše nebo obvyklými způsoby. Pro získání vysoce čistých výchozích proteinů pro syntézy uvedené dále byly použity konvenční purifikační způsoby. Syntéza inzulinu, inzulinových analogů a proinzulinu spadá do běžných postupů v oboru a může být dosažena použitím rekombinantní exprese, semisyntézy nebo syntéza v pevné fázi a následující kombinací řetězců. Purifikace syntetizovaných proteinů na čistotu potřebnou pro přípravu derivátů použitých podle předloženého vynálezu se provádí konvenčními purifikačními technikami.

Molekulová hmotnost purifikovaného derivátu byl potvrzena hmotovou spektrometrií, konkrétně elektrosprejovou hmotovou analýzou (ESMS). Určení acylačního místa bylo založeno buď na chromatografické analýze ("HPLC") nebo na N-terminální

analýze ("N-terminální") nebo na obou.

Tabulka 10. Souhrn syntézy různých derivatizovaných proteinů.

Výchozí protein	lidský inzulín	lidský inzulín	lidský inzulín
Hmotnost proteinu (mg)	141,3	1,080	120
DMSO (ml)	42	30	36
TMG ( $\mu$ l)	30,5	233	25,9
NAS acylační řetězec	n-hexanoyl	n-oktanoyl	n-dodekanoyl
Hmotnost NAS (mg)	7,76	85,7	9,22
Objem DMSO (ml)	1,0	1,0	0,701
Objem přidaného NAS roztoku (ml)	0,494	0,785	0,701
Doba reakce (min)	40	105	40
Objem ethanolaminu ( $\mu$ l)	20	100	120
Celkový výtěžek (%)	40	33	36
Mol. hmot. (theorie)	5906,0	5933,3	5990,0
Mol. hmot. (ESMS)	5906,8	5933,9	5990,0
HPLC čistota (%)	96	94	98
Acylační místo (HPLC)	Nε	Nε	Nε
Acylační místo (N- terminální)	Nε	Nε	Nε

Výchozí protein	lidský inzulín	lidský inzulín	lidský inzulín
Hmotnost proteinu (mg)	194	2040	2050
DMSO (ml)	60	62	58
TMG ( $\mu$ l)	41,9	441	443
NAS acylační řetězec	n-tetra- dekanoyl	n-butyryl	n-hexanoyl
Hmotnost NAS (mg)	23,4	269,3	209
Objem DMSO (ml)	1,0	1,0	2,0
Objem přidaného NAS roztoku (ml)	0,756	0,29	1,44
Doba reakce (min)	20	30	30
Objem ethanolaminu ( $\mu$ l)	5	100	100
Celkový výtěžek (%)	45	27*	22
Mol. hmot. (theorie)	6018,1	5877,8	5905,9
Mol. hmot. (ESMS)	6018,2	5877,8	5906,0
HPLC čistota (%)	98	94	93
Acylační místo (HPLC)	Nε	Nε	Nε
Acylační místo (N- terminální)	Nε	Nε	Nε

\* purifikace zahrnovala nejprve HPLC s obrácenými fázemi, potom kationtoměničovou HPLC, potom HPLC s obrácenými fázemi

Dále následuje nástin syntézy dodatečných derivatizovaných proteinů. Nástin by měl být čten spolu s daty v Tabulce 11 uvedené dále, se kterými dává úplný popis syntetických schémat. Odměřená dávka purifikovaného inzulinu nebo inzulinového analogu byla rozpuštěna jeho přidáním do odměřeného objemu 50 mM kyseliny borité, pH 2,57. Odměřený objem acetonitrilu, stejný jako objem roztoku kyseliny borité byl potom pomalu přidán za míchání. "Objem rozpouštědla" je součet objemů kyseliny borité a acetonitrilu. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu mezi 10,2 a 10,5 použitím NaOH. V oddělené nádobě bylo rozpuštěno odměřené množství N-acyl-sukcinimidu ("NAS") v odměřeném objemu DMSO. Odměřený objem druhého roztoku byl přidán do prvního roztoku. Reakce byla prováděna při teplotě okolí, pH bylo udržováno nad 10,2 jak bylo nutné a postup reakce byl monitorován analýzou vzorků reakční směsi použitím HPLC. Reakce byla zastavena okyselením na pH 2-3. Reakční směs byla potom podrobena purifikaci použitím chromatografie s obrácenými fázemi, jak je popsáno výše.

Tabulka 11 přináší experimentální data, získaná výše uvedeným způsobem, pro syntézu derivatizovaných proteinů, které byly použity pro přípravu různých provedení předloženého vynálezu. Molekulová hmotnost purifikovaného derivátu byl potvrzena hmotovou spektrometrií, konkrétně elektrosprejovou hmotovou analýzou (ESMS). Určení acylačního místa bylo založeno buď na chromatografické analýze ("HPLC") nebo na N-terminální analýze ("N-terminální") nebo na obou.

Tabulka 11. Přehled syntézy různých derivatizovaných

proteinů.

Výchozí protein	lidský inzulín	lidský inzulín	lidský inzulín
Hmotnost proteinu (mg)	2170	2420	2250
Rozpouštědlo (ml)	200	240	200
NAS acylační řetězec	n-butyryl	n-pentanoyl	n-oktanoyl
Hmotnost N-acyl- sukcinimidu (mg)	108,7	1155	173
Objem DMSO (ml)	1,0	5	1,0
Objem přidaného NAS roztoku (ml)	0,955	0,719	0,81
Doba reakce (min)	40	40	40
Celkový výtěžek (%)	25	12	37
Mol. hmot. (theorie)	5877,8	5891,8	5933,9
Mol. hmot. (ESMS)	5877,7	5891,9	5933,8
HPLC čistota (%)	96 95	96	
Acylační místo (HPLC)	Ne	Ne	Ne

Výchozí protein	lidský inzulín	lidský inzulín	lidský inzulín
Hmotnost proteinu (mg)	1960	2750	1040
Rozpouštědlo (ml)	200	200	200
NAS acylační řetězec	n-nonanoyl	n-dodekanoyl	n-tetra- dekanoyl
Hmotnost N-acyl- succinimidu (mg)	145,8	19,9	10,3
Objem DMSO (ml)	1,0	1,0	1,0
Objem přidaného NAS roztoku (ml)	0,887	0,771	0,885
Doba reakce (min)	40	30	35
Celkový výtěžek (%)	35	14	39
Mol. hmot. (theorie)	5947,9	5990,0	6018,1
Mol. hmot. (ESMS)	5948,1	5989,9	6018,1
HPLC čistota (%)	94	93	94
Acylační místo (HPLC)	Nε	Nε	Nε

Výchozí protein	ovčí inzulín	hovězí inzulín	prasečí inzulín
Hmotnost proteinu (mg)	312	275	200
Rozpouštědlo (ml)	100	100	100
NAS acylační řetězec	n-hexanoyl	n-hexanoyl	n-oktanoyl
Hmotnost N-acyl- succinimidu (mg)	27,2	19,9	16,4
Objem DMSO (ml)	1,0	1,0	1,0
Objem přidaného NAS roztoku (ml)	0,644	0,771	0,764
Doba reakce (min)	45	30	82
Celkový výtěžek (%)	31	50	41
Mol. hmot. (theorie)	5801,7	5831,8	5903,9
Mol. hmot. (ESMS)	5801,8	5831,7	5903,9
HPLC čistota (%)	96	96	96
Acylační místo (HPLC)	Nε	Nε	Nε

