

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

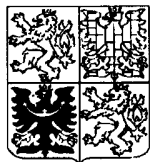
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3881-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04. 06. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.06.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/484220**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 05. 98**
(**Věstník č. 5/98**)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/07963**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/40730**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K	1/00
C 07 K	1/14
C 07 K	1/28
C 07 K	1/30
C 07 K	14/62
A 61 K	38/28

(71) Přihlášovatel:

ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN,
US;

(72) Původce:

Baker Jeffrey Clayton, Indianapolis, IN, US;
Moser Brian Allen, Indianapolis, IN, US;
Shrader Warren E., Indianapolis, IN, US;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob přípravy acylovaného proteinové-
ho prášku**

(57) Anotace:

Způsob získání acylovaného proteinu jako
prášku, obzvláště v případech, kdy acylovaný
protein je takový, že je resistantní vůči izolaci
isoelektrickou precipitací z vodného roztoku
proteinu, způsob zahrnující kombinaci upra-
vení vodného roztoku na pH blízké iso-
elektrickému pH proteinu a vytvoření vhodné
koncentrace alkoholu, která způsobí precipi-
taci proteinu ve formě foltrovatelných částic
při upraveném pH.

CZ 3881-97 A3

Způsob přípravy acylovaného proteinového prášku

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu přípravy acylovaného proteinového prášku a je obecně zaměřen na způsob získání acylovaného proteinu ve formě prášku, obzvláště v případě takového proteinu, který je resistantní vůči pokusům o jeho získání precipitací nebo krystalizací a následnou filtrací z vodného roztoku, speciálně určitých acylovaných proinsulinů, acylovaných insulinů nebo acylovaných insulinových analogů. Vynález se zvláště týká způsobu přípravy sypkého prášku jistých acylovaných proinsulinů, insulinů a insulinových analogů z jejich vodného roztoku.

Dosavadní stav techniky

Již dlouho bylo cílem insulinové terapie napodobovat způsob endogenní insulinové sekrece normálních individuí. Denní fyziologický požadavek na insulin kolísá a může být rozdělen do dvou fází: (a) absorpční fáze, vyžadující insulinový puls k odstranění jídlem zprostředkovaného přebytku krevní glukózy a (b) post-absorpční fáze, vyžadující udržované množství insulinu pro regulaci výstupu hepatické glukózy pro udržování optimální krevní glukózy na lačno. V souladu s tím účinná terapie obecně zahrnuje použití dvou exogenních insulinů: rychle působící insulin v době jídla podávaný jako bolus injekcí a dlouhodobě působící bazální insulin, podávaný injekcí jednou nebo dvakrát denně.

23.02.98

V současné době je pro použití jako dlouhodobě působící bazální insulinová terapie slibná třída acylovaných insulinů. Tyto acylované insuliny jsou získány acylací, selektivně s derivátem aktivované mastné kyseliny, volné aminoskupiny nebo aminoskupin monomerního insulinu, zahrnujícího proinsulin, normální insulin a jisté insulinové analogy. Obvyklé deriváty mastných kyselin zahrnují reaktivní sloučeniny typu mastných kyselin, které mají uhlíkový řetězec tvořený alespoň šesti (6) uhlíkovými atomy a obzvláště ty deriváty mastných kyselin, které mají 8 až 21 uhlíkových atomů v jejich řetězci. Mono-acylovaný normální lidský insulin, acylovaný deriváty kyseliny palmitové, je obzvláště slibným kandidátem. Insuliny spadající do této kategorie jsou podány v japonské přihlášce vynálezu 1-254,699.

Jak je dobře známo odborníkům v oboru, způsoby získávání proteinu v pevné formě, výhodně jako sypký prášek, jsou obzvláště výhodné nebo dokonce základní pro mnoho aplikací. Příprava proteinu jako prášku například minimalizuje skladovací a distribuční nároky. To platí obzvláště v kontextu přípravků, určených pro insulinovou terapii, u kterých musí být vytvářeny velké objemy látky pro uspokojení požadavků. Naštěstí bylo již před dlouhou dobou zjištěno, že normální insulin, v to počítaje hovězí insulin, vepřový insulin a lidský insulin, může být získán ve formě prášku precipitací nebo přesněji krystalizací insulinu z relativně zředěného vodného roztoku insulinu jako zinkový komplex nebo jako sodné krystaly. Obecně je tak zvaný zinkový insulin krystalizován z pufrovaného vodného roztoku, obsahujícího zinkové ionty a může být snadno izolován filtrací.

