

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
30 мая 2024 (30.05.2024)



(10) Номер международной публикации
WO 2024/112231 A1

(51) Международная патентная классификация:

A61K 9/08 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01)
A61K 38/28 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS,
ZA, ZM, ZW.

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2023/050272

(22) Дата международной подачи:
24 ноября 2023 (24.11.2023)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
2022130796 26 ноября 2022 (26.11.2022) RU

(71) Заявитель: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИ-
ЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ГЕРО-
ФАРМ" (OBSHCHESTVO S OGRANICHENNOY
OTVETSTVENNOSTYU "GEROPHARM") [RU/RU];
ул. Звенигородская, д. 9 Санкт-Петербург, 191119,
Sankt-Peterburg (RU).

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы
изобретения и с повторной публикацией в случае
получения изменений (правило 48.2(h))

(72) Изобретатели: ШИТИКОВА, Виктория Олеговна
(SHITIKOVA, Viktoriya Olegovna); Измайловский
пр., д. 11, лит. А, кв. 60 Санкт-Петербург, 190005,
Sankt-Peterburg (RU). ЮДАЕВА, Нина Валерьевна
(YUDAEVA, Nina Valeryevna); ул. Ленинградская, д.
62, кв. 58 Ленинградская обл., г. Сосновый бор, 188540,
Leningradskaya obl., g. Sosnovyy Bor (RU).

(74) Агент: ДАНИЛЕНКО, Елена Леонидовна
(DANILENKO, Elena Leonidovna); ул. Тамбовская, д.
39, кв. 1 Санкт-Петербург, 192007, Sankt-Peterburg (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH,

(54) Title: COMPOSITION OF FAST-ACTING INSULIN (VARIANTS)

(54) Название изобретения: КОМПОЗИЦИЯ БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩЕГО ИНСУЛИНА (ВАРИАНТЫ)

(57) Abstract: The invention relates to the field of pharmaceuticals and medicine, and more particularly to compositions of fast-acting insulin preparations. Even more particularly, the present invention relates to compositions containing fast-acting insulin and an amino acid as a stabilizer, wherein the amino acid can be selected from among lysine and/or salts thereof or a combination of lysine and/or salts thereof and arginine and/or salts thereof. The claimed compositions exhibit better chemical and physical stability by comparison with the prior art.

(57) Реферат: Изобретение относится к области фармацевтики и медицины, а именно к композициям быстродействующих инсулиновых препаратов. Более конкретно, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим быстродействующий инсулин и аминокислоту в качестве стабилизатора, которая может быть выбрана из лизина и/или его соли или комбинации лизина и/или его соли с аргинином и/или его солью. Композиции по изобретению проявляют лучшую в сравнении с аналогом химическую и физическую стабильность.



WO 2024/112231 A1

КОМПОЗИЦИЯ БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩЕГО ИНСУЛИНА (ВАРИАНТЫ)

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области фармацевтики и медицины, а именно к композициям быстродействующих инсулиновых препаратов. Более конкретно, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим быстродействующий инсулин и аминокислоту в качестве стабилизатора, которая может быть выбрана из лизина и/или его соли или комбинации лизина и/или его соли с аргинином и/или его солью. Композиции по изобретению проявляют лучшую в сравнении с аналогами химическую и физическую стабильность.

Уровень техники

Инсулин представляет собой пептидный гормон, который регулирует уровень глюкозы в крови у млекопитающих, инициируя сигнальный каскад, который ускоряет поглощение глюкозы и выработку гликогена при связывании с рецептором инсулина. При нарушении выработки инсулина в крови повышается концентрация глюкозы (хроническая гипергликемия), что и является основным диагностическим признаком диабета 1-го типа (СД1). Однако при нарушениях передачи сигнала от инсулиновых рецепторов, даже если гормон вырабатывается в достаточных количествах, развивается диабет 2-го типа (СД2), обусловленный снижением чувствительности тканей к действию инсулина (инсулинорезистентность). Эффективность инсулина в лечении сахарного диабета, обусловленная способностью этого гормона снижать уровень глюкозы в крови, была доказана в течение десятилетий его применения в медицинской практике. Тем не менее, в настоящее время сохраняется актуальность в поиске новых подходов к терапии сахарного диабета в связи с увеличением количества случаев заболевания и необходимостью учета индивидуальных особенностей и предпочтений пациентов [1].