Výchozí protein	králičí inzulín	des(B30)- lidský inzulín	AspB28- lidský inzulín
Hmotnost proteinu (mg)	211,4	205,3	132,3
Rozpouštědlo (ml)	100	20	20
NAS acylační řetězec	n-oktanoyl	n-oktanoyl	n-oktanoyl
Hmotnost N-acyl- succinimidu (mg)	16,8	21,5	11,5
Objem DMSO (ml)	1,0	0,5	1,0
Objem přidaného NAS roztoku (ml)	0,786	0,303	0,715
Doba reakce (min)	57	40	85
Celkový výtěžek (%)	39	47	32
Mol. hmot. (theorie)	5919,9	5833,6	5951,9
Mol. hmot. (ESMS)	5920,0	5832,7	5952,2
HPLC čistota (%)	95	96	94
Acylační místo (HPLC)	Nε	Nε	Nε

Výchozí protein	GlyA21,ArgB3 1,ArgB32- analog lidského inzulínu	lidský inzulín	des(B27)- analog lidského inzulínu
Hmotnost proteinu (mg)	86,2	134,8	44,8
Rozpuštědlo (ml)	10	20	7
NAS acylační řetězec	n-oktanoyl	2-metnyl- hexanoyl	n-oktanoyl
Hmotnost N-acyl- succinimidu (mg)	22,4	749	3,6
Objem DMSO (ml)	0,5	4,93*	1,0
Objem přidaného NAS roztoku (ml)	0,115	0,052	0,993
Doba reakce (min)	40	45	40
Celkový výtěžek (%)	45	45	53
Mol. hmot. (theorie)	6189,2	5919,9	5832,8
Mol. hmot. (ESMS)	6189,2	5919,9	5832,9
HPLC čistota (%)	97	96	93
Acylační místo (HPLC)	Nε	Nε	Nε

\* Rozpuštěn v acetonitrilu namísto v DMSO.

Výchozí protein	lidský inzulín	lidský inzulín	lidský inzulín
Hmotnost proteinu (mg)	160	147,7	2080
Rozpouštědlo (ml)	20	20	200
NAS acylační řetězec	4-methyl- oktanoyl	3-metnyl- dekanoyl	n-oktanoyl
Hmotnost N-acyl- succinimidu (mg)	715	22,5	146,7
Objem DMSO (ml)	4,97*	1,0*	1,0*
Objem přidaného NAS roztoku (ml)	0,0734	0,609	0,884
Doba reakce (min)	60	45	40
Celkový výtěžek (%)	54	38	5,3**
Mol. hmot. (theorie)	5947,9	5976,0	6060,1
Mol. hmot. (MS) ***	5947,8	5976,2	6060,5
HPLC čistota (%)	96	96	92
Acylační místo (HPLC)	Nε	Nε	A1-Nα, Nε

\* Rozpuštěn v acetonitrilu namísto v DMSO.

\*\* Výtěžek derivátu A1-Nα, B29-Nε-diacyl-lidského inzulínu

\*\*\* Určeno matricově podporovanou laserovou desorpční ionizační (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI) hmotovou spektroskopií namísto elektrosprejové hmotové spektroskopie

Výchozí protein	des(B30)- analog lidského inzulínu	lidský inzulín	lidský inzulín
Hmotnost proteinu (mg)	205,3	1960	2110
Rozpouštědlo (ml)	20	200	200
NAS acylační řetězec	n-oktanoyl	n-nonanoyl	n-dekanoyl
Hmotnost N-acyl- succinimidu (mg)	21,5	145,8	150,5
Objem DMSO (ml)	0,5	1,0	1,0
Objem přidaného NAS roztoku (ml)	0,089	0,0887	0,975
Doba reakce (min)	40	40	60
Celkový výtěžek (%)	11,0	11,5	11,1
Mol. hmot. (theorie)	5959,5	6088,2	6116,2
Mol. hmot. (MS)	5959,3	6088,3	6116,4
HPLC čistota (%)	96	92	92
Acylační místo (HPLC)	A1-N $\alpha$ , N $\epsilon$	A1-N $\alpha$ , N $\epsilon$	A1-N $\alpha$ , N $\epsilon$

Dále následuje obecný nástin syntetického schématu dodatečných derivatizovaných proteinů. V konkrétních instancích by nástin měl být čten spolu s daty v Tabulce 12 uvedené dále, se kterými dává úplný popis syntetických schémat pro konkrétní derivatizované proteiny. Odměřené množství purifikovaného inzulinu nebo inzulinového analogu bylo rozpuštěno jeho přidáním do odměřeného objemu DMSO. pH roztoku bylo upraveno 10 ekvivalenty tetramethylguanidinu.

V oddělené nádobě bylo odměřené množství N-acyl-sukcinimidu ("NAS") rozpuštěno v odměřeném objemu DMSO. Odměřený objem druhého roztoku byl přidán do prvního roztoku pro získání 1,9-násobného molárního přebytku N-acyl-succinimidu. Reakce byla prováděna při teplotě okolí a postup reakce byl monitorován analýzou vzorků reakční směsi použitím HPLC. Reakce byla zastavena 20 mikrolitry ethanolinu, směs byla ochlazená v lázni led/voda a zředěna 2,1-krát pomocí 0,1N HCl. Reakční směs byla potom vystavena desalifikaci v chromatografické koloně s obrácenými fázemi použitím následujícího protokolu:

- 1) kolona byla navlhčena 100% acetonitrilem, potom byla promývána použitím tří nebo čtyř objemů kolony směsi 0,1% TFA/70% acetonitril (Pufir B); a nakonec byla promývána použitím čtyř až pěti objemů kolony směsi 0,1% TFA/10% acetonitril (Pufir A);
- 2) byly vloženy zředěné reakční směsi a kolona byla znovu promývána pěti až šesti objemy kolony Pufiru A; a
- 3) derivatizovaný protein byl vymýván průchodem pěti až šesti objemů kolony Pufiru B kolonou. Kapalina shromážděná v průběhu vymývání byla zmrazena a potom lyofilizována. Lyofilizovaný surový produkt (86,1 mg) byl potom podroben opětné purifikaci použitím chromatografie s obrácenými fázemi, jak je popsáno výše.

Tabulka 12 přináší experimentální data, získaná výše uvedeným způsobem, pro syntézu derivatizovaných proteinů, které byly použity pro přípravu různých provedení předloženého vynálezu. Molekulová hmotnost purifikovaného derivátu byla potvrzena hmotovou spektrometrií, konkrétně

elektrosprejovou hmotovou analýzou (ESMS). Určení acylačního místa bylo založeno buď na chromatografické analýze ("HPLC").

Tabulka 12. Přehled syntézy různých derivatizovaných proteinů.

Výchozí protein	lidský inzulin
Hmotnost proteinu (mg)	179
DMSO pro rozpuštění lidského inzulinu (ml)	20
NAS acylační řetězec	1,4-dichlorofenylthioacetyl
Hmotnost N-acyl-succinimidu (mg)	30
Objem DMSO (ml)	1,0
Objem přidaného NAS roztoku (ml)	0,412
Doba reakce (min)	50
Celkový výtěžek (%)	32,2*
Mol. hmot. (theorie)	6026,78
Mol. hmot. (ESMS)	6026,9
HPLC čistota (%)	96
Acylační místo (HPLC)	Nε

\* Výtěžek vypočtený na základě hmotnosti desalifikovaného a lyofilizovaného surového produktu.