23.02.98

Na neštěstí pokusy získat insulin, acylovaný deriváty mastných kyselin s dlouhým řetězcem, filtrací nebyly tak úspěšné. Znamé pokusy krystalizovat insuliny acylované mastnými kyselinami byly ve skutečnosti obecně neúspěšné. Bylo postulováno, že hydrofobní charakter složky takových insulinů, představované mastnou kyselinou s dlouhým řetězcem, přispívá k obtížnosti získávání působením, *inter alia*, na interakci protein-protein, vyžadovanou pro uspokojivé vytváření krystalů. Z toho vyplývá, že musí být nalezeny jiné způsoby přípravy těchto acylovaných insulinů ve formě práškovité pevné látky.

Jeden technicky schůdný přístup přípravy acylovaného proteinu v práškovité formě je lyofilizace vodného roztoku proteinu. I když tímto způsobem mohou být získány práškové formy insulinů, acylovaných mastnými kyselinami, lyofilizační techniky nejsou vhodné pro produkci velkých množství insulinu, které jsou komerčně požadovány. Obzvláště požadavky bezpečnosti obsluhy a zpracování produktu jsou při lyofilizaci ve velkých množstvích velmi problematické.

Jiná potenciální strategie zahrnuje isoelektrickou precipitaci. Je již dlouho známo, že protein ve vodném roztoku se stává méně rozpustným, pokud je pH prostředí upraveno na hodnotu blízkou isoelektrickému bodu proteinu. Tento obecný poznatek byl již dlouho používán při purifikaci a získávání proteinů. Pokud jsou jednou insolubilizovány, mohou být takové proteiny získány z výsledné vodné suspence prostým gravitačním zahušťováním nebo vakuovou nebo přetlakovou filtrací.

23.02.98

Naneštěstí naše pokusy získávat insuliny acylované mastnými kyselinami pouhou úpravou pH vodného roztoku acylovaného proteinu na hodnotu blízkou isoelektrickému bodu dávaly kompozice formy emulzí, které byly resistantní vůči jednoduchým separačním metodám tekutiny a pevné látky jako je gravitační zahušťování nebo vakuová nebo přetlaková filtrace. Jako výsledek vyvstala nutnost nalezení nového způsobu získávání takovýchto druhů acylovaných insulinů ve formě prášku.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká jednoduchého způsobu získávání acylovaných proteinů precipitací a filtrací ve formě sypkého prášku a to speciálně v případě jistých insulinů acylovaných mastnými kyselinami, které jsou resistantní vůči takové izolaci při použití precipitace a filtrace. Předkládaný vynález tedy podává způsob získávání insulinů acylovaných mastnými kyselinami ve formě sypkých prášků z vodného roztoku. Předkládaný vynález se obzvláště týká způsobu získávání práškovitého insulinu acylovaného mastnými kyselinami, který může být snadno přizpůsoben produkčním způsobům výroby relativně velkého množství látky. Předkládaný vynález se také týká práškovitého proteinu, získaného tímto způsobem.

Všechna označení aminokyselin, použitá v této přihlášce vynálezu, jsou označení akceptovaná United States Patent and Trademark Office, jak je popsáno v 37 C.F.R. § 1.822 (B)(2).

23.02.98

Výraz „insulin“ nebo „normální insulin“ zde představuje obvyklý lidský insulin, vepřový insulin nebo hovězí insulin. Insulin obsahuje tři volné aminoskupiny: B¹ - fenylalanin, A¹ - glycin a B²⁹ - lysin. Volné aminoskupiny v polohách A¹ a B¹ jsou α -aminoskupiny. Volná aminoskupina v poloze B²⁹ je ϵ -aminoskupina.

Výraz „proinsulin“, tak jak je zde užíván, je vhodně křížově disulfidově vázaný protein obecného vzorce:

B - C - A

kde:

A je A řetězec insulinu nebo jeho funkční derivát,

B je B řetězec insulinu nebo jeho funkční derivát, obsahující ϵ -aminoskupinu, a

C je spojující peptid proinsulinu. Výhodně je proinsulin tvořen A řetězcem lidského insulinu, B řetězcem lidského insulinu a C je přirozený spojující peptid. Pokud je proinsulin přirozená sekvence, proinsulin obsahuje tři volné aminoskupiny: fenylalanin(1) (α -aminoskupina), lysin(29) (ϵ -aminoskupina) a lysin(64) (ϵ -aminoskupina).

Výraz „insulinový analog“, tak jak je zde používán, je vhodně křížově vázaný protein, vykazující insulinovou aktivitu a mající obecný vzorec:

A - B

kde:

A je A řetězec insulínu nebo funkční derivát řetězce A insulínu,

B je B řetězec insulínu nebo funkční derivát řetězce insulínu, obsahující ϵ -aminoskupinu a alespoň jeden z řetězců A a B obsahuje aminokyselinovou modifikaci přirozené sekvence.