Разработка быстродействующих и сверхбыстродействующих аналогов инсулина, таких как, инсулин аспарт (НовоРапид®), инсулин глулизин (Апидра®) и инсулин лизпро (Хумалог®), имеющих более быстрое начало действия и меньшую продолжительность действия стала значительным шагом вперед в лечении диабета 1-го и 2-го типа. Составы лекарственных препаратов НовоРапид®, Апидра®, Хумалог® являются наиболее близкими аналогами композиций по изобретению.

В нейтральном растворе при фармацевтической концентрации инсулин и его аналоги находятся в форме стабилизированных цинксодержащих гексамеров, которые состоят из трех идентичных димерных единиц. Задержка действия инсулина в значительной степени связана со временем, которое требуется гексамерам для диссоциации на мономеры и димеры, способные к абсорбции [2,3]. Первый класс быстродействующих инсулинов (например, инсулин лизпро и аспарт) был разработан на основе аминокислотных мутаций в последовательности человеческого инсулина, что привело к ослаблению самоассоциации олигомеров инсулина. Так, например, замещение аминокислоты пролин в положении В28 на аспарагиновую кислоту в инсулине аспарт снижает тенденцию молекул к образованию гексамеров, которая наблюдается в растворе растворимого человеческого инсулина. В связи с этим инсулин аспарт гораздо быстрее всасывается из подкожно-жировой клетчатки по сравнению с растворимым человеческим инсулином и широко применяется для постпрандиального контроля уровня глюкозы в крови у пациентов с сахарным диабетом [4]. Молекулярная структура инсулина лизпро идентична структуре человеческого инсулина за исключением позиций 28 и 29 В-цепи молекулы, где лизин и пролин расположены в обратном порядке (инсулин человека: B28ProB29Lys, лизпро: B28LysB29Pro). Обратное расположение лизина и пролина позволяет молекуле лизпро диссоциировать в два раза быстрее. В структуре инсулина глутизин (3BLys29BGlu) аминокислотный остаток аспарагин в 3-м положении В-цепи молекулы инсулина человека заменен на лизин, а лизин в 29-м положении В-цепи заменен на глутамин, что способствует стабильности данного препарата в растворе в виде мономеров и димеров [1].

Химическая и физическая стабильность препаратов инсулина является необходимым условием обеспечения терапевтического эффекта препаратов или отсутствия у них побочных реакций, при этом стабильность должна быть обеспечена как при хранении в течение срока годности препаратов, так и при их использовании. Композиции инсулина производят, хранят и используют во флаконах, что требует их стабильности на протяжении срока хранения. Стабильные композиции инсулина особенно необходимы для использования в устройствах доставки, в которых они подвергаются воздействию повышенных температур, близких к температуре тела, и/или механических нагрузок, таких как, например, шприц-ручки для инъекций и системы непрерывной инфузии (с использованием помп).

Известно, что быстродействующие аналоги инсулина, которые находятся в мономерной или димерной форме, обладают пониженной по сравнению с гексамерами физико-химической стабильностью [5], в частности образуют

высокомолекулярные примеси, и повышенной склонностью к агрегации (фибрилляции), что проявляется в виде помутнений и осадка. Высокомолекулярные примеси (димеры, тримеры, полимеры) и агрегаты не только снижают введенную дозу инсулина, но и могут провоцировать раздражения или иммунные реакции у пациента. Кроме того, нерастворимые агрегаты могут закупоривать и повреждать иглы, канюли и шланги насосов в системах непрерывной инфузии. Для обеспечения качества инсулиновых композиций необходимо повышать их химическую и физическую стабильность.