## Pokus 1

### Doba působení kokryystalů u psů

Doba působení tří kokryystalických kompozic podle předloženého vynálezu byla určena u normálních psů, kteří dostávali konstantní infúzi somatostatinu pro vytvoření přechodného diabetického stavu. První kokryystalický přípravek, obsahující lidský inzulin a B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulin, byl připraven v zásadě jak je popsáno pro Přípravek D v Přípravě 16 výše a byl podáván podkožně v dávce 3 nmol/kg ("8753"). Druhý kokryystalický přípravek, obsahující lidský inzulin a B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulin, byl připraven jak je popsáno pro Přípravek D v Přípravě 16 výše a byl podáván podkožně v dávce 2,5 nmol/kg ("8152,5"). Nakonec třetí kokryystalický přípravek, obsahující lidský inzulin a B29-Nε-dekanoyl-lidský inzulin, byl připraven jak je popsáno v Přípravě 14 výše a byl podáván podkožně v dávce 2,5 nmol/kg ("10252,5"). Data byla porovnávána s daty získanými při stejném způsobu podávání Humulinu N (2,0 nmol/kg "NPH"), hovězího/prasečího Ultralente inzulinu (3 nmol/kg, "BP-UL") a solného roztoku.

Pokusy byly prováděny u chronicky kanylovaných samců a samic psů beagle (Marshall Farms, North Rose, NY) o hmotnosti 10-17 kg bez narkózy a po hladovění přes noc. Alespoň deset dní před prováděním studie byla zvířata anesteziována isofluranem (Anaquest, Madison, WI) a silikonové katetry, připojené k vaskulárním přístupovým portům (V-A-P™, Access Technologies, Norfolk Medical, Skokie, IL) byly vloženy do femorální tepny a femorální cévy. Katetry byly naplněny roztokem glycerol/heparin (3:1, objemově; konečná

koncentrace heparinu 250 KIU/ml; glycerol od Sigma Chemical Co., St. Louis, MO a heparin od Elkins-Sinn, Inc., Cherry Hill, NJ) pro zabránění okluze katetru a zranění byla uzavřena. Kefzol (Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN) byl podáván pre-operativně (20 mg/kg, IV a 20 mg/kg, I.M.) a Keflex byl podáván post-operativně (250 mg, p.o. jednou denně po sedm dní) pro prevenci infekcí. Torbugesic (1,5 mg/kg, I.M.) byl podáván post-operativně pro zmírnění bolesti.

Krev byla odebrána těsně před studií pro určení zdravotního stavu zvířete. Pouze zvířata s hematokrity nad 38% a počtem leukocytů pod 16000/mm<sup>3</sup> byla použita v pokusu (hematologický analyzátor: Cell-Dyn 900, Sequoia-Turner, Mountain View, CA).

Ráno v den pokusu byly použity porty (Access Technologies, Norfolk Medical, Skokie, IL); obsahy katetrů byly odsáty; katetry byly propláchnuty solným roztokem (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL); pes byl umístěn do klece; a extenzní linky (chráněné pomocí připojení z nerezové oceli a připojené k otočnému systému [Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA] ) byly připojeny k linkám portů.

Psům bylo ponecháno alespoň 10 minut na aklimatizaci na prostředí klece před odebráním vzorku krve z artérie, který byl odebrán pro určení na lačno koncentrací inzulinu, glukózy a glukagonu (doba = -30 minut). V tento okamžik započala kontinuální IV infúze cyklického somatostatinu (0,65 µg/kg/min; BACHEM California, Torrance, CA), která pokračovala po následujících 30,5 hodin. Třicet minut po

započetí infúze (doba = 0 minut), byl odebrán vzorek arteriální krve a podkožní jednorázová injekce testované látky nebo vehikula byla injektována do dorsální části krku. Vzorky arteriální krve byly odebírány každé 3 hodiny poté pro určení koncentrací glukózy v plasmě a koncentrací inzulínu a každých 6 hodin pro určení koncentrací glukagonu v plasmě. Celá studie trvala 30 hodin.

Vzorky arteriální krve byly uchovávány ve vakuových trubicích pro odběr krve, obsahujících disodný EDTA (Terumo Medical Corp., Elkton, ND) a byly okamžitě uloženy na led. Část krevního vzorku (1,5 ml) byla přenesena do polypropylenové trubice, obsahující 40  $\mu$ l aprotininu (10,000 KIU/ml; Trasylol, Miles, Inc., Diagnostics Division, Kankakee, IL) jako příprava pro určení koncentrace glukagonu v plasmě. Vzorky byly centrifugovány a výsledná plasma byla přenesena do polypropylenových testovacích trubicí a uchovávána na ledu po dobu trvání studie.

Koncentrace glukózy v plasmě byly určeny v den studie použitím glukóza oxidázy s komerčním glukózovým analyzátozem. Vzorky pro další testy byly uchovávány při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  až do okamžiku analýzy. Koncentrace inzulínu byly určeny použitím dvojitého protilátkového radioimunologického testu. Koncentrace glukagonu byly určeny použitím a radioimunologické soupravy (LINCO Research, Inc., St. Charles, MO).

Na závěr pokusu byly katetry propláchnuty čerstvým solným roztokem, ošetřeny Kefzolem (20 mg/kg) a naplněny směsí glycerol/heparin; antibiotikum (Keflex; 250 mg) bylo

podáváno p.o. Pro minimalizaci počtu zvířat a pro umožnění párování v databázi, pokud to bylo možné, byla zvířata použita vícenásobně. Opakované pokusy se zvířaty byly prováděny minimálně s týdenním odstupem.

1:3 kokrystal lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu měly dobu působení o 9 hodin delší než NPH lidský inzulín (24 hodin proti 15 hodinám) u vyšší dávky (8753) a dobu působení o 6 hodin delší než NPH lidský inzulín (21 hodin proti 15 hodinám) u nižší dávky (8752,5). Doba působení byla určena statistickým porovnáním střední hladiny glukózy se střední hladinou u kontrolní skupiny (solný roztok). Profily glukózy pro 1:3 kokrystaly přípravků lidského inzulínu a B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu byly blíže očekávanému profilu bazálního inzulínu než byl profil pro NPH-lidský inzulín. 1:3 kokrystaly měly také vyšší aktivitu a více žádoucí profil glukózy než tomu bylo u hovězího/prasečího Ultralente inzulínu. Redukce glukózy v krvi ve srovnání s kontrolní skupinou (solný roztok), způsobená kokrystalickými přípravky, přetrvávala déle než redukce způsobená tímto hovězím/prasečím Ultralente inzulínem.

3:1 kokrystalický přípravek lidského inzulínu a B29-Nε-dekanoyl-lidského inzulínu (10252,5) měl dobu působení o 9 hodin delší než NPH lidský inzulín (24 hodin proti 15 hodinám). Rozdíl byl statisticky významný ( $p < 0,05$ ). U stejných zvířat měl 3:1 kokrystalický přípravek lidského inzulínu a B29-Nε-dekanoyl-lidského inzulínu (2,5 nmol/kg, SC) dobu působení o 6 hodin delší než Humulin U nebo hovězí U přípravky (24 hodin proti 18 hodinám). rozdíly byly také

statisticky významné ( $p < 0,05$ ). Profil glukózy pro kokryсталické přípravky byl blíže očekávanému profilu bazálního inzulínu než byl profil pro NPH-lidský inzulín. Kromě toho variabilita doby působení u psů byla nejmenší, když byly podávány 3:1 kokryсталy.

Závěrem je možno konstatovat, že pokus prokázal, že kokryсталy podle předloženého vynálezu jsou účinné pro kontrolu hladiny glukózy po prodlouženou dobu u psů. Pokusy také podporují závěr, že kokryсталy podle předloženého vynálezu budou účinné pro kontrolu glukózy přes noc u pacientů s diabetem typu 2 nebo jako bazální složka bazální/jednorázové inzulínové terapie u pacientů s diabetem typu 1 nebo typu 2. Pokusy také naznačují, že tyto přípravky mohou vytvářet méně variabilní odezvy než komerčně dostupné inzulínové přípravky.