Výhodné insulinové analogy zahrnují insulin, ve kterém: aminokyselinový zbytek v pozici B²⁸ je Asp, Lys, Leu, Val nebo Ala,

aminokyselinový zbytek v pozici B²⁹ je Lys nebo Pro,

aminokyselinový zbytek v pozici B¹⁰ je His nebo Asp,

aminokyselinový zbytek v pozici B¹ je Phe, Asp nebo je vynechán buď sám nebo v kombinaci s vynecháním zbytku v poloze B²,

aminokyselinový zbytek v pozici B³⁰ je Thr, Ala nebo vynechán,

aminokyselinový zbytek v pozici B⁹ je Ser nebo Asp za předpokladu, že buď B²⁸ nebo B²⁹ je Lys.

Vyjádřeno standardním biochemickým způsobem, známým odborníkovi v oboru, výhodné insulinové analogy jsou Lys^{B28} Pro^{B29}-lidský insulin (B²⁸ je Lys, B²⁹ je Pro), Asp^{B28}-lidský insulin (B²⁸ je Asp), Asp^{B1}-lidský insulin, Arg^{B31, B32}-lidský insulin, Asp^{B10}-lidský insulin, Arg^{A0}-lidský insulin, Asp^{B1} Glu^{B13}-lidský insulin, Ala^{B26}-lidský insulin a Gly^{A21}-lidský insulin.

Výrazem „acylovaný“ se míní vložení jedné nebo více acylovaných skupin, kovalentně vázaných k volné aminoskupině proteinu.

Výraz „mastná kyselina“ znamená nasycenou nebo nenasycenou mastnou kyselinu s šesti až dvaceti jedním atomem uhlíku. Výraz „aktivovaná mastná kyselina“ znamená mastnou kyselinu, která byla aktivována použitím obecných technik, jako jsou techniky popsané v Methods of Enzymology, 25:494-499 (1972) a Lapidot a kol., v J. of Lipid Res., 8:142-145 (1967), jejichž poznatky jsou v této přihlášce zahrnuty jako reference. Výhodné mastné kyseliny jsou nasycené mastné kyseliny a zahrnují kyselinu myristovou (C_{14}), kyselinu pentadecylovou (C_{15}), kyselinu palmitovou (C_{16}), kyselinu heptadecylovou (C_{17}) a kyselinu stearovou (C_{18}). Obzvláště výhodná mastná kyselina je palmitová kyselina. Estery aktivovaných mastných kyselin zahrnují deriváty činidel jako jsou hydroxybenzotriazid (HOBt), N-hydroxysukcinimid a jejich deriváty. Výhodná aktivovaný ester je N-sukcinimidylpalmitát.

Výraz „křížová vazba“ znamená vytváření disulfidových vazeb mezi cysteinovými zbytky. Vhodně křížově vázaný proinsulin, insulin nebo insulinový analog obsahuje tři disulfidové můstky. První disulfidový můstek je vytvořen mezi cysteinovými zbytky v polohách 6 a 11 A-řetězce. Druhý disulfidový můstek spojuje cysteinové zbytky v poloze 7 A-řetězce k cysteinu v poloze 7 B-řetězce. Třetí disulfidový můstek spojuje cystein v poloze 20 A-můstku s cysteinem v poloze 19 B-řetězce.

Výraz „precipitace“ se vztahuje k procesu, ve kterém jsou v tekutině vytvářeny snadno filtrovatelné částice a který by měl být odlišen od prosté změny rozpustnosti rozpuštěné látky v roztoku, vedoucí k vytváření stabilní suspense a/nebo stavu podobného emulsi směsi dvou fází. Filtrovatelné částice samy o sobě jsou nazývány „precipitát“.

Výraz „snadno filtrovatelný“ a podobné výrazy označují stav, ve kterém částice ve směsi pevné a tekuté látky nebo suspense mohou být izolovány procesem koncové filtrace a podobnými technikami na zpracovatelný filtrační koláč, to jest na materiál s residuálním obsahem vlhkosti, který umožňuje zpracování filtračního koláče jako pevné látky a nikoli jako suspense. V koncové filtraci je přiváděna suspense a filtrační tekutina prochází v zásadě kolmo na rovinu filtru, což je třeba odlišit od filtrace s křížovými nebo tangenciálními toky, ve které je hlavní tok tekutiny rovnoběžný s povrchem filtračního média. Je důležité, že způsob podle vynálezu vytváří suspensi acylovaného proteinu, který může být izolován pomocí koncové filtrace a podobnými technikami se středním nebo průměrným filtračním výkonem přesahujícím 5 l/m²/hod (LMH) a často se středním nebo průměrným filtračním výkonem větším než 20 LMH, přičemž fáze koncové filtrace je normálně místo, kde koláč může být zpracován jako pevná látka. Podobné filtrační výkony jsou kritické pro ekonomické zpracování v komerčním produkčním měřítku.

Výraz „vodný“ zahrnuje systémy s korozpouštědly stejně tak jako použití samotné vody jako rozpouštědla.