На рынке существуют лекарственные препараты инсулина аспарт (например, «НовоРапид®» (Ново Нордиск А/С), «РинФаст®» (ООО «ГЕРОФАРМ»). Было показано, что можно улучшить общий гликемический контроль за счет введения в состав препарата вспомогательного вещества никотинамид, способного ускорять абсорбцию инсулина аспарт, в сравнении с препаратами инсулина аспарт без никотинамида. В частности, было показано, что препарат «Фиасп®» (содержит никотинамид) по сравнению с препаратом «НовоРапид®» (не содержит никотинамид) обеспечил улучшенный общий гликемический контроль и лучший гликемический контроль после приёма пищи без увеличения общего риска развития тяжёлых или подтверждённых гипогликемий у пациентов с СД1 и СД2. Фармакокинетические характеристики быстродействующего инсулина аспарт «Фиасп®» могут лучше воспроизводить быструю эндогенную секрецию прандиального инсулина и, таким образом, улучшать постпрандиальный контроль гликемии по сравнению с инсулином аспарт [6].

Никотинамид обладает способностью ускорять абсорбцию инсулина (WO 91/09617), в том числе инсулина аспарт (WO/9610417), однако оказывает негативное влияние на химическую стабильность – увеличивает содержание примесей (RU2533217). Химическая стабильность состава лекарственного препарата (ЛП) «Фиасп®» повышается за счет введения аргинина в состав, что отражается в уменьшении содержания димеров и полимеров, дезамидированных инсулинов при хранении (RU2533217). Состав ЛП «ФИАСП®» является еще одним из наиболее близких аналогов настоящего изобретения.

В патенте RU2533217 показано (пример 2), что добавление аргинина в состав композиций, содержащих инсулина аспарт с никотинамидом, уменьшает количество образующихся продуктов распада, особенно высокомолекулярного белка и дезамидированных форм, но при этом понижается физическая стабильность, измеряемая как время задержки в анализе с тιοфлавином Т, при увеличении концентрации аргинина физическая стабильность снижается еще больше.

В отчете о небольшом ($n = 37$) 6-недельном исследовании склонности инфузионных систем к засорению и неисправности, не было отмечено случаев закупоривания инфузионных систем ни препаратом ФИАСП (25 субъектов), ни инсулином аспарт (12 субъектов). Однако необъяснимая гипергликемия и преждевременная смена инфузионного набора чаще встречались при применении ФИАСПа по сравнению с применением инсулина аспарт [7].

Таким образом, в настоящее время сохраняется потребность в композициях быстродействующих инсулинов, обладающих повышенной химической стабильностью и в то же время приемлемой физической стабильностью. Особенно актуальна обозначенная выше техническая проблема для композиций быстродействующих инсулинов, таких как например, инсулин аспарт, инсулин лизпро или инсулин глулизин, отличающихся худшей стабильностью по сравнению с гексамерными формами инсулина, а также для композиций, содержащих никотинамид, способный ускорять абсорбцию инсулина, но в то же время негативно влияющий на химическую стабильность инсулина.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что композиции быстродействующего инсулина, содержащие в качестве стабилизатора аминокислоту, представляющую собой лизин и/или его соль или комбинацию лизина и/или его соли с аргинином и/или его солью, обладают улучшенной химической и физической стабильностью по сравнению с композициями инсулина без добавления аминокислот, а также с композициями инсулина, содержащими в качестве стабилизатора аминокислоту аргинин.

Таким образом, настоящее изобретение относится к композициям с улучшенной химической и физической стабильностью, содержащим быстродействующий инсулин и аминокислоту, которая представляет собой лизин или его соль, или комбинацию лизина или его соли с аргинином или его солью.

Настоящее изобретение относится к композициям для снижения уровня глюкозы в крови у субъекта, содержащим быстродействующий инсулин и аминокислоту, которая представляет собой лизин или его соль, или комбинацию лизина или его соли с аргинином или его солью.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения инсулин представляет собой инсулин аспарт, инсулин лизпро и инсулин глулизин.

Композиции инсулина глулизина дополнительно, но не обязательно, содержат метионин.

Концентрация быстродействующего инсулина в композициях по изобретению – от примерно 0,2 мМ до 2,0 мМ (от примерно 33 Ед./мл до примерно 333 Ед./мл), предпочтительно – от примерно 0,3 мМ до 1,2 мМ (от примерно 50 Ед./мл до примерно 200 Ед./мл), еще более предпочтительно – 0,6 мМ (100 Ед./мл).