## Pokus 2

### Doba působení kokryсталů u prasat

Studie byly prováděny na normálních samicích prasat o hmotnosti 17-25 kg a bez narkózy. Arteriální (karotida nebo femorální tepna) katetr byl chirurgicky preimplantován pro odebírání vzorků spolu s jugulární cévní linkou pro podávání somatostatínu. Před pokusem byla kanylovaná prasata držena bez potravy po 22-24 hodin. Podkožní inzulínové injekce byly podány v místě měkké kůže za uchem v dávce 3,0 nmol/kg (0,5 jednotek/kg). Somatostatin byl podáván současně v dávce 0,3  $\mu\text{g/kg/min}$  (rozpuštěný v 0,9 % NaCl obsahující 1% lidský sérový albumin, Miles Canada, Etobicoke, ON) pro potlačení

endogenní sekrece inzulínu. Takřka úplná normoglykemie byla udržována infúzí 20% dextrózy s různými rychlostmi, s častým monitorováním koncentrací glukózy. Hladiny glukózy v plasmě byly určeny v čerstvých vzorcích plasmy v den studie použitím glukóza oxidázového způsobu použitím komerčního analyzátoru glukózy.

V euglycemické svěřkové studii byl podáván přípravek mikrokryсталů podle vynálezu, obsahující 1:3 inzulín:B29-Ne-oktanoyl-lidský inzulín, podkožně v dávce 0,5 U/kg (ekvivalent zhruba 3 nmol/kg) na počátku studie (čas 0) pěti prasatům. Rychlost infúze glukóza požadovaná k udržování euglykemie (nastavený bod = zhruba 90 mg/dl) byla určována průběžně. Kontrolní skupina dostávala Humulin N (U100) podkožní cestou a se stejnou dávkou (n=6). Současná infúze somatostatínu (0,3  $\mu$ g/kg/min) byla udržována po celou dobu trvání pokusu. U mikrokryсталů podle předloženého vynálezu rychlost infúze glukózy rostl neustále po první dvě hodiny, dosáhl maxima zhruba 7 mg/kg/min. Od toho okamžiku po dalších zhruba 17,5 hodin rychlost infúze glukózy klesala velmi pravidelně na zhruba 0,5 mg/kg/min. Po většinu doby mezi 17,5 hodinami a koncem studie po 24 hodinách zůstávala rychlost infúze glukózy v rozmezí mezi zhruba 0,5 a zhruba 2 mg/kg/min. Ve srovnání s tím střední rychlost infúze glukózy v kontrolní skupině (Humulin NPH) stále rostla a dosáhla maximum zhruba 14 mg/kg/min zhruba 3 hodiny po podávání. Od té doby rychlost infúze glukózy klesala na zhruba 7 mg/kg/min po zhruba 4,5 hodin a na zhruba 5 mg/kg/min po 13 hodin po podávání. Žádná další data nebyla určována u kontrolní skupiny. Tyto výsledky jsou konsistentní se závěrem, že mikrokryсталický přípravek obsahující inzulín a

B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulin v 1:3 molárním poměru měl plošší glukodynamický profil než tomu bylo u inzulínu NPH.

### Pokus 3

Doba působení kokrystalů u krys

Přípravek mikrokystalů podle vynálezu sestával z 1:3 inzulínu:B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu a byl testován u BBDP/Wor krys, geneticky charakterizovaného zvířecího modelu, který je pěstován a dostupný od University of Massachusetts Medical Center (Worcester, MA) ve spojení s Biomedical Research Models, Inc. (Rutland, MA). DPBB/Wor krysí linie je náchylná k diabetu a vykazuje inzulinově závislý (autoimunní) diabetes mellitus. Všechny přípravky byly podávány podkožně v dávce 0,9 U na 100 g tělesné hmotnosti.

Samci BBDP/Wor krys, stáří 4-5 měsíců, udržovaní na dlouho působícím inzulínu (PZI), byly náhodně rozděleny do pěti pokusných skupin A, B, C, D a E. Skupina A (n=22) byla ošetřována po tři dny U40 lidským inzulínem ultralente (Humulin UL); skupina B (n=18) byla ošetřována po tři dny U40 přípravkem Iletin Ultralente (65% hovězí inzulín, 35% prasečí inzulín); skupina C (n=10) byla ošetřována po tři dny přípravkem mikrokystalů obsahujícím 1:3 inzulín:B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulín, připraveným jak je popsáno výše; skupina D (n=21) byla ošetřována přípravkem mikrokystalů obsahujícím 100% B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulín; a skupina E dostávala U40 hovězí-prasečí PZI inzulín (PZI). Každé kryse byly dávány denní injekce přípravku její skupiny po dva dny předtím, než byla určována glukóza v krvi a v den, kdy byla

určována glukóza v krvi.

Krev byla odebírána půl hodiny před podáváním testovaných přípravků. Vzorky přípravků byly injektovány v 11.30. Krev byla získána napíchnutím ocasu (bez anestezie). Vzorky byly krátce uchovávány na ledu, potom byly centrifugovány a glukóza byla určena použitím analyzátoru glukózy Beckman II. Krevní vzorky byly odebrány těsně před podáváním testovaných přípravků a 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 a 24 hodin po jejich podávání. Vycházejíce z toho, že adekvátní působení je indikováno hladinou glukózy v krvi méně než 200 mg/dl, přípravky působily zhruba 9,5 hodin (Humulin UL), zhruba 12 hodin (Iletin U), zhruba 15,5 hodin (předložený vynález), zhruba 20,5 hodin (100% B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulin) a zhruba 21,5 hodin kontrola (PZI). Z toho vyplývá, že mikrokrystalický přípravek podle předloženého vynálezu kontroloval glukózu v krvi po dobu delší než Humulin UL i Iletin U a po dobu kratší než tomu bylo u mikrokrystalického přípravku 100% B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulinu nebo PZI přípravku.

#### Pokus 4

Doby působení amorfních precipitátů u krys

Přípravky amorfních precipitátů, obsahujících 1:3 inzulin:B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulin, 1:3 inzulin:B28-Nε-oktanoyl-Lys(B28), Pro(B29)-lidský inzulin a 1:3 inzulin:B29-Nε-nonanoyl-lidský inzulin, připravené jak je popsáno v Přípravě 19, byly testovány na BBDP/Wor krysách. Všechny přípravky byly podávány podkožně v dávce 0,9 U na 100 g tělesné hmotnosti.

Samci BBDP/Wor krysy, stáří 4-5 měsíců a udržování na dlouho působícím inzulínu (PZI), byly náhodně rozděleny do pěti pokusných skupin A, B, C, D a E. Skupina A (n=7) byla ošetřována přípravkem U40 NPH (Humulin N). Skupina B (n=8) byla ošetřována přípravkem U42,4 1:3 inzulínu:B29-Nε-oktanoyl-lidského inzulínu. Skupina C (n=8) byla ošetřována U42,6 přípravkem 1:3 inzulínu:B28-Nε-oktanoyl-Lys(B28),Pro(B29)-lidského inzulínu. Skupina D(n=8) byla ošetřována U42,7 přípravkem 1:3 inzulínu:B29-Nε-nonanoyl-lidského inzulínu. Skupina E byla ošetřována U40 hovězím-prasečím PZI inzulínem (PZI).

Krev byla odebírána půl hodiny před podáváním testovaných přípravků. Vzorky přípravků byly injektovány podkožně (0,9 U/100 g tělesné hmotnosti) v 11.30. Krev byla získána napíchnutím ocasu (bez anestezie). Vzorky byly krátce uchovávány na ledu, potom byly centrifugovány a glukóza byla určena použitím komerčního analyzátoru glukózy. Krevní vzorky byly odebrány těsně před podáváním testovaných přípravků a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 a 24 hodin po jejich podávání. Vycházejíce z toho, že adekvátní působení je indikováno hladinou glukózy v krvi méně než 200 mg/dl, přípravky působily zhruba 7,5 hodin (1:3 inzulín:B28-Nε-oktanoyl-Lys(B28),Pro(B29)-lidský inzulín), zhruba 9 hodin (NPH), zhruba 15,5 hodin (1:3 inzulín:B29-Nε-oktanoyl-lidský inzulín), zhruba 16 hodin (1:3 inzulín:B29-Nε-nonanoyl-lidský inzulín) a zhruba 22,5 hodin kontrola (PZI).