23.02.98

Předkládaný vynález se vztahuje ke způsobu získávání acylovaného proteinu jako prášku z vodné směsi, obzvláště v případech, kdy acylovaný protein je takový, že je resistantní vůči izolaci isoelektrickou precipitací z vodného roztoku acylovaného proteinu. Způsob zahrnuje upravení vodného roztoku acylovaného proteinu na hodnotu pH, která způsobí že se protein stane nerozpustným a přidání dostatečného množství alkoholu do vodné směsi proteinu, což způsobí precipitaci proteinu ve formě filtrovatelných částic při uvedeném pH.

Podle dalšího předmětu vynálezu se vynález týká acylovaného proteinu přeměněného na prášek, obzvláště v případech, kdy acylovaný protein je takový, že je resistantní vůči izolaci isoelektrickou precipitací z vodného roztoku. Vynález se obzvláště týká proinsulinu acylovaného mastnou kyselinou, insulinu acylovaného mastnou kyselinou nebo insulinového analogu acylovaného mastnou kyselinou, které jsou ve formě prášku, získaných upravením vodného roztoku acylovaného proteinu na hodnotu pH, která způsobí že se protein stane nerozpustným a přidání dostatečného množství alkoholu do vodného proteinu, což způsobí precipitaci proteinu ve formě filtrovatelných částic při uvedeném pH. Protein proto může být získán ve formě zinku prostého práškového acylovaného proteinu filtrací a sušením. Výhodné acylované proteiny získané v práškové formě způsobem podle předkládaného vynálezu zahrnují N-palmitoyl Lys^{B29} lidský insulin a B28-N^ε-palmitoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-lidský insulin (B28 je acylovaný Lys a B29 je Pro).

23.02.98

Proinsulin, insulin a insulinové analogy použité k přípravě acylovaných proteinů, které představují hlavní cíl předkládaného vynálezu, mohou být získány libovolným z uznávaných způsobů peptidové syntézy, které zahrnují klasické metody (v roztoku), syntézu v pevné fázi, semisyntetické způsoby a v novější době i rekombinantní DNA způsoby. Jako příklad způsobu výroby různých proinsulinů a insulinových analogů je možno uvést následující odkazy na patentovou literaturu, které jsou zde zahrnuty jako reference: Chance a kol., U.S. patentová přihláška 07/388,201, EPO publikace číslo 383 472, Brange a kol., EPO 214 826 a Belagaje a kol., U.S. Patent 5,304,473. A-řetězec a B-řetězec insulinových analogů podle předkládaného vynálezu také mohou být získány z prekursorových molekul podobných proinsulinu použitím rekombinantních DNA technik. Viz Frank a kol., Peptides: Synthesis-Structure-function, Proc. Seventh Am. Pept. Symp., D. Rich a E. Gros, Ed. (1981), které je zde zahrnuta jako reference.

Obecně jsou proinsulin, insulin a insulinové analogy acylovány jejich reakcí s aktivovanými deriváty mastných kyselin, jako jsou aktivované estery mastných kyselin. Acylace normálního insulinu mastnou kyselinou je popsána v Japonské patentové přihlášce 1-254,699. Viz též Hashimoto a kol., *Pharmaceutical Research*, **6**:171-176 (1989). Tyto poznatky jsou zde zahrnuty jako reference.

Acylace je výhodně prováděna za bážických podmínek, to jest při pH vyšším než 9,0 a výhodně okolo 10,5, v polárním rozpouštědle. I když je možné, aby reakce byla prováděna v plně organickém polárním rozpouštědle s použitím báze, která

23.02.98

má vodné pKa vyšší než nebo rovné 10,75, dáváme přednost smíšenému organickému a vodnému rozpouštědлу pro reakční prostředí. Výhodné báze jsou tetramethylguanidin, diisopropylethylamin nebo tetrabutylammonium hydroxid. Obzvláště vhodné rozpouštědlo je acetonitril a voda, obsahující okolo 50 % acetonitrilu. Mezi další polární rozpouštědla patří dimethylsulfoxid, dimethylformamid a další. Systémy korozpouštědel také zahrnují aceton a vodu, isopropylalkohol a vodu a ethanol a vodu. Časové a teplotní podmínky, vhodné pro provádění reakcí nejsou příliš kritické. Reakční teplota od 0 °C do 40 °C a reakční doba od 15 minut do 24 hodin jsou obecně dostačující. Obzvláště výhodný způsob výroby takových insulinů, acylovaných mastnými kyselinami, je popsán v současně podávané U.S. patentové přihlášce sériového čísla 08/341231, podané 17. listopadu 1994, jejíž poznatky jsou zde zahrnuty jako reference.