В одном из вариантов настоящего изобретения композиции имеют рН от 6,5 до 8,5. Еще в одном из вариантов настоящего изобретения композиции имеют рН от 6,6 до 7,4. В одном из вариантов рН равен 7, 7,3, 7,4 или 7,5.

Композиции по изобретению, содержащие инсулин аспарт, дополнительно, но не обязательно, содержат соединение никотиновой кислоты, выбранное из никотинамида (ниацинамида), никотиновой кислоты (ниацина) и/или их соли и/или любой их комбинации, предпочтительное соединение никотиновой кислоты – никотинамид. Концентрация никотинамида или другого соединения никотиновой кислоты в композициях по изобретению, содержащих инсулин аспарт – от примерно 1 мМ и до примерно 200 мМ.

Концентрация лизина и/или его соли или суммарная концентрация лизина и/или его соли в комбинации с аргинином и/или его солью – от примерно 1мМ до примерно 100 мМ.

В композициях, содержащих комбинацию лизина и/или его соли и аргинина и/или его соли молярное соотношение аминокислот составляет от 4000 : 1 до 1 : 4000 соответственно, указанный диапазон включает каждое целочисленное соотношение, например 100 : 1, 99 : 1, 98 : 1 и т.д. В одном из предпочтительных вариантов молярное соотношение лизина к аргинину составляет 1 : 1, 4 : 5, 5 : 4, 6 : 4; 5 : 2 или 2 : 5.

В композициях по изобретению дополнительно могут содержаться ингибитор(ы) протеазы, ионы металлов, буферные системы, регуляторы рН, консервант(ы), изотонический агент(ы), хелатирующий агент(ы), стабилизаторы и поверхностно-активные вещества.

В одном из вариантов композиции по изобретению являются водными композициями, т.е. композициями, содержащими воду и являются растворами или суспензиями.

Композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения или профилактики гипергликемии, сахарного диабета 2 типа, нарушения толерантности к глюкозе, сахарного диабета 1 типа.

В одном из предпочтительных вариантов композиции по изобретению применяются парентерально. Парентеральное введение может быть выполнено

путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или внутривенной инъекции при помощи шприца, возможно шприца-ручки. Альтернативно парентеральное введение может быть выполнено с помощью инфузионного насоса.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к инъектируемым инсулиновым препаратам, содержащим композиции по настоящему изобретению.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термин «человеческий инсулин», используемый в настоящем документе, обозначает человеческий гормон, структура и свойства которого хорошо известны. Инсулин представляет собой полипептид из 51 аминокислоты, который разделен на 2 аминокислотные цепи: цепь А, состоящую из 21 аминокислоты, и цепь В, состоящую из 30 аминокислот. Цепи соединяются между собой с помощью 2 дисульфидных мостиков. Препараты инсулина используются для лечения сахарного диабета в течение многих лет, при этом в последнее время используют не только инсулины природного происхождения, но также производные и аналоги инсулина.

Под «аналогом инсулина», упоминаемым в настоящем документе, понимается полипептид, полученный из первичной структуры природного инсулина, например, человеческого инсулина, в результате мутации. Одну или более мутацию получают путем удаления и/или замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, происходящей в природном инсулине, и/или путем добавления по меньшей мере одного аминокислотного остатка. Мутации в инсулиновой молекуле обозначаются указанием цепи (А или В), положения и трехбуквенного кода для аминокислоты, заменяющей нативную аминокислоту.

Термин «быстродействующий инсулин» или «краткодействующий инсулин» относится к аналогам инсулина и/или производным инсулина, которые начинают действовать в пределах 5–15 минут и имеют продолжительность действия 3–4 часа. Примеры быстродействующих инсулинов включают в себя, но не ограничиваются, следующими: инсулин аспарт, инсулин лизпро и инсулин глулизин.

