

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

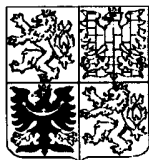
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3957-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19. 06. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **20.06.96, 27.08.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/0684, 96/0899**

(33) Země priority: **DK, DK**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 05. 99**
(Věstník č. 5/99)

(86) PCT číslo: **PCT/DK97/00267**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/48413**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 38/28
A 61 K 47/26

(71) Přihlášovatel:

NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK;

(72) Původce:

Kimer Lone Logstrup, Farum, DK;

Balschmidt Per, Espergaerde, DK;

Jensen Steen, Dragor, DK;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1,

Praha 4, 14000;

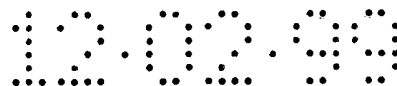
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Inzulínové přípravky obsahující lidský
inzulín a sacharidy**

(57) Anotace:

Řešení popisuje vodné inzulínové přípravky s
vinikající fyzikální stabilitou, obsahující roz-
puštěný anebo vysrážený lidský inzulín nebo
jeho analog či derivát a ve vodě rozpustný, re-
dukovaný anebo neredukující sacharid, který
obsahuje nejméně 4 atomy uhlíku ve své zá-
kladní struktuře, nebo ve vodě rozpustný, ne-
redukující esterový či éterový derivát sachari-
du nebo redukovaného sacharidu, který obsa-
huje nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní
struktuře, nebo směs výše jmenovaných slou-
čenin.

CZ 3957-98 A3



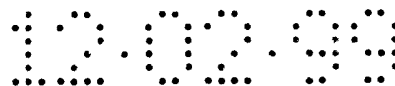
Normálně jsou inzulínové přípravky podávány formou subkutánní injekce. Co je důležité pro pacienta, je průběh působení inzulínového přípravku, což je vliv inzulínu na metabolismus glukózy, v závislosti na čase uplynulém od injekce. Na tomto průběhu jsou mimo jiné důležité čas začátku účinku, maximální úroveň a celková doba působení. Pacienty jsou vyžadovány rozmanité inzulínové přípravky s odlišným časovým průběhem působení. Tentýž pacient může v jednom dnu použít inzulínové přípravky s velmi odlišnými průběhy působení. Požadovaný časový průběh působení závisí např. na denní době a na množství a složení kteréhokoli pacientova jídla.

Stejně důležitá je však fyzikální stabilita inzulínového přípravku, kvůli rozšířenému užívání injekčních zařízení - inzulínových per, což jsou zařízení obsahující zásobníky Penfill®, v nichž je inzulínový přípravek uložen do doby, dokud není zásobník vyprázdněn. To může u zařízení obsahujících zásobníky o obsahu 1,5 až 3,0 ml trvat přinejmenším 1 až 2 týdny.

První stabilní neutrální inzulínová suspenze byla vyvinuta Scottem a Fischerem (J. Pharmacol. Exp. Ther. 58 (1936), 78), kteří objevili, že v přítomnosti nadbytku protaminu a zinkových solí (2 µg zinku na IU (mezinárodní jednotka – international unit) inzulínu) může stabilizovat protaminový inzulínový přípravek, popsáný v Hagedorn a kol., J. Am. Med. Assn. 106(1936), 177-180.

Protamin zink-inzulín, vyráběný podle lékopisů Spojených Států anebo lékopisů evropských, obsahují amorfni protamin zink-inzulín a rovněž krystalický protamin zink-inzulín. Čerstvě připravený protamin zink-inzulín obsahuje hlavně amorfni sraženinu, která se bude v průběhu skladování přeměňovat na krystalické částice, což vede k protrahovanému působení.

Zcela krystalická modifikace protamin zink-inzulínu, označovaná NPH inzulín nebo Isophane inzulín byla vyvinuta Krayenbühlem a Rosenbergem (viz Rep. Steno Mem. Hosp. Nord. Insulinlab. 1 (1946), 60; a dánský patent č. 64,708). Zjistili, že inzulín a protamin, pokud jsou smíchány v určitých poměrech při neutrálním pH a v přítomnosti malého množství zinku a fenolu, nebo fenolových derivátů, s výhodou m-krezolu, vytvoří amorfni sraženinu, která se v průběhu stání postupně, ale kompletně přemění na protáhlé tetragonální krystaly, ohraničené na koncích pyramidovými čelními stěnami. Inzulín a protamin z lososa společně krystalizují ve váhovém poměru, odpovídajícím 0,09 mg protaminsulfátu na mg inzulínu. Pro přípravu tetragonálních



krystalů jsou nezbytné zinek v množství přinejmenším 0,15 μg na IU a látka typu fenolu v koncentraci vyšší než 0,01%.

Zpočátku byl tento druh krystalů připravován za použití vepřového a hovězího inzulínu z přírodních zdrojů, ale od 80 let se používá též lidský inzulín, připravený pomocí genového inženýrství, nebo částečnou syntézou.

Lidský inzulín sestává ze dvou polypeptidových řetězců, tzv. řetězců A a B, které obsahují 21 a 30 aminokyselin. A a B řetězce jsou vzájemně spojeny dvěma cysteinovými disulfidickými můstky. Inzulín od většiny ostatních druhů má podobnou stavbu, ale nemusí obsahovat stejné aminokyseliny na odpovídajících pozicích v řetězci, jako u lidského inzulínu.

Rozvoj postupů, známých jako genové inženýrství, umožnil snadno připravit velké množství rozmanitých inzulínových sloučenin, analogických lidskému inzulínu. U těchto analogů inzulínu byla jedna nebo více aminokyselin nahrazena jinými aminokyselinami, které jsou kódovány nukleotidovými sekvencemi. Protože lidský inzulín, jak bylo vysvětleno výše, obsahuje 51 aminokyselinových zbytků, je zřejmé, že je možný veliký počet analogů inzulínu a skutečně bylo připraveno velké množství těchto analogů, často se zajímavými vlastnostmi. V roztocích lidského inzulínu o koncentracích v oblasti injekčních přípravků, je inzulínová molekula přítomna v asociované formě jako hexamer. (Brange a kol.: *Diabetes Care* 13, (1990), 923 – 954). Má za to, že rychlost absorpce do krevního oběhu po subkutánní injekci závisí na velikosti molekuly a bylo zjištěno, že analogy inzulínu se takovými aminokyselinovými záměnami, které zabraňují nebo inhibují tvorbu těchto hexamerů, mají neobvykle rychlý nástup účinku (Brange a kol.: *tamtéž*). To má pro diabetického pacienta velkou terapeutickou hodnotu. V krystalech přípravků inzulínu s protaminem, které mají protražované působení, se inzulín také nachází ve formě hexameru (Balschmidt a kol.: *Acta Chryst.* B47, (1991), 975 – 986).

Farmaceutické přípravky, které jsou založeny na analozích lidského inzulínu, jsou známy např. z následujících dokumentů: WO 95/00550 se týká farmaceutických přípravků založených na krystalech inzulínu, obsahujících Asp^{B28} inzulín a protamin, který vykazuje rychlý nástup účinku a prodloužené působení, když je aplikován in vivo. Krystaly mohou dále obsahovat zinečnaté ionty a fenol nebo m-krezol. Jako činidlo udržující izotonocitu je k přípravkům přidáván glycerol.



V US 5 461 031 jsou popsány rozličné farmaceutické přípravky, které obsahují rychle působící monomerní analog inzulínu, zinek, protamin a fenolové deriváty. Přípravky dále obsahují glycerol, který působí jako izotonické činidlo.

US 5 474 978 popisuje rychle působící, parenterálně podávané přípravky, které obsahují komplex analogu lidského inzulínu, skládajícího se z šesti monomerních analogů inzulínu, zinečnatých iontů a přinejmenším třech molekul derivátů fenolu. Výhodným izotonickým činidlem je glycerol.

