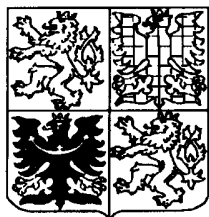


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 10.08.94

(32) 13.08.93

(31) 93/106106

(33) US

(40) 15.03.95

(21) 1937-94

(13) A3

6(51)

A 61 K 38/28

A 61 K 33/30

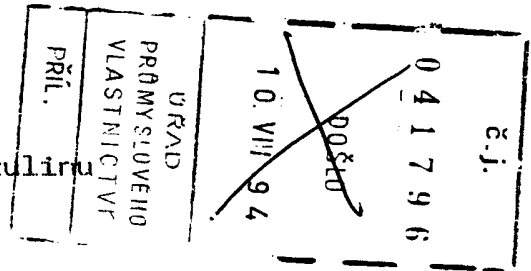
(71) ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US;

(72) Hoffmann James Arthur, Greenwood, IN, US;

(54) **Farmaceutický prostředek lidského inzulínu**

(57) Inzulínový farmaceutický prostředek obsahující suspenzi krystalů Ultrarente a velké množství zinku 0,5 až 20 mg na 100 jednotek inzulínu, přičemž více než 50 % celkového obsahu zinku v prostředku zůstává v rozpustné frakci, spíše než v komplexní vazbě s inzulínem a hodnota pH prostředku je 6,0 až 7,4 má charakter produktu pomalu uvolňujícího lidský inzulín. Prostředek je prost jiných proteínů, například protaminu.

Farmaceutický prostředek lidského inzulinu



Oblast techniky

Vynález spadá do oboru lidské medicíny a zvláště se týká ošetřování diabetes. Především se vynález týká farmaceutického prostředku, který obsahuje molekulu lidského inzulinu, která při podání blíže napodobuje bazální hladiny inzulinu v normálním lidském těle.

Dosavadní stav techniky

Hlavním terapeutickým cílem při ošetřování diabetes je fyziologické řízení hladiny glukózy v krvi. Pro tento účel jsou dostupné četné různé obchodní produkty a farmaceutické prostředky. Pro rychlé zvýšení glukózy, ke kterému dochází v období jídla, jsou nejvhodnější rychle působící inzulinové produkty, jako jsou například Humulin Regular nebo tak zvané monomerní inzulinové analogy.

Jiným důležitým zdrojem glukozového zatížení nemocných je nízká hladina uvolňování bazální glukózy z jater. Je to primárně výsledkem postprandiálních metabolických procesů, jako jsou například glukoneogeneze a glykogenolyza. V případě diabetických jedinců se toto bazální uvolňování glukózy může podstatně zvýšit v noci a vede k prodloužené periodě hyperglycemia, zvláště v časných ranních hodinách vede k jevu, označovanému jakožto úsvitový jev ("dawn phenomenon"). Tyto periody hyperglycemia se jeví jakožto důležitý přispěvatel vysokým hladinám glykovaných proteinů, často měřených jakožto glykosylovaný hemoglobin. Konstrukce těchto derivatizovaných proteinových produktů navozuje při dlouhodobých aplikacích, spojených s diabetes, neuropatií, nefropatií a retinopatií.

Ideální inzulinový farmaceutický prostředek se zřetelem na bazální uvolňování glukózy by měl zajišťovat pomalou, stálou infuzi inzulinu do krevního systému, aby bylo zajištěno nízké uvol-

ňování glukózy z jater. Se zřetelem na ideální bazální účinnost v čase je nejlepším parenterálním produktem obchodně dostupný hovězí inzulín Ultralente. Při vstřikování jednou denně zaručuje nízké, stále uvolňování inzulínu do krevního systému bez jakéhokoliv inzulínového píku.

Hlavním problémem hovězího Ultralente je však skutečnost, že hovězí inzulín má odlišný sled aminokyselin od lidského inzulínu. Lidské tělo může považovat hovězí inzulín za cizí protein. Chronické vstřikování této imunogenné látky diabetickým jedincům může vést k vytvoření protilátek k inzulínu. To může vést ke změnám doby působení inzulínu a potence a k jiným problémům spojeným s jedincovým aktivovaným imunitním systémem. Z těchto důvodů zůstává hovězí Ultralente neideálním, parenterálním inzulínovým farmaceutickým prostředkem.

Rozdíly typů inzulínů Ultralente

Příchod nové rekombinantní DNA technologie a nových enzymatických technik pro převádění vepřového inzulínu na lidský inzulín vedlo k nadměrné nabídce lidského inzulínu od roku 1980. Překonáním problémů se shora uvedeným hovězím Ultralente byla logicky příprava lidských krystalů Ultralente a jejich zpracování na farmaceutické prostředky pro parenterální podání. Formy krystalů, tvary krystalů, velikosti krystalů, způsoby přípravy a formulace farmaceutických prostředků lidského a hovězího Ultralente jsou v podstatě stejné.

Avšak několik let klinických zkoušek vedlo ke konečnému zjištění, že tyto produkty identické nejsou. Skutečně klinické zprávy naznačují, že lidský Ultralente rychleji působí než hovězí Ultralente, zatímco vepřový Ultralente je se zřetelem na dobu působení mezi oběma těmito farmaceutickými prostředky. V klinické praxi to vedlo k tomu, že mnozí lékaři a diabetologové doporučovali systém vstřikování dvakrát denně pro lidský Ultralente. Kromě toho výrazný pík absorpce inzulínu do krevního oběhu se pozoruje 12 hodin po subkutánním podání. Tento jev nejen snižuje vhodnot tohoto produktu pro protipůsobení ke stálému vylučování bazální glukózy jater, vede také k hyperinsulinemii, která sa-

motná může vést k makrovaskulárním komplikacím.