Jakmile je reakce ukončena, reakční směs obsahující acylované proteiny je typicky zředěna vodou a je přidána kyselina pro neutralizaci alkalického prostředí. Kyselina je přidávána k acylovanému proteinu jako vodný roztok a slouží ke snížení pH roztoku na hodnotu pod isoelektrickým bodem proteinu. Normálně je v tomto bodě protein v odpovídajícím způsobem pufovaném roztoku pro další zpracování. Takové zpracování obzvláště zahrnuje čištění standardními chromatografickými metodami jako je chromatografie s obrácenou fází nebo hydrofobní chromatografie, koncentrace pomocí filtrace s křížovými proudy, výměna rozpouštědla ultrafiltrací a podobně. V případě acylovaného proinsulinu, acylovaného insulinu a acylovaných insulinových analogů,

23.02.99

obzvláště N-palmitoyl-Lys^{B29}-lidského insulínu a B28-N^E-palmitoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-lidského insulínu by pH mělo normálně být upraveno pod asi 3,0 a výhodně mezi zhruba 1,5 a 2,5 použitím kyseliny podle potřeby. Vhodné kyseliny zahrnují kyselinu chlorovodíkovou, kyselinu octovou, glycin a obzvláště kyselinu citrónovou. Bylo zjištěno, že je vhodné použití kyseliny citrónové v koncentraci 50 mM. Jestliže je požadováno, pH také může být upraveno použitím báze jako je hydroxid sodný, aby bylo udrženo v požadovaném rozmezí.

V tomto okamžiku může být vodný roztok izolovaného a výhodně i purifikovaného acylovaného proteinu, výhodně proinsulínu acylovaného mastnou kyselinou, insulínu acylovaného mastnou kyselinou nebo insulinového analogu acylovaného mastnou kyselinou, zpracován způsobem podle předkládaného vynálezu s cílem získat rozpustný protein ve formě prášku. Podle předkládaného vynálezu se pH vodného roztoku proteinu upraví přidáním báze, výhodně vodou rozpustné báze jako je hydroxid sodný, v dostatečném množství, které způsobí, že rozpustný protein se stane nerozpustným. Toho je dosaženo upravením pH roztoku na hodnotu blízkou isoelektrickému bodu acylovaného proteinu, který bude dále označován jako isoelektrické pH. V případě acylovaného proinsulínu, acylovaného insulínu a acylovaných insulinových analogů, obzvláště N-palmitoyl-Lys^{B29} lidského insulínu a B28-N^E-palmitoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-lidského insulínu se ukázalo, že vhodná úprava pH je jeho úprava do rozmezí zhruba 4,0 až 6,0 a výhodně zhruba od 4,5 do 5,5. Při tomto pH by čistý náboj na acylovaném proteinu měl být minimální a rozpustnost proteinu by měla být nejmenší. V průběhu úpravy pH by roztok měl být míchán, aby se dosáhlo úplného promísení.

23.02.98

Vodné roztoky acylovaných proteinů, které jsou obzvláště vhodné pro zpracování postupem podle předkládaného vynálezu, vytvářejí v okamžiku, kdy je jejich pH upraveno na hodnotu blízkou jejich isoelektrickému pH, kompozici typu emulze. Tento stav je zabraňuje izolaci proteinu použitím separačních technik pevné a tekuté fáze, jako je koncová filtrace, které jsou žádoucí pro zpracování ve velkém měřítku. Klíčová stránka předkládaného vynálezu spočívá v použití alkoholu, obzvláště ethanolu, který je přidán do vodné směsi proteinu a napomáhá vytváření snadno filtrovatelného precipitátu acylovaného proteinu.

Pořadí provedení úpravy pH a přidání alkoholu není kritické. Alkohol může být do proteinového roztoku přidán před úpravou pH na hodnotu požadovanou k insolubilizaci proteinu a konečnému vytváření precipitátu a může také být přidán po úpravě pH proteinového roztoku.

Přihlašovatelé zjistili, že množství alkoholu, který musí být přidán k acylovanému proteinu, aby byl získán snadno filtrovatelný precipitát, leží v úzkém rozmezí. Přihlašovatelé obzvláště zjistili, že v případě insulínu acylovaného mastnou kyselinou, obzvláště v případě N-palmitoyl Lys^{B29} lidského insulínu je požadovaného výsledku, to jest vytváření snadno filtrovatelného precipitátu, dosaženou pouze po přidání množství alkoholu, obzvláště ethanolu, které leží v úzkém rozmezí, dávajícím koncentraci alkoholu alespoň zhruba 20 % a nejvýše zhruba 35 % a výhodně zhruba 25 % až 30 % ve vodné suspensi proteinu. I když ethanol je jasně nejvýhodnější volba, další alkoholy, jako

23.02.98

je methanol nebo isopropanol by měly být vhodnými náhradami v jistých situacích.