Naneštěstí má inzulín tendenci vytvářet nekovalentní polymerizací nerozpustné a biologicky neaktivní fibrily (viz např. Jens Brange, Galenics of Insulin, Springer-Verlag, 1987 a odkazy tam uvedené). Tvorba fibril je podporována zvýšenými teplotami, např. nad 30 °C, zvláště pokud jsou doprovázeny pohybem roztoku. Tento fibrilační proces, kterému je velmi obtížné se vyhnout, tvoří horní mez pro období, po které mohou být inzulínové přípravky uloženy a tedy přímo ovlivňuje velikost objemu zásobníku inzulínových per.

Protože vytváření fibril obecně vyžaduje monomerizaci inzulínu, ty analogy inzulínu, které méně ochotně vytvářejí dimery a hexamery, vykazují menší fyzikální stabilitu, kvůli své snadnější fibrilaci.

Předmětem předkládaného vynálezu je tedy poskytnout inzulínové přípravky obsahující lidský inzulín nebo jeho analog či derivát, s vylepšenou fyzikální stabilitou.

Podle vynálezu je tohoto cíle dosaženo vodnými inzulínovými přípravky, obsahujícími rozpuštěný nebo vysrážený lidský inzulín nebo jeho analog či derivát, a ve vodě rozpustné redukované nebo neredukující cukry, které mají ve své základní struktuře nejméně 4 atomy uhlíku, nebo ve vodě rozpustné neredukující esterové anebo éterové deriváty cukrů, nebo redukovaných cukrů, které mají ve své základní struktuře nejméně 4 atomy uhlíku, anebo směs těchto látek.

Podstata vynálezu

Definice

Termínem „analog lidského inzulínu“ je zde míněn takový lidský inzulín, v němž jedna nebo více aminokyselin bylo odstraněno, nebo zaměněno jinými aminokyselinami, včetně nekódovaných aminokyselin, nebo lidský inzulín, obsahující další aminokyseliny, tj. více než 51 aminokyselin.



Termínem „derivát lidského inzulínu“ je zde míněn takový lidský inzulín nebo jeho analog, v němž je k jedné nebo více aminokyselinám vázán přinejmenším jeden organický substituent.

Ve zde používaném kontextu, termín „ve vodě rozpustný“ odpovídá rozpustnosti ve vodě přinejmenším 10 mmol/l, výhodněji přinejmenším 50 mmol/l, při teplotě 20 °C.

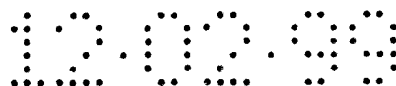
Termíny sacharid, redukovaný sacharid, monosacharid, disacharid, esterové a éterové deriváty těchto sloučenin jsou používány ve shodě se zásadami K. A. Jensena v „Grundrids af den organiske kemi, Almen Kemi III, Ed., Jul. Gjellerups forlag, 1969, str. 299-316.

Ve zde používaném kontextu, výraz „neredukující sacharid“ označuje sacharid, který je v podstatě neschopen reagovat s aminoskupinami inzulínu v přípravcích podle vynálezu, a tvořit tak inzulín s připojenými sacharidy. Tato definice zahrnuje sacharidy u nichž je karbonylová skupina (skupiny) inaktivována nebo blokována, např. tvorbou anhydridu nebo jiného derivátu.

Z jednoho hlediska se předkládaný vynález vztahuje k vodným inzulínovým přípravkům, obsahujícím: rozpuštěný nebo vysrážený lidský inzulín, jeho analog či derivát a 100 až 400 mM, výhodněji 150 až 250 mM, ještě výhodněji 180 až 230 mM ve vodě rozpustného redukovaného nebo neredukujícího sacharidu, který má nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo ve vodě rozpustného neredukujícího esterového či éterového derivátu sacharidu nebo redukovaného sacharidu, který má nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo směsi výše jmenovaných sloučenin.

Z jiného hlediska se předkládaný vynález vztahuje k vodným inzulínovým přípravkům, obsahujícím: rozpuštěný nebo vysrážený lidský inzulín, jeho analog či derivát a ve vodě rozpustný redukovaný nebo neredukující sacharid, který má nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo ve vodě rozpustný neredukující esterový či éterový derivát sacharidu nebo redukovaného sacharidu, který má nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo směsi výše jmenovaných sloučenin.

Z ještě jiného hlediska se předkládaný vynález vztahuje k vodným inzulínovým přípravkům, obsahujícím: rozpuštěný nebo vysrážený lidský inzulín a ve vodě rozpustný redukovaný nebo neredukující sacharid, který má nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo ve vodě rozpustný neredukující esterový či éterový derivát



sacharidu nebo redukováného sacharidu, který má nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo směsi výše jmenovaných sloučenin.

Výhodná provedení

Je výhodné, když sacharid nebo derivát sacharidu použitý v inzulínovém přípravku podle tohoto vynálezu obsahuje 5 až 18 uhlíkových atomů ve své základní struktuře a je přednostně vybírán z následujících sloučenin:

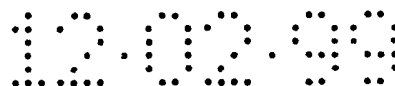
- i) monosacharidy vybírané ze skupiny neredukujících aldóz nebo ketóz, výhodně neredukujících aldotetróz, ketotetróz, aldopentóz, ketopentóz, aldohexóz a ketohexóz, ještě výhodněji neredukujících aldopentóz, ketopentóz, aldohexóz a ketohexóz;
- ii) redukováné monosacharidy, např. polyhydratované alkoholy jako jsou alditoly, přednostně vybírané ze skupiny, obsahující redukováné formy aldotetróz, ketotetróz, aldopentóz, ketopentóz, aldohexóz a ketohexóz, ještě výhodněji redukováné formy aldopentóz, ketopentóz, aldohexóz a ketohexóz (tj. pentitoly a hexitoly);
- iii) neredukující disacharidy, přednostně vybírané ze skupiny neredukujících dihexóz. Typické příklady vhodných redukováných nebo neredukujících sacharidů jsou: manitol, sorbitol, xylitol, inozitol, sacharóza a trehalóza.

Výhodné sloučeniny i) až iii) jsou manitol a sorbitol, přičemž nejvýhodnější je manitol.

Výhodné esterové a éterové deriváty jsou esterové deriváty $C_1 - C_4$ mastných kyselin a $C_1 - C_4$ alkylové éterové deriváty.

V detailním provedení podle vynálezu dále obsahují inzulínové přípravky halogenidy, přednostně chlorid, ještě výhodněji chlorid sodný. Bylo ukázáno, že následkem přítomnosti halogenidu má přípravek ještě vyšší fyzikální stabilitu.

Protože inzulínové přípravky, obsahující rychle působící analogy inzulínu obecně vykazují poněkud nízkou fyzikální stabilitu, předkládaný vynález je zvláště výhodný ve spojení s přípravky, obsahujícími takové analogy. Tedy, inzulínové přípravky připravené podle tohoto vynálezu s výhodou obsahují jeden nebo více rychle působících analogů lidského inzulínu, zvláště analogů, kde v poloze B28 je Asp, Lys, Leu, Val nebo Ala a v poloze B29 je Lys nebo Pro; nebo des(B28-B30), des(B27) nebo des(B30) lidský inzulín. Analog inzulínu je přednostně vybírán z analogů lidského



inzulínu, které mají v poloze B28 Asp nebo Lys a v poloze B29 je Lys nebo Pro. Nejvýhodnější analogy jsou Asp^{B28} lidský inzulin nebo Lys^{B28}Pro^{B29} lidský inzulin.