Důvody rozdílů časového působení lidského a hovězího inzulínu produktů Ultralente nejsou plně známy. Přítomnost protilátek k hovězímu inzulínu není primární příčinou tohoto rozdílu v časovém působení. Některé výzkumy ukázaly že inzulín z lidského Ultralente se mnohem rychleji absorbuje z místa vstříku než hovězí Ultralente. Další objasnění tohoto problému vplynulo ze zkoušek rozpouštění, dále popsanych. Na základě modifikací dříve popsanych zkoušek se zjistilo, že krystal hovězího Ultralente po zředění potřebuje mnohem delší dobu k rozpuštění než srovnatelný lidský krystal Ultralente. Rozdíly sledu aminokyselin mezi hovězím a lidským inzulínem podobně vytvářejí mírný rozdíl inzulínového hexameru se zřetelem na krystaly, což může vést k rozdílu jejich následné rozpouštěcí rychlosti. Po vstříknutí do podkožní tkáně toto zpožděné rozpouštění hovězích krystalů vede k jejich prodloužené absorpci a k prodlouženému biologickému působení.

Syntéza lidských inzulínových analogů byla zkoumána jakožto jedna z cest prodloužení doby jejich působení. Obzvláště se prováděly modifikace například Gly(A21)Arg(B27)Thr-NH₂(B30) lidského inzulínu (Jorgensen a kol., British Medical Journal 299, str. 415 až 419 (1989) a modifikace polohy Glu(B13) (Hansen, Biophysical Chemistry 39, str. 107 až 110, 1991). Avšak v každém z těchto případů zavedení nového aminokyselinového sledu vytvářelo cizí molekulu pro lidské tělo a tak potenciálně stejnou nebo dokonce vyšší imunogenitu než hovězí inzulín. Použití přirozené lidské inzulínové molekuly by bylo proto rozhodně lepší než zavedení nové inzulínové molekuly. V žádném případě nebylo popsáno, že by se vysoce zinkem obohacené lidské prostředky Ultralente ani látky pro přípravu takových prostředků za účelem prodloužení doby působení imunologicky výhodného lidského Ultralente prostředku vyrovnaly biologickému časovému působení farmakokineticky výhodného farmaceutického prostředku hovězího Ultralente nebo byly lepší.

Zinek a inzulín

Již mnoho let je známo, že inzulín může úspěšně společně

krystalovat s atomy zinku k získání četných typů stálých krystalů s delší dobou působení než rozpustný nebo amorfní, nekystalický inzulin. Jako komplexačního činidla pro inzulin bylo také použito rybího proteinu protamin k prodloužení doby působení inzulinu avšak pro svoji heterogenitu a možnou imunogenicitu je toto řešení málo atraktivní pro subkutanní léčebné chronické podávání.

V časných letech 1950 byly vyvinuty nové formulace hovězích inzulinových krystalů, které obsahují pouze inzulin a zinek v acetátovém pufru při neutrální hodnotě pH (Hallas-Moller a kol., Science 116, str. 394 až 398, 1952). Tento Lente inzulin se je prost fosfátových iontů, které silně vzájemně působí se zinečnatými ionty za vytváření nerozpustných derivátů fosforečnanu zinečnatého. Prostředky, obsahující pouze krystalický inzulin v acetátovém pufru, jsou označovány jakožto Ultralente. Krystaly, připravené tímto způsobem, se zde označují jakožto "inzulinové krystaly Ultralente".

Jakkoliv je zapotřebí pouze dvou atomů zinku k vytvoření komplexu s každým inzulinovým hexamerem k vytvoření vlastních Ultralente krystalů, určitý molární nadbytek zinku je v každém prostředku Ultralente a zjistilo se, že je vhodné podávat hovězí Ultralente vstříknutím jednou denně (Schlichtkrull, Insulin Crystals, Ejnar Munksgaard Publishers, Copenhagen, 1958). V téže publikaci (str. 92) se uvádí: "Zdá se, že trvání působení se poněkud zkracuje, když se vepřový inzulin nahradí hovězím inzulinem v Ultralente. Proto k zajištění konstantního odměřování terapeutických suspenzí je nutné přidržet se přísně jednoho a téhož typu inzulinu nebo nalézt pevný poměr mezi inzulinem od různých typů." Podobně se uvádí, že vepřový Ultralente inzulin se mnohem rychleji absorbuje diabetiky než hovězí Ultralente inzulin (Brange, Galenics of Insulin, str. 28, Springer-Verlag, Berlin, 1987). Avšak právě prostřednictvím těchto rozdílů typů se zjistilo, že vepřový inzulin je podobnější struktuře lidského inzulinu a proto je méně imunogenní než hovězí inzulin. Možné změny farmaceutického prostředku k prodloužení doby působení vepřového Ultralente, aby byl ekvivalentní se zřetelen na dobu působení nebo lepší než hovězí

Ultralente nebyly však ani doloženy ani navrženy. Ve skutečnosti se již dříve (Hallas-Moller, Diabetes 5, str.7 až 15, 1956) zjistilo, že koncentrace zinku nad 0,2 mg na 100 jednotek inzulínu by nebylo pomocí pro prodlouženou dobu působení Lente (nebo Ultralente) inzulínových farmaceutických prostředků jakéhokoliv typu.

Uvádí se, že přibližně 0,09 mg zinku na 100 jednotek inzulínu se váže na nerozpustné hovězí Ultralente krystaly (14 atomů zinku na inzulínový hexamer) zatímco poměrně nízká koncentrace, přibližně 0,05 mg/ml volného zinku, zůstává nevázána v supernatantu. Zjistilo se, že obě tyto koncentrace zůstávají konstantní i když se síla inzulínové formulace zvýší z 40 J/ml na 100 J/ml (Brange, Galenics of Insulin, str. 37, Springer-Verlag, Berlin, 1987).