Термины «мономерный аналог человеческого инсулина», «мономерный аналог инсулина» хорошо известны в данной области и обычно относятся к быстродействующим аналогам человеческого инсулина. К ним относятся, например, инсулин лизпро (Хумалог®), инсулин аспарт (НовоРапид®) и инсулин глулизин (Апидра®).

Содержание быстродействующего инсулина в композициях по изобретению может находиться в диапазоне от примерно 0,2 мМ до примерно 2,0 мМ (от примерно 33 до примерно 333 международных единиц (МЕ)/мл), предпочтительно в диапазоне

от примерно 0,3 мМ до примерно 1,2 мМ (от примерно 50 до примерно 200 МЕ/мл), особенно предпочтительно в концентрации 0,6 мМ (100 Ед./мл), в препаратах для инъекций. Тем не менее, для других целей парентерального введения содержание инсулинового соединения может быть выше.

В данном контексте единица «МЕ» соответствует 6 нмоль.

Термин «композиция быстродействующего инсулина», используемый в настоящем документе, означает продукт, содержащий мономерный аналог инсулина и аминокислоту, выбранную из лизина и/или его соли или комбинации лизина и/или его соли с аргинином и/или его солью. Предпочтительно мономерный аналог инсулина в композиции представляет собой инсулин аспарт, инсулин лизпро и инсулин глулизин. Композиция инсулина аспарта по настоящему изобретению может содержать, но не обязательно, соединение никотиновой кислоты, выбранное из никотинамида (ниацинамида), никотиновой кислоты (ниацина) и/или их соли и/или любой их комбинации. Композиция быстродействующего инсулина может содержать, но не обязательно, также и другие эксципиенты, такие как консерванты, хелатирующие агенты, изотонические агенты, наполнители, стабилизаторы, антиоксиданты, полимеры и поверхностно-активные вещества, ионы металлов, масляные носители и белки (например, человеческий сывороточный альбумин, желатин или белки), регуляторы pH, при этом композиция быстродействующего инсулина может быть использована для лечения, профилактики или снижения тяжести заболевания или нарушения путем введения указанного инсулинового препарата человеку. Таким образом, композиция быстродействующего инсулина по настоящему изобретению может быть названа «фармацевтической композицией».

Термины «белковый препарат», «белковая композиция» и «белок» могут использоваться в рамках настоящего изобретения взаимозаменяемо и означают любое лекарственное средство, содержащее в качестве действующего вещества молекулу, состоящую из полипептидных цепей, состоящих из остатков аминокислот, линейно связанных пептидной связью, самостоятельно или в комбинации с другими соединениями. Инсулиновая композиция или инсулин, например, являются частными случаями и охватываются указанными терминами.

Термины «лизин» и «аргинин» относятся к аминокислотам и включают D- и L-энантиомеры, а также их смеси. Термин также включает любые фармакологически приемлемые соли лизина и аргинина. Лизин и аргинин легко образуют соли, например, гидрохлориды.

Термин «соединение никотиновой кислоты» включает никотинамид (ниацинамид), никотиновую кислоту (ниацин) и/или их соли и/или любую их комбинацию.

Буфер может быть выбран из группы, состоящей из ацетата натрия, карбоната натрия, цитрата, дигидрофосфата натрия, гидрофосфата натрия, фосфата натрия, а также трис(гидроксиметил)аминометана, бицина, трицина, яблочной кислоты, сукцината, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, аспарагиновой кислоты или их смесей, но не ограниченной ими. Каждый из этих конкретных буферов или каждая из их комбинаций является альтернативным вариантом изобретения.

Композиция быстродействующего инсулина по настоящему изобретению может содержать и другие ингредиенты, обычно используемые в инсулиновых препаратах, например, цинковые комплексообразующие агенты.

Изотонические агенты, такие как глицерин, манит, хлорид натрия, декстроза и др. также могут присутствовать в композициях по настоящему изобретению. Изотонический агент представляет собой физиологически приемлемое соединение, которое придает композиции подходящую тоничность с целью предотвращения диффузии воды через клеточные мембраны, находящиеся в контакте с фармацевтической композицией.

Композиция по настоящему изобретению может содержать фармацевтически приемлемый консервант. Консервант, присутствующий в композиции по настоящему изобретению, может быть фенолом, м-крезолом, метилпарабеном и др.