Přidáním příliš velkého množství alkoholu do vodného proteinu zabraňuje získání přijatelné úrovně vytváření precipitátu, zatímco přidání nedostatečného množství alkoholu neumožňuje adekvátně změnit kompozici ve formě emulze, získanou po úpravě pH acylovaného proteinu, na snadno filtrovatelnou suspensi. Pokud je totiž úroveň přidaného alkoholu příliš vysoká, protein se znovu rozpouští, což přináší možné snížení výtěžku. Určení množství alkoholu, jako je ethanol, potřebného k usnadnění precipitace a filtrace jiných proteinů, acylovaných mastnými kyselinami, může být provedeno rutinním experimentováním.

V souhrnu je proto předkládaný vynález založen na poznání, že k získání acylovaného proteinu, obzvláště takového proteinu, který je resistantní vůči izolaci a získání isoelektrickou precipitací a filtrací z vodného roztoku proteinu, ve formě sypkého prášku, je nutné vytvořit následující kombinaci podmínek: (a) pH rovné nebo blízké isoelektrickému pH proteinu a (b) dostatečná koncentrace alkoholu, která napomáhá precipitaci a filtraci proteinu usnadněním tvorby snadno filtrovatelných částic. Jak bylo uvedeno výše, v případě N-palmitoyl Lys^{B29} lidského insulínu bylo zjištěno, že obzvláště vhodnou koncentrací pro usnadnění precipitace proteinu ve formě snadno filtrovatelných částic je koncentrace alkoholu alespoň zhruba 20 % a nejvýše zhruba 35 % objemových suspense a výhodně zhruba 25 % až 30 %.

23.02.98

Způsob ve kterém je vodná směs proteinu připravena tak, aby obsahovala požadovanou koncentraci alkoholu (například ethanolu) a měla isoelektrické pH není kritická. Taková směs může být například vytvořena zředěním pomocí vody vodného roztoku proteinu s upraveným pH, ve kterém je vyšší než požadovaná koncentrace alkoholu, to jest v případě N-palmitoyl Lys^{B29} lidského insulinu zředěním ethanolové koncentrace vyšší než 35 % objemových, například koncentrace od 40 % do 45 % ethanolu, na koncentraci alkoholu, která leží v požadovaném rozmezí. Výhodně je kompozice jemně míchána za podmínek, při nichž je koncentrace alkoholu i pH v požadovaných mezích, pro usnadnění vytváření precipitátu.

Koncentrace acylovaného proteinu v roztoku před zpracováním podle předkládaného vynálezu není kritická. V případě acylovaného insulinu, v to počítaje i acylovaný proinsulin a acylované analogy insulinu by obecně měly být používány koncentrace alespoň zhruba 1 mg/ml a výhodně alespoň zhruba 5 mg/ml, i když používání proteinových koncentrací o hodnotách 35 až 50 mg/ml a vyšších by mělo dávat precipitovaný protein, který může být zpracován s přijatelnějším filtračním výkonem. Jako bylo uvedeno výše, proteinová suspence, získaná kombinovaným působením úpravy pH a adicí alkoholu by měla poskytovat průměrný nebo střední filtrační výkon alespoň zhruba 5 LMH a výhodně vykazovat střední filtrační výkon alespoň 15 LMH. Překvapivě byly při zpracování roztoku N-palmitoyl Lys^{B29} lidského insulinu postupem podle předkládaného vynálezu pozorovány střední filtrační výkony zhruba 20 LMH a vyšší.

23.02.98

Ačkoliv teplota nemusí být udržována v úzkém kritickém rozmezí, pro nejlepší výsledky by měla teplota v průběhu filtrace udržována v rozmezí od 20 °C do 30 °C. Teplota 0 °C nebo nižší by ovšem v průběhu filtrace neměla nastat, neboť takové teploty se neslučují s průběhem zpracování při požadovaných vysokých filtračních výkonech. I když filtrace je výhodně prováděna při teplotě okolí, předchozí úprava pH a adice ethanolu mohou být provedeny při libovolné teplotě vyšší než je teplota mrazu suspense.

V uvedeném okamžiku je vodná proteinová kompozice připravena k filtraci, jejímž cílem je izolace precipitovaného proteinu. V některých případech může být výhodné provádět gravitační usazování nebo zahušťování vodné proteinové kompozice nebo suspense před filtrací, aby se omezila hydraulická zátěž filtračního zařízení. I když v případě velkých produkčních měřítek může být výhodná centrifugová filtrace, například v případě produkčních dávek větších než 0,5 kg, je možno pro získání precipitovaného proteinu způsobem podle předkládaného vynálezu použít jakýkoliv způsob separace pevné a tekuté fáze, v to počítaje vakuovou nebo přetlakovou filtraci. Při výrobě v menším měřítku, například pokud jsou výrobní dávky menší než zhruba 0,3 až 0,5 kg, může být výhodnější přetlaková filtrace, používající filtrační zařízení, které má porézní fritový filtrační povrch. Filtrace porézní fritou s nominální velikostí pórů zhruba 0,5 μm se ukázala jako velmi účinná. Zařízení, použité pro filtraci suspense není příliš kritické a je možno použít širokou škálu známých filtračních systémů, slučitelných se zpracováním farmaceutických látek.