V americkém patentovém spise číslo 5 070186 se uvádí, že inzulínové farmaceutické prostředky obsahující vysokou koncentrací (0,02 až 0,05M) kationtu hořčíku jakožto jiného dvoumocného kovu, poskytují rychleji působící inzulínové produkty. Avšak nyní se s překvapením zjistilo, že přidání pevného chloridu nebo acetátu zinečnatého nebo koncentrovaného vodného roztoku chloridu nebo acetátu zinečnatého přímo do farmaceutického prostředku lidského Ultralente na konečnou celkovou koncentrací zinku přibližně 0,5 až přibližně 20 mg na 100 jednotek inzulínu prodlužuje rozpouštění krystalů a může prodloužit jeho biologickou dobu působení, která je pak tak pomalá jako v případě hovězího Ultralente nebo dokonce i pomalejší. Zjistilo se také, že tato modifikace je výsledkem doprovodného snížení hodnoty pH z přibližně 7,4 na tak nízkou hodnotu jako je 6,2. Dále se zjistilo, že výsledkem této modifikace je, že většina přidaného zinku zůstává v supernatantu a není vázána na nerozpustný inzulínový krystal. Nemění rovněž významně tvar a velikost krystalů nebo chemickou stabilitu inzulínu ve farmaceutických prostředcích po určité době skladování.

Podstata vynálezu

Farmaceutický prostředek lidského inzulínu podle vyná-

lezu je založen na tom, že obsahuje suspenzi inzulínových krystalů Ultralente a přibližně 0,5 až přibližně 20 mg zinku na 100 jednotek inzulínu v prostředku jako celku.

Vynález je tedy zaměřen na inzulínový prostředek obsahující suspenzi Ultralente inzulínových krystalů za celkové koncentrace zinku v prostředku přibližně 0,5 mg až přibližně 20 mg na 100 jednotek inzulínu. Více než 50 % zinku v prostředku je v rozpustné frakci spíše než ve formě komplexu s inzulínem. Tento inzulínový prostředek má hodnotu pH obecně přibližně 6,0 až přibližně 7,4. Tento zinkem modifikovaný prostředek má charakteristiky velmi dlouhodobě působícího lidského inzulínového produktu.

Jednotlivé výrazy a zkratky zde mají následující význam:

Výraz "koncentrace zinku v prostředku jako celku" znamená celkovou koncentraci zinku v prostředku ať je již zinek komplexně vázán s inzulínem nebo je v rozpustné formě.

Výrazem "Ultralente inzulín" se míní prostředek obsahující inzulínové krystaly, připravené v acetátovém pufru v podstatě podle Hallas-Mollera a kol., Science, 116, str. 394 až 398, (1952). Krystaly, připravené tímto způsobem, se zde označují jakožto inzulínové krystaly Ultralente.

Výrazem "J" se míní standardní mezinárodní jednotka inzulínové účinnosti.

Výrazem "Zn" se míní zinek.

Všchny použité zkratky aminokyselin se používají v souladu s americkým úřadem patentů a ochranných známek podle 37 C.F.R. § 1.822 (b) (2) (1990).

Vynález je zaměřen na inzulínový prostředek obsahující suspenzi krystalů Ultralente a zinek v koncentraci přibližně 0,5 až 30 mg na 100 jednotek inzulínu v prostředku jakožto celku. Více než 50 % zinku v prostředku je v rozpustné frakci spíše než ve formě komplexu s inzulínem. Tento inzulínový prostředek má hodnotu pH obecně přibližně 6,0 až přibližně 7,4. Kromě toho inzulínový prostředek podle vynálezu neobsahuje jiné proteiny, jako je protamin. Prostředek může obsahovat konzervační přísadu nebo isotonická činidla a může také obsahovat pufr, který nevykazuje

silnou reakci se zinkem. Tento zinkem modifikovaný prostředek se vyznačuje velmi dlouhodobým působením.

Prostředky podle vynálezu se mohou připravovat přidáváním zinku do předem připravených suspenzí Ultralente inzulínových krystalů nebo přidáním zinku po krystalizačním stupni při výrobě Ultralente. Zinek se může přidávat v pevné formě nebo ve formě roztoku. Nebo se suspenze krystalů Ultralente může přidávat do pevného zinku nebo do roztoku zinku.

Podle vynálezu se jakožto zinku může používat různých zinečnatých solí. Jakožto příklady zinečnatých solí se uvádějí acetát, bromid, chlorid, fluorid, jodid a síran zinečnatý. Pro pracovníky v oboru je zřejmé, že se mohou používat četné jiné zinečnaté soli pro přípravu zinkem modifikovaných Ultralente inzulínových prostředků. S výhodou se však používá acetátu nebo chloridu zinečnatého pro výrobu zinkem modifikovaných Ultralente inzulínových prostředků podle vynálezu, jelikož tyto soli nevnášejí další chemické ionty do obchodně dostupných farmaceutických prostředků Ultralente.

Vynález je tedy zaměřen na podstatné zvýšení koncentrace zinku v supernatantu farmaceutických prostředků lidského Ultralente bez výrazné modifikace samotných krystalů Ultralente. S překvapením se zjistilo, že tyto farmaceutické prostředky lidského Ultralente obohacené zinkem mohou prodloužit dobu rozpouštění nerozpustných krystalů inzulínu a prodloužit tak dobu biologického působení ve srovnání s nemodifikovanými farmaceutickými prostředky lidského Ultralente.