Композиция по настоящему изобретению также может содержать хелатирующий агент. Применение хелатирующих агентов в фармацевтических препаратах хорошо известно специалистам в данной области.

Композиция по настоящему изобретению также может содержать стабилизатор. Термин «стабилизатор», используемый в настоящем документе, относится к химическим веществам, добавляемым к фармацевтическим препаратам, содержащим полипептид для его стабилизации, т.е. для увеличения срока хранения и/или времени использования таких препаратов.

Термин «поверхностно-активное вещество» (ПАВ), используемый в настоящем документе, относится к любым молекулам или ионам, которые состоят из растворимой в воде (гидрофильной) части, головы, и жирорастворимого (липофильного) сегмента. ПАВ концентрируются преимущественно на поверхности раздела фаз, гидрофильной частью ориентируясь по направлению к воде

(гидрофильной фазе), а липофильной частью по направлению к маслу или гидрофобной фазе (т.е. стеклу, воздуху, маслу и т.д.). ПАВ снижают поверхностное натяжение жидкости. Они также известны как амфипатические соединения. Термин «детергент», как правило, является синонимом термина «поверхностно-активное вещество». Использование ПАВ в фармацевтических препаратах хорошо известно специалистам в данной области. К ним относятся, например, полисорбат 20, полисорбат 80, полоксамер 188 и др., эти вещества в качестве вспомогательных веществ описаны в действующих фармакопеях (USP, EP).

Используемый здесь термин «стабильность» относится к химической и физической стабильности композиций мономерных аналогов инсулина.

Термин «химическая стабильность» белковой композиции (белкового препарата) и/или белка, используемый в настоящем описании изобретения, относится к изменениям в ковалентной структуре белка, приводящим к образованию продуктов химического распада с потенциально меньшей биологической активностью и/или потенциально усиленными иммуногенными свойствами по сравнению с нативной структурой белка. Различные продукты химического распада могут быть сформированы в зависимости от вида и характера нативного белка и внешних факторов, воздействию которых подвергается белок. Увеличение количества продуктов химического распада часто наблюдается при хранении и использовании белкового препарата. Большинство белков склонны к дезамидированию, другие пути распада предполагают формирование высокомолекулярных продуктов, при котором две или более белковые молекулы ковалентно связаны друг с другом через переамидирование и/или дисульфидные взаимодействия, приводящие к образованию ковалентно связанных димерных, олигомерных и полимерных продуктов распада [8]. В качестве еще одного варианта химического распада можно упомянуть окисление (например, остатков метионина). Химическую стабильность белкового препарата и/или белка можно оценить, измеряя количество продуктов химического распада в различные временные точки после воздействия различных условий окружающей среды (образование продуктов распада часто может быть ускорено, например, путем повышения температуры). Количество каждого отдельного продукта распада часто определяют путем разделения продуктов распада в зависимости от размера молекул и/или заряда с использованием различных методик хроматографии (например, эксклюзионной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC) и/или обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC)). Так как высокомолекулярные белковые продукты потенциально иммуногенны и

биологически неактивны, то уровни высокомолекулярных белков должны быть низкими.

Физическая нестабильность белковой композиции (белкового препарата) и/или белка может быть вызвана агрегацией белковых молекул с образованием полимеров более высокого порядка или даже осадков. Физическая денатурация инсулина известна как фибрилляция. В фибриллярном состоянии вытянутые пептидные цепи располагаются параллельно или антипараллельно и связаны водородной связью друг с другом, образуя так называемую β -структуру или β -складчатые листы. Фибриллы обычно представляют собой состояние белка с самой низкой энергией, регенерация белка из этого состояния в нативное состояние правильно свернутого белка возможна только в сильнощелочной среде. Фибриллы инсулина имеют вид гелей или преципитатов. Факторами, которые способствуют повышению скорости образования фибрилл, являются воздействие термомеханического стресса и/или взаимодействие с границами раздела фаз и гидрофобными поверхностями. Считается, что образование фибрилл происходит за счет мономеризации инсулина. Мономерные аналоги инсулина, легко диссоциирующие от гексамерной единицы к мономерной форме, более склонны к образованию фибрилл по сравнению с человеческим инсулином.