23.02.99

Po filtraci je filtrační koláč odebrán a sušen, obvykle vakuovým odpařováním. Při postupu podle předkládaného vynálezu může být použita libovolná metoda sušení zahuštěné pasty pevných látek, která není nějakým způsobem škodlivá pro izolovaný protein. Způsoby získávání filtračního koláče a další metody sušení filtračního koláče jsou zřejmé odborníkům v oboru a nejsou kritické pro provádění způsobu podle vynálezu.

Acylovaný insulinový prášek podle předkládaného vynálezu je vhodný jako farmaceutická surovina (bulk drug substance - BDS) pro přípravu farmaceutických přípravků, používaných v insulinové terapii, to jest pro jejich podávání pacientům, kteří mají jejich potřebu (například pacienti, trpící hyperglykemií). Takové farmaceutické přípravky obsahují účinné množství prášku v kombinaci s jedním nebo více farmaceutickými excipienty nebo nosiči. Pro tyto účely mohou být farmaceutické přípravky typicky připraveny tak, aby obsahovaly od 100 jednotek na ml nebo podobné koncentrace účinného množství acylovaného proteinového prášku. Tyto přípravky jsou typicky, i když ne nutně, svojí povahou parenterální a mohou být připraveny některou z množství technik a s využitím konvenčních excipientů nebo nosičů pro parenterální produkty, které jsou dobře známy odborníkům v oboru. Viz například Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. vydání, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA (1985), která je zde zahrnuta jako reference. Dávky pro parenterální podávání mohou být například připraveny suspendováním nebo rozpuštěním požadovaného množství proteinového prášku v netoxickém tekutém vehikulu, které je vhodné pro injekci, jako je vodné médium a sterilizací suspence nebo roztoku.

23.02.99

Alternativně může být změřené množství prášku umístěno v ampulce, která je potom i se svým obsahem sterilizována a uzavřena. Pro účely smíchání před podáváním může být poskytována doprovázející ampulka.

Farmaceutické přípravky upravené pro parenterální podávání používají ředidla, excipienty a nosiče jako je voda a s vodou mísitelná organická rozpouštědla jako je glycerin, sezamový olej, olej podzemnice olejné, vodný propylenglykol, N,N-dimethylformamid a podobně. Příklady takových farmaceutických přípravků zahrnují sterilní, isotonické vodné solné roztoky prášku, které mohou být pufrovány farmaceuticky přijatelným pufrem a které jsou nepyrogenní. Parenterální farmaceutické přípravky mohou dodatečně obsahovat konzervační činidla jako je meta-kresol, další činidla pro úpravu pH konečného produktu jako je hydroxid sodný nebo kyselina chlorovodíková a stabilizátory jako jsou soli zinku.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklad je uveden pro ilustraci a vysvětlení vynálezu. I když je vynález ilustrován s využitím N-palmitoyl Lys^{B29} lidského insulínu jako prášku, rozsah předmětu vynálezu není omezen na tento příklad. Pokud není uvedeno jinak, všechna odvolání na díly nebo procenta se vztahují k hmotnosti a všechny teploty jsou vyjádřeny ve stupních Celsia.

PŘÍKLAD

Na vodný roztok (8,8 l) Biosyntetického Lidského Insulinu (N-palmitoyl Lys^{B29} lidského insulinu), acylovaného mastnou kyselinou a majícího proteinovou koncentraci 50 mg/ml a pH rovné 2,6 se působilo přidáním 530 ml 10 % hydroxidu sodného při teplotě 2-8°C, což zvýšilo pH na 5,7. Po míchání roztoku s upraveným pH, aby se zaručilo dokonalé promíchání, byl přidán absolutní ethanol v množství 0,46 litru na jeden litr roztoku s upraveným pH (až do celkového objemu roztoku 13 l), směs byla jemně míchána, čímž se napomohlo precipitaci acylovaného insulinu. Suspense acylovaného proteinu byla zbavena vody přetlakovou filtrací na fritě z nerezové oceli s nominální velikostí póru 5,0 μ . Pozorovaný střední filtrační výkon byl zhruba 25 LMH. Filtrát nebyl dále používán. Filtrační koláč byl potom promýván vodným roztokem, obsahujícím 30 % objemových ethanolu a promytý filtrační koláč byl odebrán z filtru a sušen ve vakuu, čímž se získal prášek, neobsahující zinek. Bylo pozorováno, že tento prášek má vynikající skladovací stabilitu jako farmaceutická surovina. V podstatě všechnen protein byl získán ve filtračním koláči s velmi malými ztrátami ve filtrátu.