V jiném provedení obsahuje inzulinový přípravek připravený podle tohoto vynálezu inzulinový derivát, který má protražovaný průběh účinku, jako jsou inzulíny, které mají jeden nebo více lipofilních substituentů. Výhodné lipofilní inzulíny jsou acylované inzulíny včetně těch, které jsou popsány v WO 95/07931 (Novo Nordisk A/S), např. deriváty lidského inzulinu, u kterých ε-aminoskupina Lys^{B29} obsahuje jako substituent acyl, který má přinejmenším 6 atomů uhlíku.

Výhodné deriváty inzulinu jsou následující:

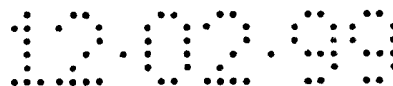
B29-N^ε-myristoyl-des(B30) lidský inzulin, B29-N^ε-myristoyl lidský inzulin, B29-N^ε-palmitoyl lidský inzulin, B28-N^ε-myristoyl Lys^{B28} Pro^{B29} lidský inzulin, B28-N^ε-palmitoyl Lys^{B28} Pro^{B29} lidský inzulin, B30-N^ε-myristoyl-Thr^{B29}Lys³⁰- lidský inzulin, B30-N^ε-palmitoyl-Thr^{B29}Lys³⁰- lidský inzulin, B29-N^ε-(N-palmitoyl-γ-glutamyl)-des(B30)-lidský inzulin, B29-N^ε-(N-litochlyl-γ-glutamyl)-des(B30)-lidský inzulin a B29-N^ε-(ω-karboxyheptadekanoyl)-des(B30)-lidský inzulin, přičemž nejvýhodnější je B29-N^ε-myristoyl-des(B30) lidský inzulin.

Ve výhodném provedení obsahuje inzulinový přípravek jak rozpuštěný, tak vysrážený, přednostně krystalický, inzulin nebo jeho derivát či analog, ve váhovém poměru 1:99 až 99:1, výhodněji 20:80 až 80:20, ještě výhodněji 30:70 až 70:30.

V takovémto provedení vynálezu je výhodné, když inzulinový přípravek obsahuje krystaly, které se skládají z inzulinu nebo analogu inzulinu, protaminu a případně zinku nebo fenolových sloučenin, jako je fenol, m-krezol nebo jejich směs. Je výhodné, když množství protaminu v krystalech odpovídá 0,20 až 0,40 mg protaminové báze na 100 IU inzulinu nebo analogu inzulinu. Je výhodnější, když poměr protaminu k inzulinu v krystalech odpovídá poměru v Isophan inzulinu. Zinek je přítomen přednostně v množství 10 až 40 μg Zn na 100 IU inzulinu, výhodněji v množství 15 až 35 μg Zn na 100 IU inzulinu. Je výhodné, když jsou fenol a m-krezol přítomny v množství, odpovídajícím 0 až 4 mg/ml. Přesto jsou nejvýhodnější směsi 1,4 až 2,0 mg/ml m-krezolu a 0,6 až 2,0 mg/ml fenolu.

Výhodný inzulinový přípravek podle vynálezu obsahuje:

- a) 60 až 3000 nmol/ml, výhodněji 240 až 1200 nmol/ml, lidského inzulinu nebo inzulinového analogu anebo inzulinového derivátu;



- b) redukováný nebo neredukující sacharid, s výhodou manitol, v koncentraci 100 až 400 mM, s výhodou 150 až 250 mM, ještě výhodněji 180 až 230 mM;
- c) chlorid, s výhodou chlorid sodný, v koncentraci 0 až 100 mM, výhodněji 5 až 40 mM, ještě výhodněji 5 až 20 mM; a
- d) fyziologicky tolerovaný pufr, s výhodou fosfátový pufr, jako je dihydrát monohydrofosforečnanu sodného v množství 1 až 4 mg/ml.

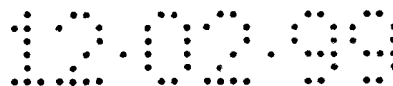
Přípravky podle vynálezu mohou dále obsahovat jednu nebo více sloučenin, běžně užívaných jako činidla udržující izotonicitu, např. glycerol. Je výhodné, když hodnota pH u inzulínových přípravků je v rozmezí 7,0 až 7,8.

Předložený vynález se dále týká způsobů přípravy inzulínových přípravků, obsahujících jak rozpuštěný, tak vysrážený analog inzulínu, vyznačujících se tím, že obsahují následující kroky:

- a) příprava kyselého roztoku, obsahujícího analog lidského inzulínu, zinek a množství protaminu menší než v Isophane inzulínu;
- b) příprava alkalického roztoku, obsahujícího sloučeninu, která působí jako pufr při fyziologickém pH; přičemž přinejmenším jeden z výše uvedených roztoků obsahuje fenolické sloučeniny;
- c) smíšení kyselého a alkalického roztoku a případně úprava pH na hodnotu v oblasti 6,5 až 8,0, s výhodou 7,0 až 7,8; a
- d) ponechání výsledné suspenze srážet.

Touto metodou lze velmi jednoduchým způsobem získat inzulínové přípravky, obsahující jak rozpuštěný, tak vysrážený inzulín. Navíc, sraženina z výsledné suspenze se obvykle skládá z krystalů tyčinkovitého tvaru, které jsou výhodné v tzv. PreMix inzulínových přípravcích.

Váhový poměr analogu inzulínu k protaminu v roztoku, uvedeném v kroku a) je s výhodou vybrán tak, aby byl v konečném produktu získán váhový poměr rozpustného k vysráženému inzulínovému analogu v rozmezí 1:99 až 99:1, výhodněji 20:80 až 80:20, ještě výhodněji 30:70 až 70:30. Řečeno přesněji, roztok uvedený v kroku a) s výhodou obsahuje 120 až 6000 nmol/ml analogu inzulínu a 0,01 až 5,0 mg/ml protaminu.



Roztok uvedený v kroku a) dále obsahuje zinek, a to přednostně v množství odpovídajícím 10 až 40 μg Zn na 100 IU inzulínu, výhodněji v množství 15 až 35 μg Zn na 100 IU inzulínu.

Ve výhodném provedení obsahuje ve výsledném produktu roztok uvedený v kroku a) nebo roztok uvedený v kroku b) chlorid, s výhodou chlorid sodný, v množství odpovídajícím 0 až 100 mM, výhodněji 5 až 40 mM, ještě výhodněji 5 až 20 mM ve výsledném produktu.

Je výhodné, když kyselý roztok uvedený v kroku a) má pH pod 5, ještě výhodněji v oblasti 2 až 3,5.

Analog inzulínu je výhodně lidský inzulín kde v poloze B28 je Asp, Lys, Leu, Val nebo Ala a v poloze B29 je Lys nebo Pro; nebo des(B28-B30), des(B27) nebo des(B30) lidský inzulín, výhodněji Asp^{B28} lidský inzulín nebo Lys^{B28}Pro^{B29} lidský inzulín a ještě výhodněji Asp^{B28} lidský inzulín.

Fenolická sloučenina, použitá v roztoku uvedeném v kroku a) anebo v kroku b) je s výhodou fenol, m-krezol nebo jejich směs.

Je výhodné, když roztok uvedený v kroku a) anebo v kroku b) dále obsahuje ve vodě rozpustný redukovaný nebo neredukující sacharid, který má nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo ve vodě rozpustný neredukující esterový či éterový derivát sacharidu nebo redukovaného sacharidu, který má nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo směsi výše jmenovaných sloučenin.

Uvedený sacharid nebo analog sacharidu výhodně obsahuje 5 až 18 atomů uhlíku ve své základní struktuře.

Ve zvláště výhodném provedení roztok uvedený v kroku a) anebo v kroku b) obsahuje manitol, sorbitol, xylitol, inozitol, trehalózu, sacharózu nebo směsi výše jmenovaných sloučenin, výhodněji manitol anebo sorbitol, ještě výhodněji manitol.