Vypuštění výrazných modifikací krystalů Ultralente může být důležité z několika důvodů. Především se farmaceutických prostředků Ultralente používá při chronickém podávání diabetikům po dobu 40 let a samotného lidského Ultralente již téměř 10 let. Zinkem modifikované farmaceutické prostředky vykazují rekordní bezpečnost. Dále by podstatné zvýšení zinku v komplexní formě s krystaly inzulínu mohlo vést k agregaci krystalů. V průběhu doby by se mohly vytvářet shluky, čímž by se farmaceutické prostředky stávaly nepoužitelnými. Zkoušky se zinkem modifikovaných

farmaceutických prostředků lidského inzulinového Ultralente podle vynálezu nevykazují podstatněji modifikované nebo shluklé inzulinové krystaly. Konečně modifikace inzulinového krystalu zinkem by mohla vést ke změně samotné inzulinové struktury, což by mohlo měnit jeho biologické vlastnosti nebo dokonce jeho imunogenicitu.

Současný pokles hodnoty pH, ke kterému dochází při přípravě modifikovaných farmaceutických prostředků Ultralente, může být také důležitý. Je známo, že vrůstající koncentrace rozpustných zinečnatých iontů zbyšuje chemické štěpení inzulinu mezi zbytkem A8(threonin) a A9 (serin) i když je inzulin přítomen ve formě nerozpustných krystalů (Brange a kol., Pharmaceutical Research 9, str. 715 až 726, 1992). Mírné snížení hodnoty pH inzulinových farmaceutických prostředků pod 7 minimalizuje tuto štěpicí reakci a tím zlepšuje dlouhodobou stabilitu. Je rovněž možné, že tento pokles hodnoty pH může být částečně zodpovědný za minimální vzájemné působení nadbytku zinku s inzulinovým krystalem, jelikož je známo, že se vzájemné působení proteinů a zinku snižuje v kyselějších oblastech hodnot pH (Schlichtkrull, Insulin Crystals, Ejnar Munksgaard Publishers, Copenhagen, 1958).

Nové, zinkem modifikované farmaceutické prostředky lidského Ultralente podle vynálezu mají další přídatné charakteristiky. Způsob přípravy je možný dlouho po přípravě originálního farmaceutického prostředku lidského Ultralente. Takovým způsobem se mohou přidávat různé koncentrace zinku dokonce podle potřeby jednotlivých nemocných v závislosti na žádoucí době působení. Pro tyto farmaceutické prostředky není zapotřebí žádných nových excipientů, komplexotvorných látek, chemikálií nebo organických rozpouštědel, takže lze předcházet let neznámé toxicitě při dlouhodobém podávání chemických látek po mnoho let. Konečně hodnota pH konečného roztoku 6,0 až 7,4 je velmi blízká hodnotě pH podkožní tkáně (7,4), takže nevede k žádnému dráždění.

Vynález se tedy týká farmaceutických prostředků lidských krystalů Ultralente, vhodných pro ošetřování diabetes subkutánním vstříkáním; takové injekce poskytují pomalou absorpci inzulinu takže popřípadě stačí jedno vstříknutí denně. Farmaceutické pros-

tředky podle vynálezu mohou rovněž obsahovat konzervační přísadu, jako je například methylparaben, činidlo pro isotonicitu, například chlorid sodný, přičemž celkový obsah zinku je přibližně 0,5 až 20 mg na 100 inzulínových jednotek a hodnota pH je 6,0 až 7,4. Pracovníkům v oboru je jasné, že lze použít také jiných konzervačních činidel a jiných činidel k úpravě isotonicity v prostředcích podle vynálezu. Podle výhodného provedení celkový obsah zinku je přibližně 0,5 až 7 mg na 100 inzulínových jednotek a hodnota pH je 6,2 až 7,2. Podle jiného výhodného provedení je hodnota pH pro všechny koncentrace zinku výsledkem přidání vhodného množství pevného chloridu zinečnatého, pevného acetátu zinečnatého nebo koncentrovaného vodného roztoku těchto činidel do předem formulovaného roztoku lidského Ultralente, to znamená, že se neprovádí žádná další úprava hodnoty pH.

Pro srovnání se dále uvádí koncentrace zinku a inzulínu uvedené v literatuře a v patentových spisech, přičemž se v tabulce I uvádějí ekvivalenty zinku a inzulínu ve směsi a v tabulce II ekvivalenty zinku v roztoku.

Tabulka I

Kombinace zinek/inzulín

mekv Zn/g inzulínu	% Zn v krystalu bezvodého inzulínu	μM Zn/ μM inzulínu	μM Zn/ μM inzulín- hexameru	mg Zn/100 Jedno- tek inzulínu	μg (gama) Zn/Jedn. inzulínu
0,12	0,38	0,33	2,0	0,013	0,13
0,31	1,00	0,90	5,4	0,035	0,35
0,89	2,75	2,51	15,1	0,100	1,00
2,66	8,00	7,75	46,5	0,300	3,00
4,43	12,70	12,80	77,0	0,500	5,00
66,00	68,50	192,50	1155,0	7,500	75,00
177,00	85,30	514,20	3086,0	20,000	200,00

Tabulka II

Zinek v roztoku

mekv Zn/l	% Zn	mg Zn/ml	mM Zn/l
0,306	0,001	0,01	0,153
0,612	0,002	0,02	0,306
1,530	0,005	0,05	0,765
3,060	0,010	0,10	1,530
6,120	0,020	0,20	3,060
15,300	0,050	0,50	7,650
30,600	0,100	1,00	15,300
61,200	0,200	2,00	30,600
153,000	0,500	5,00	76,500
306,000	1,000	10,00	153,000
612,000	2,000	20,00	306,000

Následující příklady praktického provedení vynález blíže objasňují bez záměru jeho jakéhokoliv omezení.