Principy, výhodná provedení a způsoby práce podle

předloženého vynálezu byly popsány v předcházejícím popisu vynálezu. Předložený vynález, jehož ochrana je nárokována předloženou přihláškou však není žádným způsobem omezen na kteroukoliv konkrétní popsanou formu, neboť popsaná výhodná provedení a příklady jsou považovány za ilustrativní a nikoli za omezující. Odborník může provést variace a změny, aniž by se odchýlil od předmětu předloženého vynálezu.

Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík

P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Nerozpustná kompozice **vyznačující se tím**, že obsahuje:
  - a) protein zvolený ze souboru, zahrnujícího inzulín, inzulínový analog a proinzulín;
  - b) derivatizovaný protein zvolený ze souboru, zahrnujícího derivatizovaný inzulín, derivatizovaný inzulínový analog a derivatizovaný proinzulín;
  - c) komplexující sloučeninu;
  - d) hexamer-stabilizující sloučeninu; a
  - e) divalentní kationt kovu.
2. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že je amorfním precipitátem.
3. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že je mikrokrystalem.
4. Kompozice podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že mikrokrystal má tyčinkovitou morfologii.
5. Kompozice podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že mikrokrystal má nepravidelnou morfologii.
6. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je zvolen ze souboru, zahrnujícího mastnou kyselinou acylovaný inzulín, mastnou kyselinou acylované inzulínové analogy a mastnou kyselinou acylované proinzulíny.
7. Kompozice podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že

komplexující sloučenina je protamin, hexamer-stabilizující sloučenina je fenolové konzervační činidlo a divalentní kationt kovu je zinek.

8. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je zvolen ze souboru, zahrnujícího mastnou kyselinou acylovaný inzulín a mastnou kyselinou acylované inzulínové analogy.

9. Kompozice podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že komplexující sloučenina je protamin, hexamer-stabilizující sloučenina je fenolové konzervační činidlo a divalentní kationt kovu je zinek.

10. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je zvolen ze souboru, zahrnujícího acylovaný inzulín, acylované inzulínové analogy a acylované proinzulíny.

11. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je zvolen ze souboru, zahrnujícího acylovaný inzulín a acylované inzulínové analogy.

12. Kompozice podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je monoacylovaný ve své Lys-Nε-aminové skupině.

13. Kompozice podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že komplexující sloučenina je protamin, který je přítomen v množství zhruba 0,15 mg až zhruba 0,5 mg na 3,5 mg celkového proteinu.

14. Kompozice podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že divalentní kationt kovu je zinek, který je přítomen v množství zhruba 0,3 mole až zhruba 0,7 molu na jeden mol celkového proteinu.
15. Kompozice podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že hexamer-stabilizující sloučenina je fenolové konzervační činidlo zvolené ze souboru, zahrnujícího fenol, m-kresol, o-kresol, p-kresol, chlorkresol, methylparaben a jejich směsi a je přítomno v poměru alespoň 3 moly fenolového konzervačního činidla na 6 molů celkového proteinu.
16. Kompozice podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že protein je zvolen ze souboru, zahrnujícího inzulin a inzulinové analogy.
17. Kompozice podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že protein je inzulin.
18. Kompozice podle nároku 17, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je inzulin, který je monoacylovaný v LysB29-Nε-aminové skupině.
19. Kompozice podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je inzulin, který je acylovaný nasycenou mastnou kyselinou s přímým řetězcem.
20. Kompozice podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že nasycená mastná kyselina s přímým řetězcem je zvolena ze souboru, zahrnujícího n-hexanovou kyselinu, n-heptanovou

kyselinu, n-oktanovou kyselinu, n-nonanovou kyselinu a n-dekanovou kyselinu.

21. Kompozice podle nároku 20, **vyznačující se tím**, že molární poměr mezi proteinem a derivatizovaným proteinem je od zhruba 1:9 do zhruba 9:1.

22. Kompozice podle nároku 21, **vyznačující se tím**, že nasycená mastná kyselina s přímým řetězcem je zvolena ze souboru, zahrnujícího n-hexanovou kyselinu, n-oktanovou kyselinu a n-dekanovou kyselinu.

23. Kompozice podle nároku 22, **vyznačující se tím**, že nasycená mastná kyselina s přímým řetězcem je zvolena ze souboru, zahrnujícího n-oktanovou kyselinu a n-dekanovou kyselinu.

24. Kompozice podle nároku 23, **vyznačující se tím**, že nasycená mastná kyselina s přímým řetězcem je n-oktanová kyselina.

25. Kompozice podle nároku 24, **vyznačující se tím**, že molární poměr mezi proteinem a derivatizovaným proteinem je od zhruba 1:3 do zhruba 3:1.

26. Kompozice podle nároku 22, **vyznačující se tím**, že molární poměr mezi proteinem a derivatizovaným proteinem je od zhruba 1:9 do zhruba 1:1.

27. Kompozice podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že protein je inzulinový analog.

28. Kompozice podle nároku 27, **vyznačující se tím**, že protein je LysB28,ProB29-analog lidského inzulínu.
29. Kompozice podle nároku 27, **vyznačující se tím**, že protein je AspB28-analog lidského inzulínu.
30. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že protein je inzulín nebo inzulínový analog a derivatizovaný protein je acylovaný protein zvolený ze souboru, zahrnujícího acylovaný inzulín a acylovaný inzulínové analogy.
31. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je inzulín, který je monoacylovaný ve své LysB29-N $\epsilon$ -aminové skupině nasycenou mastnou kyselinou s přímým řetězcem.
32. Kompozice podle nároku 31, **vyznačující se tím**, že nasycená mastná kyselina s přímým řetězcem je zvolena ze souboru, zahrnujícího n-hexanovou kyselinu, n-heptanovou kyselinu, n-oktanovou kyselinu, n-nonanovou kyselinu a n-dekanovou kyselinu.
33. Kompozice podle nároku 32, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je zvolen ze souboru, zahrnujícího B29-N $\epsilon$ -hexanoyl-lidský inzulín, B29-N $\epsilon$ -oktanoyl-lidský inzulín a B29-N $\epsilon$ -dekanoyl-lidský inzulín.
34. Kompozice podle nároku 31, **vyznačující se tím**, že nasycená mastná kyselina s přímým řetězcem je zvolena ze

souboru, zahrnujícího n-dodekanovou kyselinu, n-tetradekanovou kyselinu a n-hexadekanovou kyselinu.

35. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je diacylovaný v Lys-Nε-aminové skupině a je také acylovaný v jedné N-terminální Nα-aminové skupině a kde mastná kyselina je zvolena ze souboru, zahrnujícího n-hexanovou kyselinu, n-heptanovou kyselinu, n-oktanovou kyselinu, n-nonanovou kyselinu a n-dekanovou kyselinu.

36. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je acylovaný nasycenou mastnou kyselinou s rozvětveným řetězcem.

37. Kompozice podle nároku 36, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je acylovaný nasycenou mastnou kyselinou s rozvětveným řetězcem, která má od tří do deseti atomů uhlíku ve své nejdelší větvi.

38. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je inzulinový analog, který je monoacylovaný ve své Lys-Nε-aminové skupině nasycenou mastnou kyselinou s přímým řetězcem.