Sloučenina použitá jako základ pufru v zásaditém roztoku uvedeném v kroku b) je výhodně fyziologicky tolerovaný pufr, výhodněji fosfátový pufr, ještě výhodněji dihydrát monohydrofosforečnanu sodného.

Vysrážený analog inzulínu je s výhodou ve formě krystalů, obsahujících analog inzulínu a protamin.

Suspenze, získaná v kroku b) je s výhodou ponechána pro srážení při teplotě v rozmezí 5 - 40 °C, výhodněji 20 - 36 °C, ještě výhodněji 30 - 34 °C.



Popis obrázků

Obr. 1 je mikrofotografie (1000-násobné zvětšení) přípravku podle vynálezu, obsahujícího krystaly lidského Asp^{B28} protamin-inzulínu a manitol.

Obr. 1 je mikrofotografie (1000-násobné zvětšení) přípravku podle vynálezu, obsahujícího krystaly lidského protamin-inzulínu a manitol.

Na Obr. 3 je graficky znázorněn časový průběh působení přípravku podle vynálezu, obsahujícího jak rozpuštěný, tak krystalický lidský Asp^{B28} inzulín spolu s časovým průběhem působení přípravku, obsahujícího jak rozpuštěný, tak krystalický lidský inzulín. oba přípravky dále obsahují manitol. Na grafu je znázorněna reakce hladiny krevní glukózy po injekci u vepřů. Obrázek ukazuje, že u vysoce stabilního lidského Asp^{B28} inzulínu je zachován rychlý nástup působení.

Vynález je dále doložen následujícími příklady, které však nejsou míněny jako omezování oblasti uplatnění vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad I

Přípravek 1

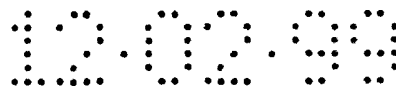
Inzulínový přípravek, obsahující jak rozpuštěný, tak krystalický Asp^{B28} lidský inzulín, byl připraven následujícím způsobem:

Roztok A:

Roztok Asp^{B28} lidského inzulínu o koncentraci 200 IU/ml byl připraven rozpuštěním 76,5 mg Asp^{B28} lidského inzulínu ve vodě za přidání 326 μ l 0,2 N kyseliny chlorovodíkové a 163 μ l roztoku chloridu zinečnatého (0,4 mg/ml). Poté bylo za míchání přidáno do roztoku inzulínu 6,35 mg protamin sulfátu a směs obsahující 17,2 mg m-krezolu, 15 mg fenolu a 455 mg manitolu. U výsledného čirého roztoku bylo změřeno pH 2,6 až 2,9, pak bylo přidáno 10 ml vody. Roztok byl vytemperován na 28 - 32 °C.

Roztok B:

Ve vodě pro injekce bylo rozpuštěno 25 mg dihydrátu monohydrofosforečnanu sodného. Za míchání bylo přidáno 17,2 mg m-krezolu, 15 mg fenolu a 455 mg manitolu. U výsledného čirého roztoku bylo změřeno pH 9, pak bylo přidáno 10 ml vody. Roztok byl vytemperován na 28 - 32 °C.



Smíchání roztoků A a B:

Roztok B byl přidán k roztoku A a pH bylo upraveno na 7,30. Výsledná suspenze byla ponechána krystalovat při 30 °C po dobu 6 dní. Ve výsledném přípravku byl váhový poměr vysráženého k rozpuštěnému inzulínu 70:30. Přípravek byl naplněn do zásobníků Penfill®.

Příklad II

Přípravek 2

Inzulínový přípravek, obsahující jak rozpuštěný, tak krystalický Asp^{B28} lidský inzulín, byl připraven následujícím způsobem:

Roztok A:

Roztok Asp^{B28} lidského inzulínu o koncentraci 200 IU/ml byl připraven rozpuštěním 190,3 mg Asp^{B28} lidského inzulínu ve vodě za přidání 813 µl 0,2 N kyseliny chlorovodíkové a 410 µl roztoku chloridu zinečnatého (0,4 mg/ml). Poté bylo za míchání přidáno do roztoku inzulínu 16,1 mg protamin sulfátu a směs obsahující 43,0 mg m-krezolu, 37,5 mg fenolu, 909 mg manitolu a 14,6 mg chloridu sodného. U výsledného čirého roztoku bylo změřeno pH 2,6 až 2,9, pak bylo přidáno 22 ml vody. Roztok byl vytemperován na 32 °C.

Roztok B:

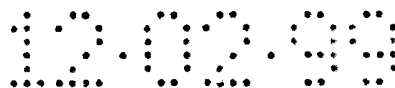
Ve vodě pro injekce bylo rozpuštěno 62,4 mg dihydrátu monohydrofosforečnanu sodného. Za míchání bylo přidáno 43,0 mg m-krezolu, 37,5 mg fenolu, 909 mg manitolu a 14,6 mg chloridu sodného. U výsledného čirého roztoku bylo změřeno pH 9, pak bylo přidáno 22 ml vody. Roztok byl vytemperován na 32 °C.

Smíchání roztoků A a B:

Roztok B byl přidán k roztoku A, pH bylo upraveno na 7,30 a pak bylo přidáno 50 ml vody. Výsledná suspenze byla ponechána krystalovat při 32 °C po dobu 4 dní. Ve výsledném přípravku byl váhový poměr vysráženého k rozpuštěnému inzulínu 70:30. Přípravek byl naplněn do zásobníků Penfill®.

Příklady III – VI

Přípravky 3 až 6



Inzulínové přípravky, obsahující jak rozpuštěný, tak krystalický Asp^{B28} lidský inzulín, byly připraveny jak je popsáno v Příkladu II, kromě toho, že množství manitolu použitého v roztoku A a B bylo 818 mg, 1005 mg, 1047 mg a 1137 mg. Přípravky byly naplněny do zásobníků Penfill®.

Příklad VII

Přípravek VII

Inzulínový přípravek, obsahující jak rozpuštěný, tak krystalický Lys^{B28} Pro^{B29} lidský inzulín, byl připraven následujícím způsobem:

i) Krystalická frakce

Roztok A:

Roztok Lys^{B28} Asp^{B29} lidského inzulínu o koncentraci 200 IU/ml byl připraven suspendováním 69,7 mg Lys^{B28} Asp^{B29} lidského inzulínu ve vodě. Poté bylo za míchání přidána do tohoto roztoku směs, obsahující 16,0 mg m-krezolu, 6,5 mg fenolu, 364 mg manitolu a 25,1 mg dihydrátu monohydrofosforečnanu sodného. Poté bylo přidáno 50 µl roztoku chloridu zinečnatého (10 mg/ml). U výsledného čirého roztoku bylo pH upraveno na 7,4, pak bylo přidáno 10 ml vody. Roztok byl vytemperován na 15 °C.

Roztok B:

Roztok protamin sulfátu byl připraven rozpuštěním 7,61 mg protamin sulfátu a 25,1 mg dihydrátu monohydrofosforečnanu sodného ve vodě. Za míchání bylo přidáno 16,0 mg m-krezolu, 6,5 mg fenolu a 364 mg manitolu. Tento roztok byl za míchání přidán k roztoku protamin sulfátu. U výsledného čirého roztoku bylo pH upraveno na 7,4, pak bylo přidáno 10 ml vody. Roztok byl vytemperován na 15 °C.