Příklady provedení

Příklad 1

Příprava zinkem modifikovaných farmaceutických prostředků lidského Ultralente

Použije se Humulinu Ultralente (Lilly, Indianapolis, IN) a Ultralente (hovězího) inzulínu nastaveného suspenzí inzulínu a zinku USP (Novo Nordisk, Baksvaerd, Dánsko), obou v koncentraci 100 inzulínových jednotek na ml (J100). Těchto formulací, obsahujících celkovou koncentraci zinku přibližně 0,15 mg/ml, se použije buď přímo nebo po zředění na J40 pomocí sterilníhoředidla Sterile Diluent pro Ultralente inzulín (Lilly), který obsahuje 0,05 mg zinku. Do předem zvážených vzorků pevného chloridu zinečnatého (EM Science, Cherry Hill, NJ) se přidá přímo roztok J100 nebo J40 inzulínu Ultralente. Alternativně se přidají do farmaceutických

prostředků J100 Humulin Ultralente různá množství koncentrovaných roztoků chloridu zinečnatého (100 mg/ml vody) nebo octanu zinečnatého s nastavenou hodnotou pH (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, 200 mg/ml vody). Celková koncentrace zinku se stanoví buď kombinací vypočtených koncentrací zinku v inzulínu, v rozpouštědle a v reagentech, nebo se zjišťuje experimentálně atomovou absorpční spektroskopií.

Příklad 2

Hodnota pH zinkem modifikovaných farmaceutických prostředků lidského Ultralente

Běžné farmaceutické prostředky Ultralente mají hodnotu pH přibližně 7,4. Zinkem modifikované farmaceutické prostředky Ultralente se připraví podle příkladu 1 a zjišťují se jejich hodnoty pH. Údaje jsou v tabulce III.

Tabulka III

Vzo- rek	Síla	Způsob	Použité	celkově		Konečné pH
	(J/ml)	přidání Zn	Zn-činidlo	Konečné mg Zn/ml	mg Zn/100 J inzulínu prostředku	
1	40	žádný	žádné	0,09	0,23	7,38
2	40	pevný	chlorid	0,25	0,63	7,30
3	40	pevný	chlorid	0,59	1,48	7,03
4	40	pevný	chlorid	1,09	2,73	6,80
5	40	pevný	chlorid	2,40	6,00	6,75
6	40	pevný	chlorid	7,31	18,28	6,34
7	100	žádný	žádné	0,15	0,15	7,37
8	100	pevný	chlorid	2,60	2,60	6,84
9	100	pevný	chlorid	7,40	7,40	6,41
10	100	pevný	chlorid	12,20	12,20	6,21
11	97	vodný	chlorid	1,59	1,64	6,80
12	94	vodný	chlorid	2,92	3,11	6,73

13	93	vodný	chlorid	3,81	4,10	6,63
14	91	vodný	chlorid	4,55	5,00	6,59
15	83	vodný	chlorid	8,18	9,86	6,41
16	91	vodný	acetát	5,60	6,15	6,75
17	83	vodný	acetát	10,09	12,16	6,51

^a stanoveno

Hodnoty pH těchto farmaceutických prostředků jasně mírně poklesly po přidání zinečnatého reakčního činidla. Vzorky, připravené s acetátem zinečnatým, vykazují menší pokles hodnoty pH než vzorky připravené s chloridem zinečnatým. V dalších popsanych příkladech, s výjimkou příkladu 3B se neprovádějí žádné další úpravy hodnoty pH v roztocích takto připravených.

Zjišťuje se také, že přidání nepatrných množství roztoků hydroxidu sodného do těchto zinkem zesílených farmaceutických prostředků po přidání zinečnatého činidla může poněkud zvýšit hodnotu pH. Nastavení hodnoty pH farmaceutických prostředků až na pH 7,4 přísadou větších množství hydroxidu sodného, způsobuje však okamžité vytváření chuchvalcovitých sraženin pravděpodobně druhu hydroxidu zinečnatého, což činí farmaceutický prostředek nepoužitelným pro další účely. Na druhé straně přísada kyselých roztoků, jako například kyseliny chlorovodíkové nebo octové ke snížení hodnoty pH po přípravě zinkem zesílených farmaceutických prostředků Ultralente, nezpůsobuje žádné problémy se sraženinami, avšak chromatografická analýza HPLC supernatantů dokládá, že malá přídatná procenta krystalů Ultralente se během tohoto okyselování rozpouštějí. Okyselování rozředěnou kyselinou octovou se jeví jako nejlepší, jelikož minimalizuje nebo eliminuje rozpouštění inzulínu, jako v příkladě 3B. Proto jelikož lze bezpečně provádět mírné úpravy hodnot pH těchto zinkem zesílených suspenzí Ultralente, není vynález omezen pouze na hodnoty pH, které jsou výsledkem přísad specifických zinkových reakčních činidel.

Příklad 3

Koncentrace zinku ve farmaceutických prostředcích lidského Ultralente modifikovaných zinkem

A. Podobně jako u vzorku 8 podle příkladu 2 se připraví zinkem zesílený farmaceutický prostředek lidského Ultralente. Množství 1 ml z každé ze tří suspenzí se stanovenou celkovou koncentrací zinku 0,7 až 2,5 mg na 100 inzulínových jednotek a z nezměněného inzulínového farmaceutického prostředku Humulin Ultralente se ručně míchá po dobu 30 minut při teplotě 25 °C a pak se uloží při teplotě 5 °C po dobu 20 hodin. Každá suspenze se pak vede 0,2 µm filtrem Acrodisc^R (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI). Filtrát se zředí 9 ml 0,1N kyseliny chlorovodíkové. Nerozpustné krystaly zůstanou na filtru a rozpustí se pomalým proléváním 10 ml 0,1N kyseliny chlorovodíkové každým filtrem. Stanovuje se koncentrace zinku v těchto roztocích atomovou absorpcí a zpět se vypočtou koncentrace zinku v supernatantech nebo v inzulínových krystalech původního farmaceutického prostředku. Výsledky jsou uvedeny v tabulce IV.