39. Kompozice podle nároku 38, **vyznačující se tím**, že mastná kyselina je zvolena ze souboru, zahrnujícího n-hexanovou kyselinu, n-heptanovou kyselinu, n-oktanovou kyselinu, n-nonanovou kyselinu a n-dekanovou kyselinu.

40. Kompozice podle nároku 38, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je inzulínový analog, který je monoacylovaný v Nε-aminové skupině mastnou kyselinou, zvolenou ze souboru, zahrnujícího n-dodekanovou kyselinu, n-tetradekanovou kyselinu a n-hexadekanovou kyselinu.
41. Kompozice podle nároku 38, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je zvolen ze souboru, zahrnujícího mastnou kyselinou acylované zvířecí inzulíny, mastnou kyselinou acylované monomerní inzulínové analogy, mastnou kyselinou acylované deleční analogy a mastnou kyselinou acylované pI-posunuté inzulínové analogy.
42. Kompozice podle nároku 41, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je mastnou kyselinou acylovaný des(B30)-analog lidského inzulínu, mastnou kyselinou acylovaný LysB28,ProB29-analog lidského inzulínu nebo mastnou kyselinou acylovaný AspB28-analog lidského inzulínu.
43. Kompozice podle nároku 42, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je mastnou kyselinou acylovaný des(B30)-analog lidského inzulínu.
44. Kompozice podle nároku 43, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je B29-Nε-myristoyl-des(B30)-analog lidského inzulínu.
45. Kompozice podle nároku 42, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je mastnou kyselinou acylovaný LysB28,ProB29-analog lidského inzulínu.

46. Kompozice podle nároku 45, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je B28-Nε-myristoyl-LysB28,ProB29-analog lidského inzulínu.
47. Kompozice podle nároku 42, **vyznačující se tím**, že derivatizovaný protein je mastnou kyselinou acylovaný AspB28-analog lidského inzulínu.
48. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že molární poměr mezi proteinem a derivatizovaným proteinem je od zhruba 1:9 do zhruba 9:1.
49. Kompozice podle nároku 48, **vyznačující se tím**, že poměr je od zhruba 1:3 do zhruba 3:1.
50. Kompozice podle nároku 48, **vyznačující se tím**, že poměr je od zhruba 1:9 do zhruba 1:1.
51. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že protein je inzulín.
52. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že protein je inzulínový analog.
53. Kompozice podle nároku 52, **vyznačující se tím**, že protein je monomerní inzulínový analog.
54. Suspenzní přípravek, , **vyznačující se tím**, že zahrnuje nerozpustnou fázi a roztokovou fázi, kde nerozpustná fáze zahrnuje nerozpustnou kompozici podle nároku 1 a roztoková

fáze zahrnuje vodné rozpouštědlo.

55. Suspenzní přípravek podle nároku 54, **vyznačující se tím**, že roztoková fáze dále zahrnuje fenolové konzervační činidlo v koncentraci zhruba 0,5 mg na jeden ml až zhruba 6 mg na jeden ml roztoku, farmaceuticky přijatelný pufr a isotonické činidlo.

56. Suspenzní přípravek podle nároku 54, **vyznačující se tím**, že roztoková fáze dále zahrnuje inzulín, inzulínový analog, derivatizovaný inzulín nebo derivatizovaný inzulínový analog.

57. Suspenzní přípravek podle nároku 56, **vyznačující se tím**, že roztoková fáze zahrnuje inzulín.

58. Suspenzní přípravek podle nároku 56, **vyznačující se tím**, že roztoková fáze zahrnuje derivatizovaný inzulín.

59. Suspenzní přípravek podle nároku 56, **vyznačující se tím**, že roztoková fáze zahrnuje inzulínový analog.

60. Suspenzní přípravek podle nároku 56, **vyznačující se tím**, že inzulínový analog je monomerní inzulínový analog.

61. Suspenzní přípravek podle nároku 56, **vyznačující se tím**, že inzulínový analog je LysB28,ProB29-analog lidského inzulínu.

62. Suspenzní přípravek podle nároku 56, **vyznačující se tím**, že inzulínový analog je AspB28-analog lidského inzulínu.

63. Suspenzní přípravek podle nároku 54, **vyznačující se tím**, že roztoková fáze dále zahrnuje protein zvolený ze souboru, obsahujícího inzulín a inzulínové analogy a derivatizovaný protein zvolený ze souboru, obsahujícího derivatizovaný inzulín a derivatizované inzulínové analogy.

64. Suspenzní přípravek podle nároku 63, **vyznačující se tím**, že protein v roztokové fázi je týž jako protein, který je v nerozpustné fázi a tím, že derivatizovaný protein v roztokové fázi je týž jako derivatizovaný protein který je v nerozpustné fázi.

65. Suspenzní přípravek podle nároku 54, **vyznačující se tím**, že nerozpustná fáze sestává v zásadě z amorfního precipitátu.

66. Suspenzní přípravek podle nároku 54, **vyznačující se tím**, že nerozpustná fáze sestává v zásadě z mikrokryсталů.

67. Suspenzní přípravek podle nároku 54, **vyznačující se tím**, že nerozpustná fáze sestává ze směsi amorfního precipitátu a mikrokryсталů.

68. Suspenzní přípravek podle nároku 54, **vyznačující se tím**, že roztoková fáze dále zahrnuje zinek a protamin, ve kterém poměr zinku k celkovému proteinu v suspenzním přípravku je od zhruba 5 do zhruba 7 molů atomů zinku na jeden mol celkového proteinu a poměr protaminu k celkovému proteinu v suspenzním přípravku je od zhruba 0,25 mg do zhruba 0,5 mg na jeden mg celkového proteinu.

69. Způsob léčení diabetu, **vyznačující se tím**, že zahrnuje podávání kompozice podle nároku 1 pacientovi, který má její potřebu v množství dostatečném pro regulaci hladiny glukózy v krvi pacienta.
70. Způsob léčení hyperglykémie **vyznačující se tím**, že zahrnuje podávání kompozice podle nároku 54 pacientovi, který má její potřebu, v množství dostatečném pro regulaci hladiny glukózy v krvi pacienta.
71. Hybridní hexamerová kompozice, **vyznačující se tím**, že zahrnuje šest monomerů a zinek, ve které alespoň jeden monomer je zvolen ze souboru, zahrnujícího inzulín, inzulinové analogy a proinzulíny a alespoň jeden monomer je zvolen ze souboru, zahrnujícího derivatizovaný inzulín, derivatizované inzulinové analogy a derivatizované proinzulíny.
72. Smíšená hexamerová kompozice, **vyznačující se tím**, že zahrnuje zinek-proteinové hexamery a zinek-derivatizované proteinové hexamery, ve které zinek-proteinové hexamery zahrnují zinek a protein zvolený ze souboru, zahrnujícího inzulín, inzulinové analogy a proinzulíny a ve které zinek-derivatizované proteinové hexamery zahrnují zinek a derivatizovaný protein, zvolený ze souboru, zahrnujícího derivatizovaný inzulín, derivatizované inzulinové analogy a derivatizované proinzulíny.
73. Způsob přípravy nerozpustné kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

a) rozpuštění proteinu, derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, které má pH umožňující vytváření hexamerů, a

b) přidání komplexující sloučeniny.

74. Způsob přípravy nerozpustné kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

a) rozpuštění proteinu, derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, které má pH, které neumožňuje vytváření hexamerů,

b) úprava pH na hodnotu v rozmezí mezi zhruba 6,8 a zhruba 7,8; a

c) přidání komplexující sloučeniny.