Smíchání roztoků A a B:

Roztok B byl přidán k roztoku A, pH bylo upraveno na 7,30. Výsledná suspenze byla ponechána krystalovat při 15 °C po dobu 3 dní.

ii) Rozpustná frakce

Roztok Lys^{B28} Asp^{B29} lidského inzulínu byl připraven rozpuštěním 34,9 mg Lys^{B28} Asp^{B29} lidského inzulínu ve vodě za přidání 33 µl 1 N kyseliny chlorovodíkové a 25 µl roztoku chloridu zinečnatého (10 mg/ml). Poté bylo za míchání přidána do roztoku inzulínu směs, obsahující 26,1 mg dihydrátu monohydrofosforečnanu sodného, 6,5 mg fenolu, 16,0 mg m-krezolu a 364 mg manitolu. U výsledného čirého roztoku bylo



změřeno pH 7,3, pak bylo přidáno 10 ml vody. Šest ml rozpustné frakce bylo přidáno k 14 ml krystalické frakce a pH bylo upraveno na 7,30. Ve výsledném přípravku byl váhový poměr vysráženého k rozpuštěnému inzulínu 70:30. Přípravek byl naplněn do zásobníků Penfill®.

Příklad VIII

Přípravek VIII

Inzulínový přípravek, obsahující jak rozpuštěný, tak krystalický lidský inzulín, byl připraven následujícím způsobem:

i) Krystalická frakce

Roztok A:

Roztok lidského inzulínu byl připraven rozpuštěním 69,7 mg lidského inzulínu ve vodě za přidání 65 μ l 1 N kyseliny chlorovodíkové a 26 μ l roztoku chloridu zinečnatého (10 mg/ml). Poté bylo za míchání přidáno k tomuto inzulínovému roztoku 6,0 mg protamin sulfátu v roztoku a směs, obsahující 15,0 mg fenolu a 17,2 mg m-krezolu. U výsledného čirého roztoku bylo změřeno pH 2,7 až 3,2, pak bylo přidáno 10 ml vody.

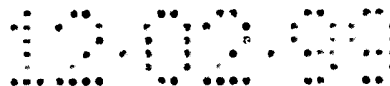
Roztok B:

Ve vodě bylo rozpuštěno 24,9 mg dihydrátu monohydrofosforečnanu sodného. Za míchání bylo přidáno 15,0 mg fenolu, 17,2 mg m-krezolu, 728 mg manitolu a 11,7 mg chloridu sodného. U výsledného čirého roztoku bylo pH upraveno na 9, pak bylo přidáno 10 ml vody.

Roztok B byl přidán k roztoku A, pH bylo upraveno na 7,30. Výsledná suspenze byla ponechána při 22 - 24 °C do následujícího dne.

ii) Rozpustná frakce

Roztok lidského inzulínu byl připraven rozpuštěním 34,9 mg lidského inzulínu ve vodě za přidání 33 μ l 1 N kyseliny chlorovodíkové a 13 μ l roztoku chloridu zinečnatého (10 mg/ml). Poté bylo za míchání přidána do roztoku inzulínu směs, obsahující 12,5 mg dihydrátu monohydrofosforečnanu sodného, 15 mg fenolu, 17,2 mg m-krezolu a 364 mg manitolu a 5,8 mg chloridu sodného. U výsledného čirého roztoku bylo změřeno pH 7,3, pak bylo přidáno 10 ml vody. Šest ml rozpustné frakce bylo přidáno k 14 ml krystalické frakce a pH bylo upraveno na 7,30. Ve výsledném přípravku byl váhový



poměr vysráženého k rozpuštěnému inzulínu 70:30. Přípravek byl naplněn do zásobníků Penfill®.

Příklad IX

Přípravek IX

Inzulínový přípravek, obsahující jak rozpuštěný, tak krystalický Asp^{B28} lidský inzulín, byl připraven následujícím způsobem:

Roztok A:

Roztok Asp^{B28} lidského inzulínu o koncentraci 200 IU/ml byl připraven suspendováním 189,9 mg Asp^{B28} lidského inzulínu ve vodě za přidání 163 µl 1 N kyseliny chlorovodíkové a 163,5 µl roztoku chloridu zinečnatého (10 mg/ml). Poté bylo za míchání přidáno do tohoto roztoku inzulínu 11,5 mg protamin sulfátu v roztoku a směs, obsahující 44,3 mg m-krezolu, 38,6 mg fenolu, 1048 mg manitolu a 7,3 mg chloridu sodného. U výsledného čirého roztoku bylo změřeno pH 2,6 až 2,9, pak bylo přidáno 25 ml vody. Roztok byl vytemperován na 22 - 24 °C.

Roztok B:

Ve vodě bylo rozpuštěno 62,3 mg dihydrátu monohydrofosforečnanu sodného. Za míchání bylo přidáno 44,3 mg m-krezolu, 38,6 mg fenolu, 1048 mg manitolu a 7,3 mg chloridu sodného. U výsledného čirého roztoku bylo změřeno pH 9, pak bylo přidáno 25 ml vody. Roztok byl vytemperován na 22 - 24 °C.

Smíchání roztoků A a B:

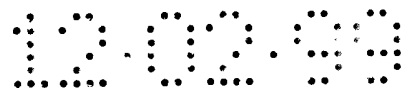
Roztok B byl přidán k roztoku A, pH bylo upraveno na 7,30. Výsledná suspenze byla ponechána krystalovat při 32 °C po dobu 2 dní.

Ve výsledném přípravku byl váhový poměr vysráženého k rozpuštěnému inzulínu 70:30. Přípravek byl naplněn do zásobníků Penfill®.

Příklad X (srovnávací)

Přípravek X

Inzulínový přípravek, obsahující jak rozpuštěný, tak krystalický Asp^{B28} lidský inzulín, byl připraven následujícím způsobem:



Roztok A:

Roztok Asp^{B28} lidského inzulínu o koncentraci 200 IU/ml byl připraven suspendováním 76,5 mg Asp^{B28} lidského inzulínu ve vodě za přidání 326 μ l 0,2 N kyseliny chlorovodíkové a 163 μ l roztoku chloridu zinečnatého (0,4 mg/ml). Poté bylo za míchání přidáno do tohoto roztoku inzulínu 6,35 mg protamin sulfátu v roztoku a směs, obsahující 17,2 mg m-krezolu, 15,0 mg fenolu a 160 mg glycerolu. U výsledného čirého roztoku bylo změřeno pH 2,6 až 2,9, pak bylo přidáno 10 ml vody. Roztok byl vytemperován na 28 - 32 °C.

Roztok B:

Ve vodě pro injekce bylo rozpuštěno 25 mg dihydrátu monohydrofosforečnanu sodného. Za míchání bylo přidáno 17,2 mg m-krezolu, 15,0 mg fenolu a 160 mg glycerolu. U výsledného čirého roztoku bylo změřeno pH 9, pak bylo přidáno 10 ml vody. Roztok byl vytemperován na 28 - 32 °C.

Smíchání roztoků A a B:

Roztok B byl přidán k roztoku A, pH bylo upraveno na 7,30. Výsledná suspenze byla ponechána krystalovat při 28 - 32 °C po dobu 2 dní.

Ve výsledném přípravku byl váhový poměr vysráženého k rozpuštěnému inzulínu 70:30. Přípravek byl naplněn do zásobníků Penfill®.

Příklad XI

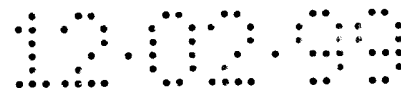
Testy fyzikální zátěže

Pět vzorků každého inzulínového přípravku bylo naplněno do zásobníků Penfill® a podrobeno následujícím testům fyzikální zátěže.

Zásobníky Penfill® byly upevněny na rotující zařízení, umístěné v inkubátoru, a rotovány o 360° po dobu 4 hodin denně, rychlostí 30 otáček za minutu, při konstantní teplotě 32 \pm 2 °C. Zásobníky Penfill® byly v době mimo otáčení uloženy při konstantní teplotě 32 \pm 2 °C.