Tabulka IV

Vzorek číslo	Vázaný zinek mg/ml	Volný zinek mg/ml	Celkový zinek v supernatantu %
1	0,12	0,07	36,8
2	0,19	0,63	76,8
3	0,18	1,30	87,8
4	0,20	2,60	92,9

Tato zkouška dokládá, že většina zvláště přidaného zinku zůstává v supernatantu a neváže se s krystalem inzulínu ani na formu komplexu ani kovalentně.

B. Podobně jako v případě vzorku 8 podle příkladu 2 se připraví 20 ml farmaceutického prostředku obsahujícího přibližně 2,5 mg/ml zinku. V případě poloviny této suspenze se hodnota pH (6,81)

neupravuje, zatímco hodnota pH druhé poloviny se nastavuje na 6,15 přidáním malého objemu zředěné kyseliny octové. Suspenze se uloží při teplotě 5 °C. V různé době se stanovuje koncentrace zinku v supernatantech a v nerozpustných krystalech shora popsaným způsobem. Hodnoty, získané při těchto zkouškách, jsou uvedeny v tabulce V.

Tabulka V

Hodnota Dny při Vázaný zinek Volný zinek Celkový zinek
v supernatantu

pH	5 °C	mg/ml	mg/ml	%
	0	0,27	2,18	89,0
	2	0,26	2,75	91,4
	4	0,37	2,14	85,3
	7	0,39	2,50	86,5
6,81	10	0,35	2,50	87,7
	15	0,42	2,25	84,3
	21	0,36	2,75	88,4
	28	0,35	3,25	90,3
	0	0,29	2,14	88,1
	2	0,28	2,18	88,6
	4	0,25	2,12	89,4
	7	0,40	2,50	86,2
6,15	10	0,30	3,00	90,9
	15	0,33	2,50	88,3
	21	0,35	2,50	87,7
	28	0,33	2,75	89,3

Tato zkouška dokládá, že nastavení hodnoty pH zředěnou kyselinou octovou nemění rozdělení zinku mezi supernatantem a nerozpustnými inzulinovými krystaly. Dokládá také, že rozdělení zinku se při uložení nijak výrazně nemění. Většina zinku zůstává v su-

pernatantové frakci v obou uvedených farmaceutických prostředcích.

Příklad 4

Stabilita zinkem modifikovaných farmaceutických prostředků lidského Ultralente

A. Způsobem podle příkladu 2 se připraví několik zinkem zesílených farmaceutických prostředků lidského Ultralente a zkoušejí se mikroskopicky za 43 násobného zvětšení. Všechny suspenze vykazují typickou rhombohedrální formu krystalů Ultralente, zjištěnou v nemodifikovaných prostředcích. Velikost, tvar a integrita krystalů v zinkem modifikovaných suspenzích je skutečně nerozlišitelná od nemodifikovaných suspenzí. Přítomnost výrazného množství cizích, nepatřících nerozpustných nekrystalických částic v těchto prostředcích se nezjistila.

Tyto farmaceutické prostředky se chovají při víření stejně jako nemodifikované farmaceutické prostředky Ultralente. Po víření vykazuje krystalická suspenze rovněž stejné charakteristiky usazování jako nemodifikované farmaceutické prostředky Ultralente jak se zřetelem na dobu potřebnou k dokonalému usazení krystalů tak se zřetelem na objem, který krystaly zaujmají.

B. Připraví se zinkem zesílený farmaceutický inzulinový prostředek lidského Ultralente, obsahující přibližně 7,5 mg/ml zinku (podobně jako vzorek 9 podle příkladu 2). Nemodifikovaný farmaceutický inzulinový prostředek lidského Ultralente (podobně jako vzorek 7 podle příkladu 2) se používá ke kontrolním účelům. Oba vzorky se ukládají při teplotě 5 °C na dobu přibližně jednoho roku. Pak se inzulinové krystaly opět rozpustí ve zředěné kyselině chlorovodíkové a hodnotí se jejich čistota systémem reverzní fázové vysoce výkonné kapalinové chromatografie (HPLC). Používá se při teplotě 40 °C kolony 4,6 x 250 mm Zorbax C-8, obsahující částice o velikosti pórů 15 nm. Inzulin se hodnotí při rychlosti průtoku 0,7 ml/min v gradientu acetonitrilu obsahujícím 0,225 M síran amonný při hodnotě pH přibližně 2.

Po jednom roce je čistota nemodifikovaného farmaceutického inzulínového prostředku lidského Ultralente 96,4% s několika neidentifikovanými píky vždy v oboru 0,2 % a s A²¹desamidoinzulínovým píkem o přibližně 1 %. Farmaceutický inzulínový prostředek lidského Ultralente, obsahující 7,5 mg/ml zinku, po jednom roce vykazuje celkovou čistotu inzulínu 96,8 % s několika neidentifikovanými píky vždy v oboru 0,1 až 0,2 % a s A²¹desamidoinzulínovým píkem o přibližně 1 %. Nový, neznámý pík eluující před inzulínem, nepozorovaný ve vzorku nemodifikovaného farmaceutického inzulínového prostředku lidského Ultralente, je obsažen 0,3 %.

Tyto zkoušky dokládají, že farmaceutické prostředky modifikované zinkem si podržují svoji stabilitu krystalů Ultralente s hlediska svého rozměru a tvaru. Rovněž při vysokých koncentracích zinku ve farmaceutických prostředcích Ultralente nemění výrazněji chemickou čistotu inzulínové molekuly po skladování po dobu jednoho roku při teplotě 5 °C.