75. Způsob přípravy nerozpustné kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

a) rozpuštění proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, které má pH umožňující vytváření hexamerů;

b) odděleně rozpuštění derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, které má pH umožňující vytváření

hexamerů;

c) důkladné vzájemné smíchání roztoků z kroků a) a b); a

d) přidání komplexující sloučeniny do roztoku vytvořeného v kroku c).

76. Způsob přípravy nerozpustné kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

a) rozpuštění proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny, divalentního kationtu kovu a komplexující sloučeniny ve vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH, při kterém nenastává precipitace;

b) odděleně rozpuštění derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny, divalentního kationtu kovu a komplexující sloučeniny ve vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH, při kterém nenastává precipitace;

c) důkladné vzájemné smíchání roztoků z kroků a) a b); a

d) úprava hodnoty pH roztoku z kroku c) na hodnotu, při které nastává precipitace.

77. Způsob přípravy nerozpustné kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

a) rozpuštění proteinu, derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny, divalentního kationtu kovu a komplexující sloučeniny ve vodném rozpouštědle, kde výsledný

roztok má pH, při kterém nenastává precipitace; a

b) úprava hodnoty pH roztoku z kroku a) na hodnotu, při které nastává precipitace.

78. Způsob přípravy nerozpustné kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

a) rozpuštění proteinu, derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH, při kterém nenastává precipitace pokud je přidáno komplexující činidlo;

b) přidání komplexující sloučeniny; a

c) úprava hodnoty pH roztoku z kroku b) na hodnotu, při které nastává precipitace.

75. Způsob přípravy nerozpustné kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

a) rozpuštění proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH, při kterém nenastává precipitace, pokud je přidána komplexující sloučenina;

b) odděleně rozpuštění derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH, při kterém nenastává precipitace, pokud je přidána komplexující sloučenina;

- c) důkladné vzájemné smíchání roztoků z kroků a) a b);
- d) přidání komplexující sloučeniny do roztoku z kroku c); a
- e) úprava hodnoty pH roztoku z kroku d) na hodnotu, při které nastává precipitace.

80. Způsob přípravy nerozpustné kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

- a) rozpuštění proteinu, proteinového derivátu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH, při kterém nenastává precipitace, pokud je přidána komplexující sloučenina;
- b) úprava hodnoty pH roztoku z kroku a) na hodnotu, při které dojde k precipitaci, pokud je přidána komplexující sloučenina; a
- c) přidání komplexující sloučeniny do roztoku z kroku b).

81. Způsob přípravy nerozpustné kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

- a) rozpuštění proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH, při kterém nenastává precipitace, pokud je přidána komplexující sloučenina;

b) odděleně rozpuštění derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, kde výsledný roztok má pH, při kterém nenastává precipitace, pokud je přidána komplexující sloučenina;

c) důkladné vzájemné smíchání roztoků z kroků a) a b);

d) úprava hodnoty pH roztoku z kroku c) na hodnotu, při které dojde k precipitaci, pokud je přidána komplexující sloučenina; a

e) přidání komplexující sloučeniny do roztoku z kroku d).

82. Způsob přípravy hybridních hexamerů, **vyznačující se tím**, že zahrnuje rozpuštění proteinu, derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, které má pH umožňující vytváření hexamerů.

83. Způsob přípravy hybridních hexamerů, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

a) rozpuštění proteinu, derivatizovaného proteinu, hexamer-stabilizující sloučeniny a divalentního kationtu kovu ve vodném rozpouštědle, které má pH, které neumožňuje vytváření hexamerů, a

b) úprava pH na hodnotu v rozmezí mezi zhruba 6,8 a zhruba 7,8.

Zastupuje:

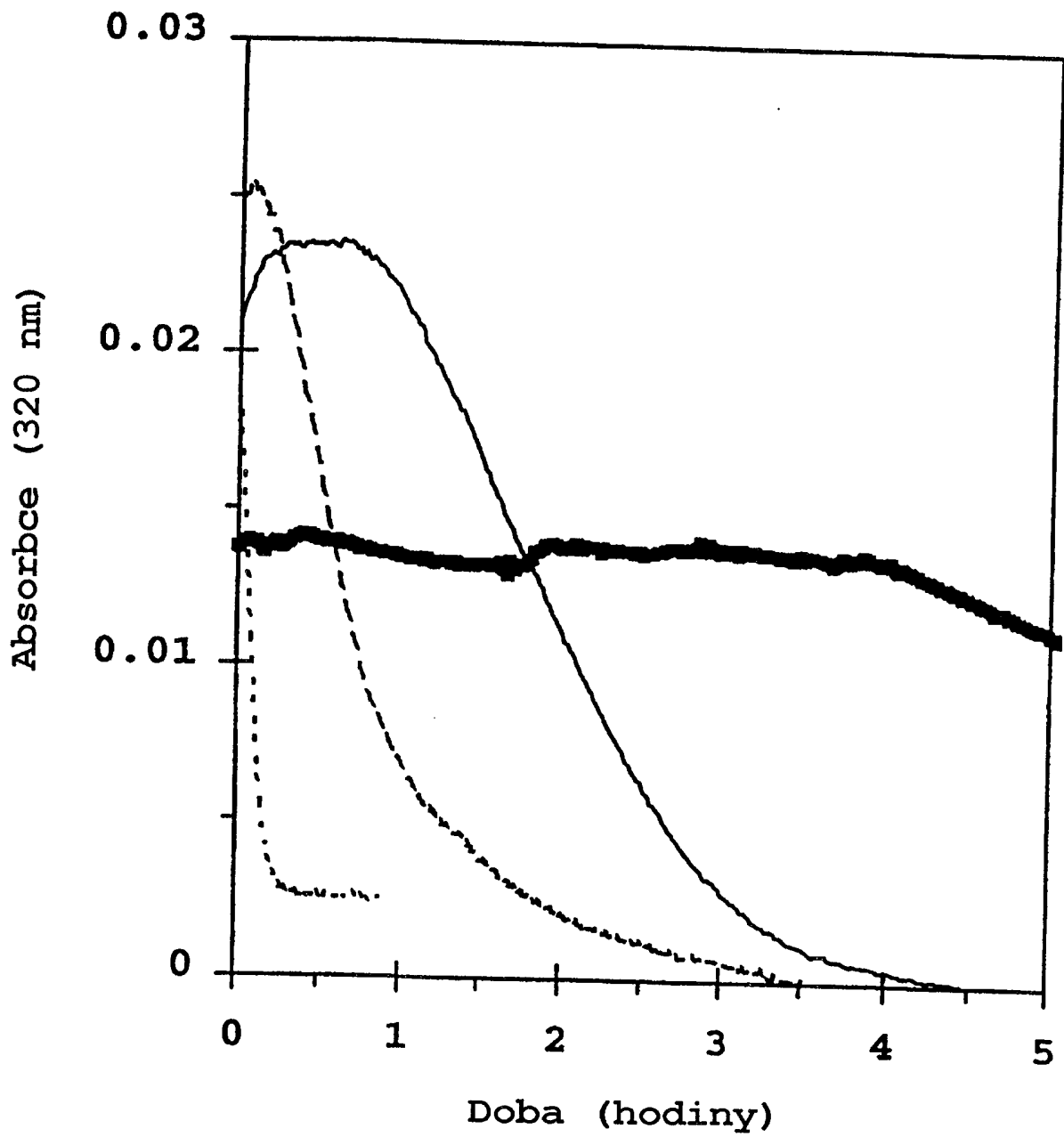
Dr. Otakar Švorčík

30.08.00

2000-233

1/4

Fig. 1

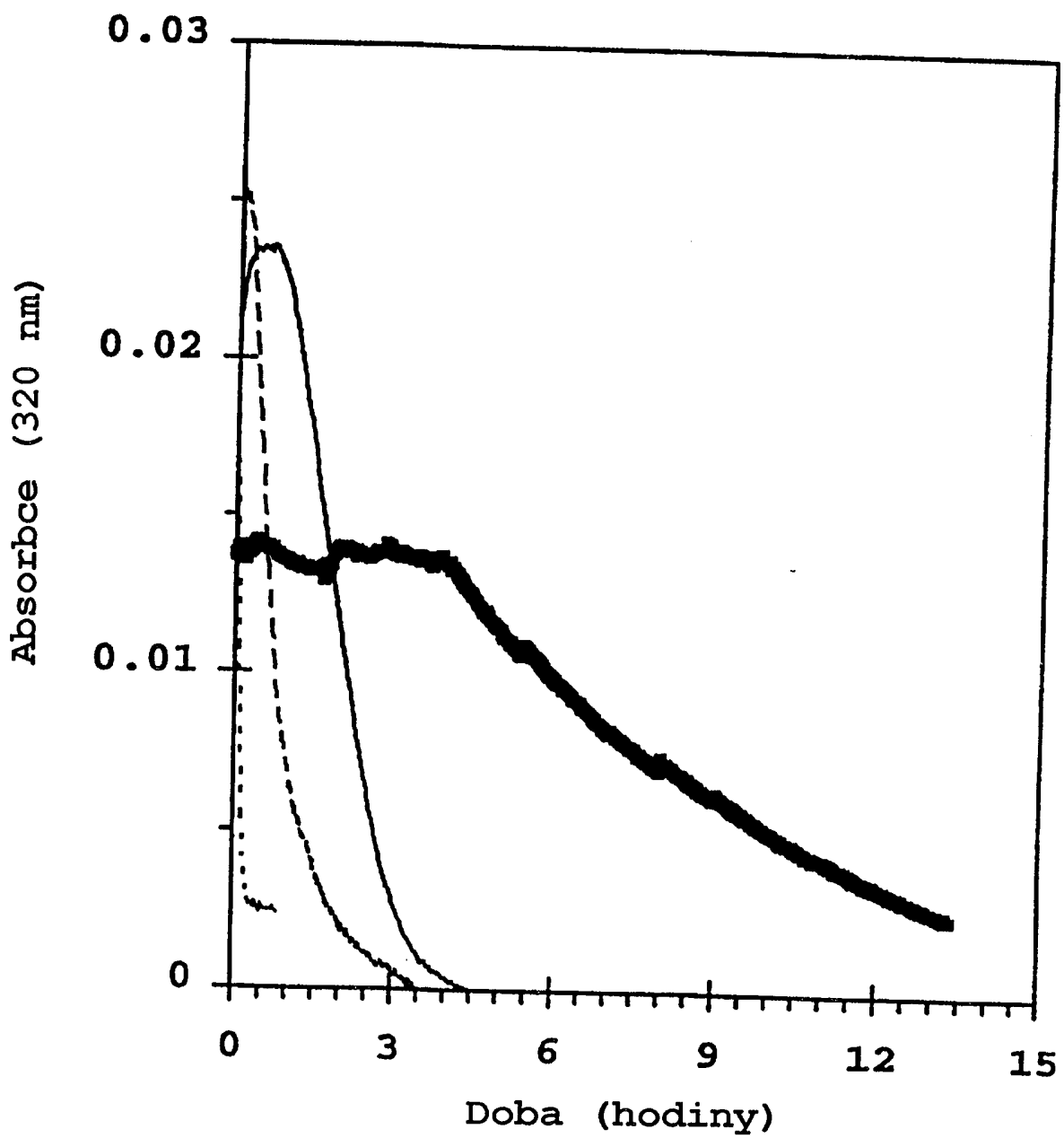


30.08.00

2000-2339

2/4

Obr. 2

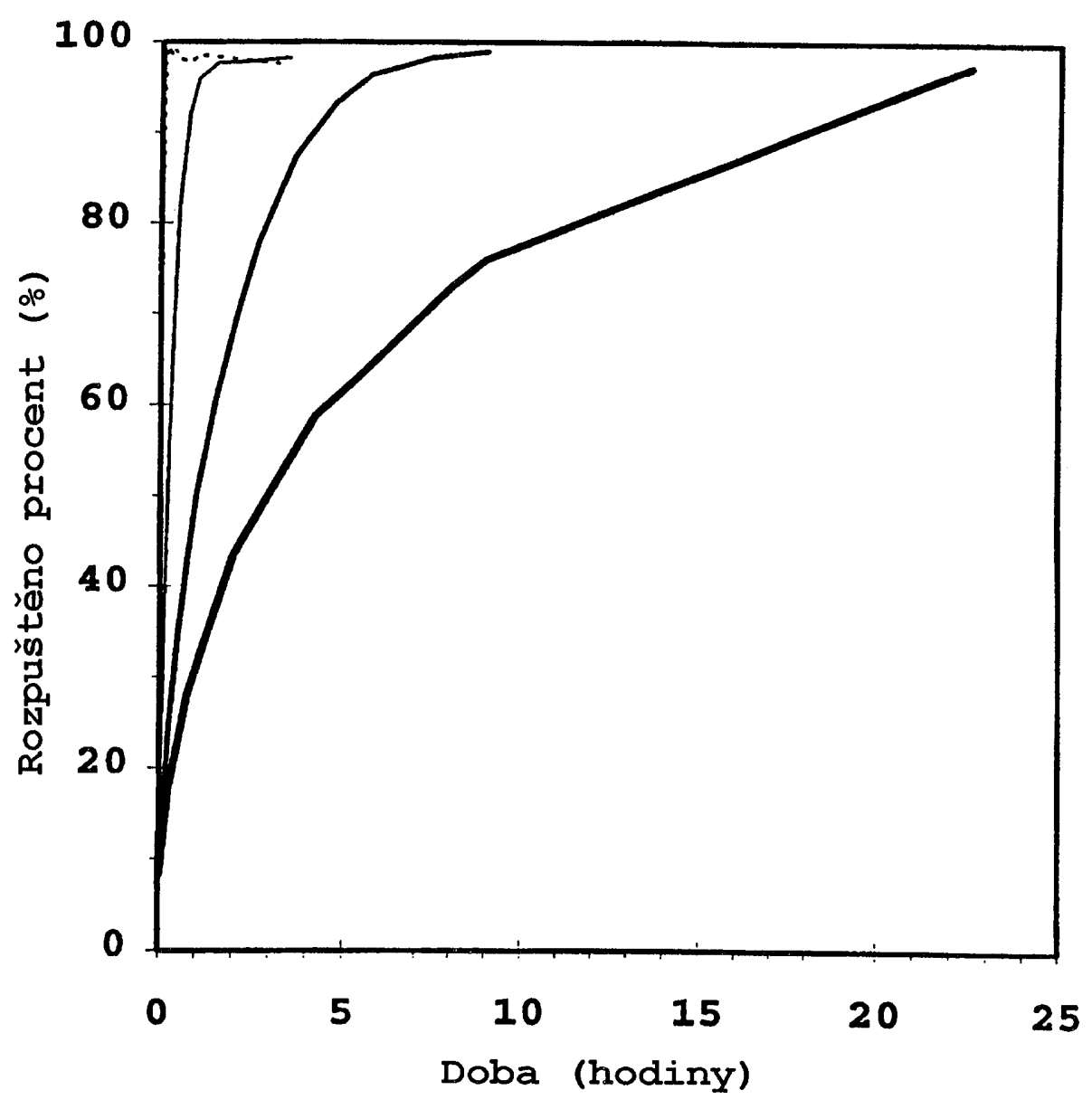


30.08.00

2000-2339

3/4

Obr. 3



30.08.00

2000-2339

4/4

Obr. 4