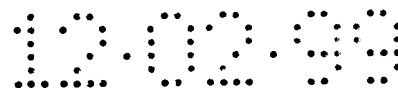
Zásobníky Penfill® byly makroskopicky prohlédnuty pětikrát za týden a změny ve vzhledu přípravku byly zaznamenávány podle následujících zásad:

- i) zásobníky, obsahující bílou suspenzi, která byla opět resuspendovatelná třepáním a bez chuchvalců a drobků, byly hodnoceny jako „nezfibrilovaný“.
- ii) zásobníky, obsahující suspenzi s chuchvalci a drobků, která nebyla resuspendovatelná třepáním anebo suspenzi usazenou na stěnách zásobníku, byly



hodnoceny jako „zfibrilovaný“. Toto hodnocení bylo potvrzeno přidáním 6 μ l 6N HCl do zásobníku. Zfibrilované zásobníky nebyly po přidání kyseliny vizuálně čiré.

Výsledky jsou shrnuty v následující Tabulce I



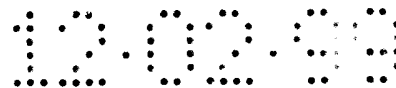
Přípravek č.	Složení	Průměrný počet dnů do fibrilace	První den fibrilace
1	Asp ^{B28} inzulín 30/70 7 mM fosfát 250 mM manitol	20	20
2	Asp ^{B28} inzulín 30/70 7 mM fosfát 200 mM manitol 10 mM chlorid sodný	23	23
3	Asp ^{B28} inzulín 30/70 7 mM fosfát 180 mM manitol 10 mM chlorid sodný	21	17
4	Asp ^{B28} inzulín 30/70 7 mM fosfát 220 mM manitol 10 mM chlorid sodný	19	17
5	Asp ^{B28} inzulín 30/70 7 mM fosfát 230 mM manitol 10 mM chlorid sodný	21	18
6	Asp ^{B28} inzulín 30/70 7 mM fosfát 250 mM manitol 10 mM chlorid sodný	22	22
9	Asp ^{B28} inzulín 50/50 7 mM fosfát 230 mM manitol 10 mM chlorid sodný	>30	>30
10 (srovnávací)	Asp ^{B28} inzulín 30/70 7 mM fosfát 174 mM glycerol	11	9

Průmyslová využitelnost

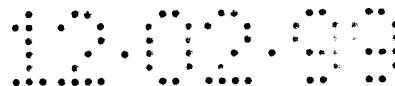
Inzulínové přípravky vyrobené podle vynálezu obsahují sacharidy, které značně zvyšují jejich fyzikální stabilitu a jsou s výhodou použitelné do zásobníků inzulínových per.

PATENTOVÉ NÁROKY

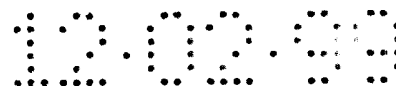
1. Vodný inzulínový přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rozpuštěný anebo vysrážený lidský inzulín nebo jeho analog či derivát a 100 až 400 mM, výhodněji 150 až 250, ještě výhodněji 180 až 230 mM ve vodě rozpustného, redukováného anebo neredukujícího sacharidu, který obsahuje nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo ve vodě rozpustný, neredukující esterový či éterový derivát sacharidu nebo redukováného sacharidu, který obsahuje nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo směs výše jmenovaných sloučenin.
2. Inzulínový přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený sacharid nebo sacharidový derivát obsahuje 5 až 18 atomů uhlíku ve své základní struktuře.
3. Inzulínový přípravek podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje manitol, sorbitol, xylitol, inozitol, trehalózu sacharózu, nebo jakoukoli jejich směs, výhodně manitol nebo sorbitol, ještě výhodněji manitol.
4. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků, který dále obsahuje halogenidy, výhodně chlorid, ještě výhodněji chlorid sodný.
5. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje analog lidského inzulínu, kde se v poloze B28 nalézají Asp, Lys, Leu, Val nebo Ala a v poloze B29 se nachází Lys nebo Pro; nebo lidský inzulín des(B28-B30), des(B27) nebo des(B30).
6. Inzulínový přípravek podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje že obsahuje analog lidského inzulínu, kde se v poloze B28 nalézají Asp nebo Lys a v poloze B29 se nachází Lys nebo Pro, výhodně Asp^{B28} lidský inzulín nebo Lys^{B28}Pro^{B29} lidský inzulín.



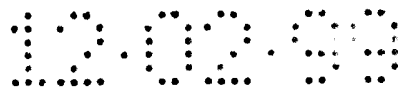
7. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje derivát lidského inzulínu, který má jeden nebo více lipofilních substituentů, výhodně acylovaný inzulín.
8. Inzulínový přípravek podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje derivát lidského inzulínu, patřící do následující skupiny: B29-N^ε-myristoyl-des(B30) lidský inzulín, B29-N^ε-myristoyl lidský inzulín, B29-N^ε-palmitoyl lidský inzulín, B28-N^ε-myristoyl Lys^{B28} Pro^{B29} lidský inzulín, B28-N^ε-palmitoyl Lys^{B28} Pro^{B29} lidský inzulín, B30-N^ε-myristoyl-Thr^{B29}Lys³⁰- lidský inzulín, B30-N^ε- palmitoyl-Thr^{B29}Lys³⁰- lidský inzulín, B29-N^ε-(N-palmitoyl-γ-glutamyl)-des(B30)-lidský inzulín, B29-N^ε-(N-lítochlyl-γ-glutamyl)-des(B30)-lidský inzulín a B29-N^ε-(ω-karboxyhepta-dekanoyl)-des(B30)-lidský inzulín, výhodně B29-N^ε-myristoyl-des(B30) lidský inzulín.
9. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krystaly lidského inzulínu nebo jeho analogu či derivátu a protamin.
10. Inzulínový přípravek podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že krystaly dále obsahují zinek a případně fenolickou sloučeninu, výhodně fenol, m-kresol nebo jejich směs.
11. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rozpuštěný i vysrážený, s výhodou krystalický inzulín nebo jeho analog, ve váhovém poměru 1:99 až 99:1, výhodně 20:80 až 80:20, ještě výhodněji 30:70 až 70:30.
12. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 60 až 3000 nm/ml, výhodně 240 až 1200 nm/ml lidského inzulínu nebo jeho analogu či derivátu.
13. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 0 až 100 mM, výhodně 5 až 40 mM, výhodněji 5 až 20 mM chloridu, výhodně chloridu sodného.



14. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje fyziologicky tolerovaný pufr, výhodně fosfátový pufr.
15. Vodný inzulínový přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rozpuštěný lidský inzulín nebo jeho analog či derivát, krystaly obsahující lidský inzulín nebo jeho analog či derivát a protamin a ve vodě rozpustný, redukovaný anebo neredukující sacharid, který obsahuje nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo ve vodě rozpustný, neredukující esterový či éterový derivát sacharidu nebo redukovaného sacharidu, který obsahuje nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo směs výše jmenovaných sloučenin.
16. Inzulínový přípravek podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený sacharid nebo sacharidový derivát obsahuje 5 až 18 atomů uhlíku ve své základní struktuře.
17. Inzulínový přípravek podle nároku 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje manitol, sorbitol, xylitol, inozitol, trehalózu sacharózu, nebo jakoukoli jejich směs, výhodně manitol nebo sorbitol, ještě výhodněji manitol.
18. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 15 až 17, který dále obsahuje halogenidy, výhodně chlorid, ještě výhodněji chlorid sodný.
19. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 15 až 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje analog lidského inzulínu, kde se v poloze B28 nalézá Asp, Lys, Leu, Val nebo Ala a v poloze B29 se nachází Lys nebo Pro; nebo lidský inzulín des(B28-B30), des(B27) nebo des(B30).
20. Inzulínový přípravek podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje že obsahuje analog lidského inzulínu, kde se v poloze B28 nalézá Asp nebo Lys a v poloze B29 se nachází Lys nebo Pro, výhodně Asp^{B28} lidský inzulín nebo Lys^{B28}Pro^{B29} lidský inzulín.