Příklad 5

Zkouška rozpustnosti

Tato zkouška je modifikací dříve popsané zkoušky (Graham a Pomeroy, J. Pharm. Pharmacol. 36, str. 427 až 430, 1983). Využívá rychlosti rozpouštění inzulínového krystalu po výrazném zředění puforem nevázejícím zinek jakožto cesty předpovídání rychlosti, kterou se bude krystalický prostředek rozpouštět po skutečném vstříknutí živočichům. Je to proto, že pro inzulínové suspenze je rychlost rozpouštění nerozpustného inzulínu po vstříknutí hlavním faktorem pro biologickou odezvu. Proto se může usuzovat, že inzulínový farmaceutický prostředek, který se rozpouští mnohem pomaleji při této zkoušce ve srovnání s lidským Ultralente, bude pomaleji působit v případě biologických modelů.

Podobným způsobem jako vzorek 8 podle příkladu 2 se připraví tři zinkem zesílené farmaceutické prostředky lidského Ultralente, obsahující zinku 0,35, 0,7 a 2,5 mg/ml. Objem 0,5 ml těchto suspenzí a 0,5 ml podíl nemodifikovaného farmaceutického pros-

tředku J100 lidského a hovězího Ultralente se vždy přidá do 50 ml pufru 0,1M tris (tris-hydroxymethylaminomethan, Mallinckrodt, Paris, KY) o hodnotě pH 7,5 za míchání při teplotě 25 °C ve skleněné baňce o obsahu 80 ml. V době tří a osmi hodin se odeberou alikvotní podíly míchaných suspenzí a vedou se filtrem 0,2 µm Acrodisc^R. Kvantitativně se stanovuje množství inzulínu ve filtrátu reverzní fázovou chromatografií HPLC. Stanovuje se maximální obsah inzulínu HPLC v nefiltrovaném okyseleném alikvotním podílu. V podstatě není žádný solubilizovaný inzulín na začátku zkoušky rozpustnosti. Hodnoty, zjištěné při zkoušce, jsou uvedeny v tabulce VI.

Tabulka VI

Ultra- lente	Stanovená koncentrace zinku mg/ml	Maximální množství rozpuštěného inzulínu (3 hodiny) %	Maximální množství rozpuštěného inzulínu (8 hodin) %
typ			
lidský	0,15	16,30	44,70
lidský	0,35	4,50	10,70
lidský	0,70	2,40	6,30
lidský	2,50	1,10	3,20
hovězí	0,15	3,20	6,20

Tato zkouška dokládá, že nemodifikovaný lidský Ultralente se znova rozpouští mnohem rychleji než modifikovaný hovězí Ultralente. Dokládá také, že přidání zinku do lidského Ultralente do koncentrace přibližně 0,7 mg na 100 inzulínových jednotek způsobuje, že se inzulínové krystaly rozpouštějí stejnou rychlostí jako nemodifikované krystaly hovězího Ultralente. Při dodání lidskému Ultralente koncentrace zinku přibližně 2,5 mg na 100 inzulínových jednotek způsobuje dokonce pomalejší rychlost rozpouštění, než jakou má nemodifikovaný hovězí Ultralente inzulín.

Příklad 6

Kontinuální průtoková zkouška rozpouštění

Tato zkouška je modifikací dříve popsané průtokové zkoušky (Brange, Galenics of Insulin, str. 46 Spinger-Verlag, Berlin, 1987 a Graham a Pomeroy, J. Pharm. Pharmacol. 36, str. 427 až 430, 1983). Zředí se 2 ml podíly nemodifikovaného lidského a hovězího Ultralente inzulínu a vzorku lidského Ultralente obsahujícího 0,7 mg zinku na 100 inzulínových jednotek (jako popsáno v příkladu 5) vždy 48 ml 0,1M pufru tris při hodnotě pH 7,5. Každých 50 ml suspenze se bezprostředně vede filtrem 0,2 μm Acrodisc^R a promyje se 5 ml vody. Každý filtr se pak umístí in-line na eluční trubku systému FPLC (Pharmacia, Piscataway, NJ). Každým filtrem se čerpá čerstvý 0,1M pufr tris o hodnotě pH 7,5 při průtokové rychlosti 1 ml/min. Absorbance eluantu pod filtrem se kontinuálně monitoruje spektroskopicky pro eluování inzulínu po více než dvě hodiny při vlnové délce 214 nanometrů. Různé podíly eluantu se rovněž zkoušejí reverzní fázovou chromatografií HPLC k potvrzení přítomnosti lidského nebo hovězího inzulínu.

Inzulín v hovězích Ultralente krystalech je pouze velmi pomalu rozpustný v čerstvém tris pufru. Eluování hovězího inzulínu se potvrzuje chromatografií HPLC podílu eluantu. Inzulín v nemodifikovaných lidských Ultralente krystalech vykazuje rychlejší rozpouštění s píkem při přibližně 35 minutách a udržuje se poměrně vysoké rozpouštění v průběhu celé zkoušky. Farmaceutický prostředek lidského Ultralente, obsahující 0,7 mg/ml zinku, vykazuje velmi podobnou odezvu jako nemodifikovaný vzorek lidského Ultralente, nikoliv však jako hovězí Ultralente. To potvrzuje, že časný filtrační stupeň při zkoušce odstraňuje veškerý nevázaný zinek z tohoto farmaceutického prostředku a zbylé krystaly se chovají zcela podobně jako nemodifikované krystaly lidského Ultralente. To jasně dokládá podstatný rozdíl rychlosti rozpouštění lidských a hovězích inzulínových krystalů. Hodnoty z této zkoušky jsou uvedeny v tabulce VII.