Zásady, výhodná provedení a způsoby provádění předkládaného vynálezu byly popsány s tím, že se ve výše uvedeném popisu zaměřovaly především na proinsulin acylovaný mastnou kyselinou, insulin acylovaný mastnou kyselinou a insulinové analogy acylované mastnou kyselinou, obzvláště na N-palmitoyl Lys^{B29} lidský insulin. Vynález, jehož ochrana je zde požadována, však není omezen na výše uvedená provedení,

která je nutno chápat pouze jako ilustraci, která neomezuje
předmět vynálezu. Odborníkem v oboru mohou být provedeny
změny a variace, aniž by došlo k vybočení z ducha a rozsahu
předkládaného vynálezu, jak je definován v následujících
patentových nárocích.

Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík v.r.

23.02.98

PV3881-97

11533

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob získání acylovaného proteinu jako prášku z vodného roztoku, **vyznačující se tím**, že zahrnuje upravení pH vodného roztoku proteinu na pH, které způsobí, že se protein v roztoku stane nerozpustným a přidání dostatečného množství alkoholu do vodné směsi proteinu pro usnadnění precipitace proteinu ve formě filtrovatelných částic při uvedeném pH.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že uvedený protein byl acylován derivátem mastné kyseliny.

3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že acylovaný protein obsahuje protein, který je resistantní vůči izolaci isoelektrickou precipitací z vodného roztoku proteinu.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že uvedený acylovaný protein je zvolen ze souboru, zahrnujícího proinsulin acylovaný mastnou kyselinou, insulin acylovaný mastnou kyselinou a insulinový analog acylovaný mastnou kyselinou.

5. Způsob podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že pH vodného roztoku je upraveno na hodnotu zhruba 4,0 až 6,0.

6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že acylovaný protein je N-palmitoyl Lys^{B29} lidský insulin.

7. Způsob podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že alkohol je ethanol, přidaný v množství dávajícím koncentraci alkoholu ve vodné směsi od 20 % do 35 % objemových.

8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že koncentrace alkoholu je od 25 % do 30 % objemových.

9. Způsob získání acylovaného proteinu jako prášku z vodného roztoku proteinu, **vyznačující se tím**, že zahrnuje kombinaci upravení pH uvedeného vodného roztoku proteinu na hodnotu blízkou isoelektrickému pH proteinu a vytvoření vhodné koncentrace alkoholu pro usnadnění precipitaci proteinu ve formě filtrovatelných částic při uvedeném pH.

10. Způsob podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že acylovaný protein je protein, který je resistentní vůči izolaci isoelektrickou precipitací z uvedeného vodného roztoku.

11. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že acylovaný protein je zvolen ze souboru, zahrnujícího proinsulin acylovaný mastnou kyselinou, insulin acylovaný

mastnou kyselinou a insulinový analog acylovaný mastnou kyselinou.

12. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že pH vodného roztoku je upraveno na hodnotu zhruba 4,0 až 6,0.

13. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že acylovaný protein je N-palmitoyl Lys^{B29} lidský insulin.

14. Způsob podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že alkohol je ethanol, přidaný v množství dávajícím koncentraci alkoholu ve vodné směsi od 25 % do 30 % objemových.

15. Práškový acylovaný protein, **vyznačující se tím**, že je získán kombinací

(a) úpravy pH vodného roztoku acylovaného proteinu na hodnotu rovnou nebo blízkou isoelektrickému bodu proteinu a

(b) vytvoření vhodné koncentrace alkoholu ve vodné kompozici uvedeného acylovaného proteinu pro usnadnění vytváření filtrovatelných částic proteinu při uvedeném pH

s následujícím získáním filtrovatelných částic jako precipitovaného proteinového prášku filtrací a sušením vodné proteinové kompozice.

16. Práškový acylovaný protein podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že acylovaný protein obsahuje protein, který je resistantní vůči izolaci isoelektrickou precipitací z uvedeného vodného roztoku.

23.02.98

17. Práškový acylovaný protein podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že acylovaný protein je zvolen ze souboru, zahrnujícího proinsulin acylovaný mastnou kyselinou, insulin acylovaný mastnou kyselinou a insulinový analog acylovaný mastnou kyselinou.

18. Práškový acylovaný protein podle nároku 17, **vyznačující se tím**, že pH vodného roztoku je upraveno na hodnotu zhruba 4,0 až 6,0.

19. Práškový acylovaný protein podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že alkohol je ethanol, ethanol je přidán v množství dávajícím koncentraci alkoholu ve vodné směsi od 25 % do 30 % objemových vodné proteinové kompozice.

Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík v.r.