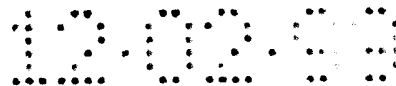
21. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 15 až 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje derivát lidského inzulínu, který má jeden nebo více lipofilních substituentů, výhodně acylovaný inzulín.
22. Inzulínový přípravek podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje derivát lidského inzulínu, patřící do následující skupiny: B29-N^ε-myristoyl-des(B30) lidský inzulín, B29-N^ε-myristoyl lidský inzulín, B29-N^ε-palmitoyl lidský inzulín, B28-N^ε-myristoyl Lys^{B28} Pro^{B29} lidský inzulín, B28-N^ε-palmitoyl Lys^{B28} Pro^{B29} lidský inzulín, B30-N^ε-myristoyl-Thr^{B29}Lys³⁰- lidský inzulín, B30-N^ε- palmitoyl-Thr^{B29}Lys³⁰- lidský inzulín, B29-N^ε-(N-palmitoyl-γ-glutamyl)-des(B30)-lidský inzulín, B29-N^ε-(N-litochlyl-γ-glutamyl)-des(B30)-lidský inzulín a B29-N^ε-(ω-karboxyhepta-dekanoyl)-des(B30)-lidský inzulín, výhodně B29-N^ε-myristoyl-des(B30) lidský inzulín.
23. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 15 až 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že krystaly dále obsahují zinek a případně fenolickou sloučeninu, výhodně fenol, m-kresol nebo jejich směs.
24. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 15 až 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rozpuštěný i vysrážený, s výhodou krystalický inzulín nebo jeho analog, ve váhovém poměru 1:99 až 99:1, výhodně 20:80 až 80:20, ještě výhodněji 30:70 až 70:30.
25. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 15 až 24, kde redukovaný nebo neredukující sacharid, výhodně manitol, je přítomen v množství, odpovídajícím 100 až 400 mM, výhodně 150 až 250 mM, ještě výhodněji 180 až 230 mM.
26. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 13 až 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 60 až 3000 nm/ml, výhodně 240 až 1200 nm/ml lidského inzulínu nebo jeho analogu či derivátu.



27. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 15 až 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 0 až 100 mM, výhodně 5 až 40 mM, výhodněji 5 až 20 mM chloridu, výhodně chloridu sodného.
28. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 15 až 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje fyziologicky tolerovaný pufr, výhodně fosfátový pufr.
29. Vodný inzulínový přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rozpuštěný i vysrážený analog lidského inzulínu, kde se v poloze B28 nalézá Asp, Lys, Leu, Val nebo Ala a v poloze B29 se nachází Lys nebo Pro; nebo lidský inzulín des(B28-B30), des(B27) nebo des(B30) a ve vodě rozpustný, redukovaný anebo neredukující sacharid, který obsahuje nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo ve vodě rozpustný, neredukující esterový či éterový derivát sacharidu nebo redukovaného sacharidu, který obsahuje nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo směs výše jmenovaných sloučenin.
30. Inzulínový přípravek podle nároku 29, kde uvedený sacharid nebo sacharidový derivát obsahuje 5 až 18 atomů uhlíku ve své základní struktuře.
31. Inzulínový přípravek podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje manitol, sorbitol, xylitol, inozitol, trehalózu, sacharózu, nebo jakoukoli jejich směs, výhodně manitol nebo sorbitol, ještě výhodněji manitol.
32. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 29 až 31, který dále obsahuje halogenidy, výhodně chlorid, ještě výhodněji chlorid sodný.
33. Inzulínový přípravek podle nároku 32, kde analog lidského inzulínu je takový lidský inzulín, kde se v poloze B28 nalézá Asp nebo Lys a v poloze B29 se nachází Lys nebo Pro; výhodně Asp^{B28} lidský inzulín nebo Lys^{B28}Pro^{B29} lidský inzulín.
34. Inzulínový přípravek podle nároku 33, kde analog lidského inzulínu je Asp^{B28} lidský inzulín.



35. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 29 až 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se skládá z krystalů, které obsahují analog inzulínu a protamin.
36. Inzulínový přípravek podle nároku 35, v y z n a č u j í c í s e t í m, že krystaly dále obsahují zinek a případně fenolickou sloučeninu, výhodně fenol, m-kresol nebo jejich směs.
37. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 29 až 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rozpuštěný a vysrážený, s výhodou krystalický analog inzulínu, ve váhovém poměru 1:99 až 99:1, výhodně 20:80 až 80:20, ještě výhodněji 30:70 až 70:30.
38. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 29 až 37, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 60 až 3000 nm/ml, výhodně 240 až 1200 nm/ml analogu lidského inzulínu.
39. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 29 až 39, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 0 až 100 mM, výhodně 5 až 40 mM, výhodněji 5 až 20 mM chloridu, výhodně chloridu sodného.
40. Inzulínový přípravek podle kteréhokoli z předešlých nároků 30 až 41, který dále obsahuje fyziologicky tolerovaný pufr, výhodně fosfátový pufr.
41. Parenterálně aplikovaný farmaceutický výrobek, obsahující inzulínový přípravek připravený podle kteréhokoli z předcházejících nároků.
42. Použití ve vodě rozpustného redukováného anebo neredukujícího sacharidu, který obsahuje nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo ve vodě rozpustného, neredukujícího esterového či éterového derivátu sacharidu nebo redukováného sacharidu, který obsahuje nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo směs výše jmenovaných sloučenin, pro zlepšení fyzikální stability inzulínových přípravků, obsahujících lidský inzulín nebo jeho analog či derivát.



43. Použití manitolu, sorbitolu, xylitolu, inozitolu, trehalózy, sacharózy, nebo jakékoli jejich směsi, výhodně manitolu nebo sorbitolu, ještě výhodněji manitolu, pro zlepšení fyzikální stability inzulínových přípravků, obsahujících lidský inzulín nebo jeho analog či derivát.
44. Způsob přípravy inzulínových přípravků, které obsahují jak rozpuštěný, tak vysrážený analog inzulínu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky:
- a) příprava kyselého roztoku, obsahujícího analog lidského inzulínu, zinek a subizofanické množství protaminu;
 - b) příprava zásaditého roztoku, obsahujícího látky, působící jako pufr při fyziologickém pH;
 - c) přičemž alespoň jeden z výše jmenovaných roztoků dále obsahuje fenolickou sloučeninu;
 - d) smísení kyselého a zásaditého roztoku a případné upravení pH na hodnotu v oblasti 6,5 až 8,0, výhodně 7,0 až 7,8; a
 - e) ponechání výsledné suspenze srážet se.
45. Způsob podle nároku 44, kde váhový poměr analogu inzulínu k protaminu v roztoku, uvedeném v kroku a) je vybrán tak, aby byl v konečném produktu získán váhový poměr rozpuštěného a vysráženého analogu inzulínu v oblasti 1:99 až 99:1, výhodně 20:80 až 80:20, ještě výhodněji 30:70 až 70:30.
46. Způsob podle nároku 45, kde roztok uvedený v kroku a) obsahuje 120 až 6000 nmol/ml analogu inzulínu a 0,01 až 5,0 mg/ml protaminu.
47. Způsob podle nároku 46, kde roztok uvedený v kroku a) dále obsahuje zinek, výhodně chlorid zinečnatý, v množství odpovídajícím 10 až 40 μg zinku/100 IU inzulínu, výhodně 15 až 35 μg zinku/100 IU inzulínu.
48. Způsob podle kteréhokoli z předešlých nároků 44 až 47, kde roztok uvedený v kroku a) anebo roztok uvedený v kroku b) obsahuje chlorid, výhodně chlorid

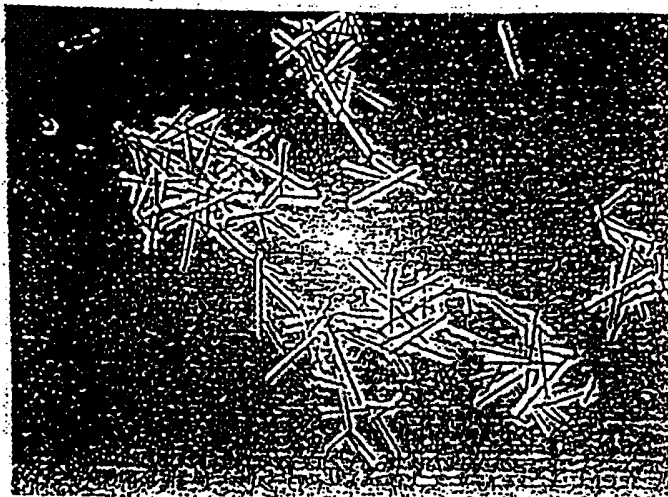


sodný, v množství odpovídajícím v konečném produktu 0 až 100 mM, výhodně 5 až 40 mM a ještě výhodněji 5 až 20 mM.