Tabulka VII

Relativní absorbance

Doba Ultralente hovězí Ultralente lidský Ultralente lidský
min 0,7 mg/ml Zn

0	0	0	0
2,5	12,5	3,5	12,5
5,0	9,0	8,0	11,5
10,0	8,0	23,0	19,0
15,0	7,0	38,0	31,7
20,0	7,9	52,0	45,0
25,0	8,0	59,0	60,0
30,0	7,4	63,0	72,0
35,0	8,1	64,0	79,5
40,0	8,0	61,0	79,0
45,0	8,3	57,5	73,0
50,0	7,8	52,0	68,0
55,0	8,2	45,5	60,0
60,0	8,5	40,0	52,2
65,0	8,5	36,0	45,5
70,0	8,8	31,5	39,5
75,0	9,0	29,5	36,3
80,0	9,7	26,0	25,0
90,0	9,6	23,0	22,1
100,0	10,4	20,2	22,1
110,0	11,0	18,5	24,3
120,0	11,2	16,6	24,0
130,0	12,0	15,1	21,6

Příklad 7

Zkouška farmaceutického prostředku Ultralente na králících

Farmaceutický prostředek hovězího Ultralente (J40) a lidského Ultralente (J40), připravený jako vzorek 1 až 6 podle příkladu 2, se zkouší za použití normálních králíků. Používá se novozélandských bílých králíků, většinou samiček, vždy o hmotnosti 2,7 až

4 kg, ve věku Půl roku až 4 roky, které se nechají bez potravy 16 hodin před podáním zkušebního vzorku. Inzulinové suspenze se vždy vstříkují deseti králíkům subkutánně na zadní šíji v dávce 0,2 jednotek na 1 kg hmotnosti. V různých intervalech se odebírá 100 ul objem krve z okrajových ušních cév, smísí se s 900 ul objemy antikoagulantu (EDTA-natriumfluorid) a analyzují se na obsah glukózy. Hodnoty glukózy se standardizují k reflektování původního obsahu glukózy, naměřeného před vstříknutím vzorku. Hodnoty, zjištěné při této zkoušce, jsou uvedeny v tabulce VIII.

Tabulka VIII

Vzorek	Ultra- lente	Srovnávací koncentrace zinku mg/ml	Procento původního obsahu glukózy v krvi hodiny po vstříknutí			
			1	2	3	4
číslo	typ		%			
1	lidský	0,09	60,6	65,2	89,0	90,4
2	lidský	0,25	56,7	67,8	91,4	91,4
3	lidský	0,59	60,4	58,9	78,1	85,5
4	lidský	1,07	81,8	78,6	95,2	95,6
5	lidský	2,40	92,8	80,9	80,3	88,6
6	lidský	7,31	96,0	84,1	80,9	85,9
7	hovězí	0,15	60,1	60,1	96,7	95,7

Profil působení v čase v případě králíků je mnohem kratší než v případě lidí. Toto potlačení působení v čase vede k nevhodnosti tohoto pokusného zvířete k doložení významu rozdílu mezi farmaceutickými prostředky nemodifikovaného lidského a hovězího Ultralente (vzorek 1 ve srovnání se vzorkem 7). Vzdor tomuto omezení tato zkouška dokládá, že biologické působení lidského inzulinu Ultralente se dramaticky změní při přidání dostatečného množství zinku do farmaceutického prostředku. Jak dokládají vzorky 4 až 6, začátek silné biologické odezvy se posune nad jednu hodinu s nejhlubším bodem mezi 2 a 4 hodinami. Maximální pokles glukózy v krvi se také snižuje z přibližně 40 % v případě vzorků 1 až 3 (nejhlubší bod 1 hodina) na toliko přibližně 20%

pokles v případě vzorků 4 až 6 (nejhlubší bod 2 až 4 hodiny).
Farmaceutické prostředky s dostatečným obsahem zinku tedy jasně dokládají prodloužené působení ve srovnání s nemodifikovanými farmaceutickými prostředky lidského nebo hovězího Ultralente.

Průmyslová využitelnost

Inzulinový farmaceutický prostředek obsahující suspenzi krystalů Ultralente a celkové množství zinku 0,5 až 20 mg na 100 jednotek inzulínu, přičemž více než 50 % celkového obsahu zinku v prostředku zůstává v rozpustné frakci, spíše než v komplexní vazbě s inzulínem a hodnota pH prostředku je 6,0 až 7,4 má charakter produktu pomalu uvolňujícího lidský inzulín.


JUDr. Otakar ŠVORČÍK
advokát

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Farmaceutický prostředek lidského inzulínu, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že obsahuje suspenzi inzulínových
krystalů Ultralente a přibližně 0,5 až přibližně 20 mg zinku na
100 jednotek inzulínu v prostředku jako celku.
2. Farmaceutický prostředek lidského inzulínu podle nároku
1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje přidavně
konzervační činidlo.
3. Farmaceutický prostředek lidského inzulínu podle nároku
2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje přidavně
činidlo upravující isotonicitu.
4. Farmaceutický prostředek lidského inzulínu podle nároku
3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje přidavně
pufr.
5. Farmaceutický prostředek lidského inzulínu podle nároku
4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje celkově při-
bližně 0,5 až přibližně 7 mg zinku na 100 jednotek inzulínu.
6. Způsob přípravy inzulínového farmaceutického prostředku
podle nároku 1 až 5 , v y z n a č u j í c í s e t í m , že
se míchá zinek s inzulínovými krystaly Ultralente.
7. Způsob podle nároku 1 až 5 , v y z n a č u j í c í s e
t í m , že se používá zinečnaté soli volené ze souboru zahrnují-
cího acetát, bromid, chlorid, jodid, fluorid a síran zinečnatý.