49. Způsob podle kteréhokoli z předešlých nároků 44 až 48, kde pH kyselého roztoku uvedeného v kroku a) je nižší než 5, výhodně v oblasti 2 až 3,5.
50. Způsob podle kteréhokoli z předešlých nároků 44 až 49, kde analog lidského inzulínu je takový lidský inzulín, kde se v poloze B28 nalézají Asp, Lys, Leu, Val nebo Ala a v poloze B29 se nachází Lys nebo Pro; nebo lidský inzulín des(B28-B30), des(B27) nebo des(B30).
51. Způsob podle nároku 50, kde analog lidského inzulínu je Asp^{B28} lidský inzulín nebo Lys^{B28}Pro^{B29} lidský inzulín, výhodně Asp^{B28} lidský inzulín.
52. Způsob podle kteréhokoli z předešlých nároků 44 až 51, kde roztok uvedený v kroku a) anebo roztok uvedený v kroku b) dále obsahuje fenolickou sloučeninu, výhodně fenol, m-krezol nebo jejich směs.
53. Způsob podle kteréhokoli z předešlých nároků 44 až 51, kde roztok uvedený v kroku a) anebo roztok uvedený v kroku b) dále obsahuje ve vodě rozpustný, redukovaný anebo neredukující sacharid, který obsahuje nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo ve vodě rozpustný, neredukující esterový či éterový derivát sacharidu nebo redukovaného sacharidu, který obsahuje nejméně 4 atomy uhlíku ve své základní struktuře, nebo směs výše jmenovaných sloučenin.
54. Způsob podle nároku 53, kde uvedený sacharid nebo sacharidový derivát obsahuje 5 až 18 atomů uhlíku ve své základní struktuře.
55. Způsob podle nároku 54, kde roztok uvedený v kroku a) anebo roztok uvedený v kroku b) obsahuje obsahuje manitol, sorbitol, xylitol, inozitol, trehalózu, sacharózu, nebo jakoukoli jejich směs, výhodně manitol nebo sorbitol, ještě výhodněji manitol.



56. Způsob podle kteréhokoli z předešlých nároků 44 až 55, kde pufrující sloučenina, použitá v zásaditém roztoku uvedeném v kroku b) je fyziologicky tolerovaný pufr, výhodně fosfátový pufr, ještě výhodněji dihydrát monohydrofosforečnanu sodného.
57. Způsob podle kteréhokoli z předešlých nároků 44 až 56, kde vysrážený analog inzulínu je ve formě krystalů, obsahujících analog inzulínu a protamin.
58. Způsob podle kteréhokoli z předešlých nároků 44 až 57, kde suspenze získaná v kroku a) je ponechána srážet při teplotě v rozsahu 5 - 40 °C, výhodně 20 - 36 °C, ještě výhodněji 30 - 34 °C.



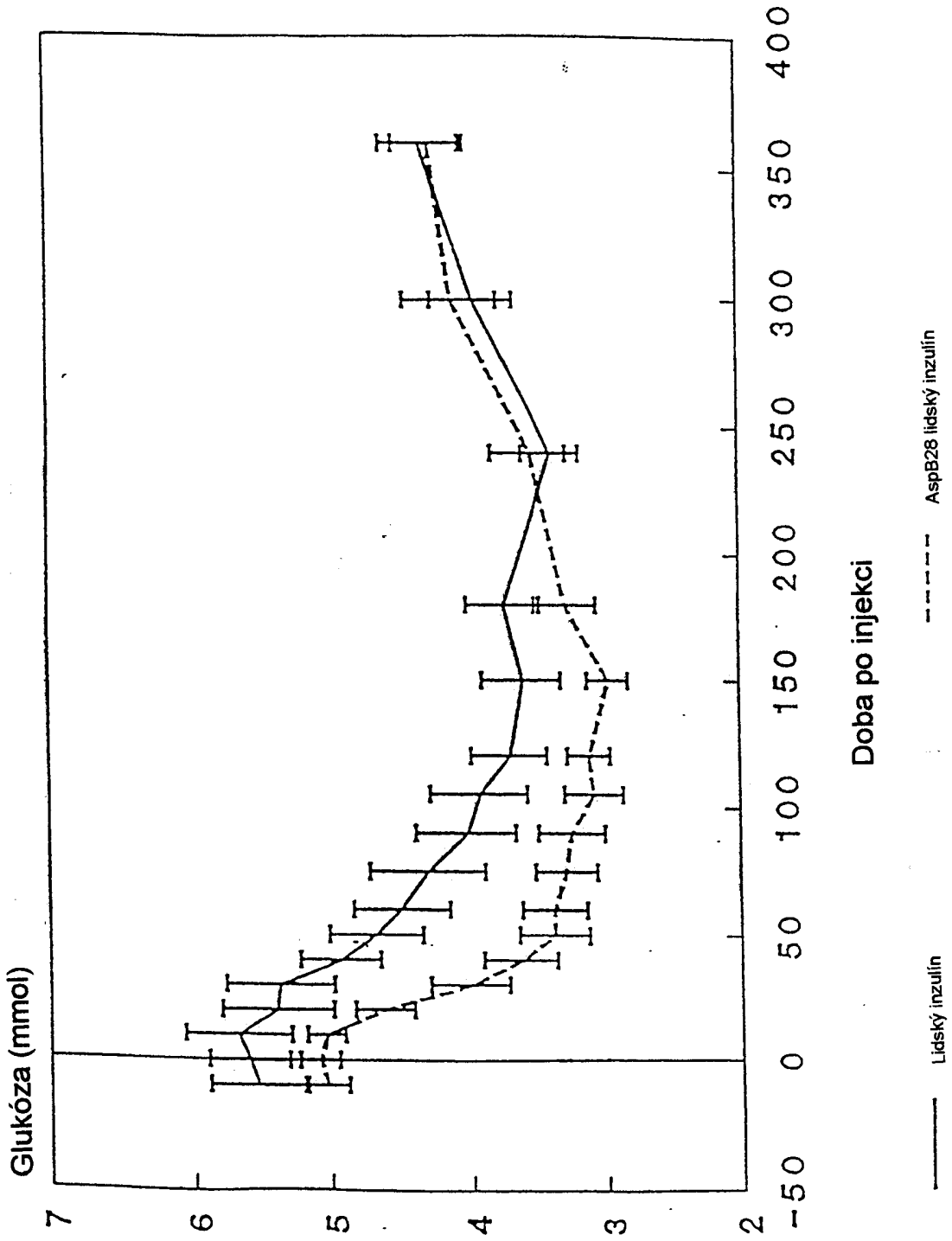
Obr. 1



Obr. 2

Hladina glukózy v krvi u 8 vepřů

Lidský inzulin a AspB28 lidský inzulin



Obr.3