Физическую стабильность можно оценить способами, хорошо известными в данной области, например, измерением мутности (оптической плотности). Мутность возникает в результате агрегации или осаждения белков или комплексов в композициях.

Физическую стабильность водных белковых препаратов также можно оценить с помощью спектроскопического агента или зонда конформационного состояния белка. Зонд предпочтительно представляет собой небольшую молекулу, которая преимущественно связывается с ненативными конформерами белка. Одним из примеров низкомолекулярного спектроскопического зонда белковой структуры является тиофлавин Т. Тиофлавин Т является флуоресцентным красителем, который широко используется для обнаружения амилоидных фибрилл. В присутствии фибрилл и, возможно, также других белковых конфигураций, тиофлавин Т порождает новый максимум возбуждения на примерно 445 нм и усиливает излучение на примерно 485 нм при связывании с фибриллярной формой белка. Несвязанный тиофлавин Т является по существу нефлуоресцентным при этих длинах волн.

«Стабильная композиция» представляет собой композицию, в которой степень агрегации белков и содержание примесей находится в пределах нормы и не превышает ее со временем.

Термин «водный препарат» относится к препарату, содержащему воду. Термины «водный раствор» и «водная суспензия» относятся соответственно к раствору или суспензии, содержащим воду. Водные суспензии могут содержать активные соединения в смеси с эксципиентами, подходящими для изготовления водных суспензий.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Приготовление композиций по изобретению, содержащих инсулин аспарт

В одном из вариантов фармацевтические композиции по настоящему изобретению получают в виде водных растворов. В таблице 1 приведен качественный и количественный состав некоторых приготовленных композиций. Композиции по изобретению включают в себя, но без ограничения, композиции 4–17, приведенные в таблице 1. Состав композиции 1 соответствует составу одного из ближайших аналогов по изобретению, составу ЛП «Фиасп®». В составе композиции 2 воспроизведен состав композиции 1 за исключением того, что в ней отсутствует L-аргинина гидрохлорид. Состав композиции 3 соответствует составу композиции 1, за исключением того, что в ней отсутствует никотинамид. В составе композиции 4 воспроизведен состав композиции 3, но с добавлением L-лизина гидрохлорида вместо L-аргинина гидрохлорида. В составе композиции 5 воспроизведен состав композиции 3 с добавлением комбинации L-лизина и L-аргинина.

Способ получения композиций включает:

- а) приготовление раствора инсулина аспарт путем его растворения в воде или буфере;
- б) приготовление раствора соли цинка путем ее растворения в воде или буфере;
- в) приготовление раствора консервантов (фенольных соединений) путем их растворения в воде или буфере;
- г) приготовление раствора изотонического агента путем его растворения в воде или буфере;
- д) приготовление раствора никотинамида и/или другого соединения никотиновой кислоты (при его наличии в композиции) путем растворения в воде или буфере;
- е) приготовление раствора лизина и/или аргинина путем растворения аминокислот и/или их солей в воде или буфере;
- ж) смешивание раствора а) и растворов б), в), г), д) при наличии, и е) в соответствии с составом композиций, приведенных в таблице 1;

з) доведение pH смеси ж) до значения 6,6–7,4 с последующей стерилизующей фильтрацией.

и) асептическое заполнение приготовленными композициями картриджей.

Композиции по изобретению могут быть получены любым другим способом.

Таблица 1. Качественный и количественный состав композиций по изобретению, содержащих инсулин аспарт

Номер композиции	Инсулин-аспарт, мМ (Ед./мл)	Фенольные консерванты, сумма, мМ	Глицерол (100%), % масс./об.	Трометамол, мМ	Динатрия фосфат дигидрат, мМ	Никотинамид, мМ	L-Лизин · HCl, мМ	L-аргинин · HCl, мМ	Zn, мМ	HCl, NaOH до pH 6,6 – 7,4 (целевое значение pH 7,0)
1	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	–	2,98	170	–	20	0,3	pH 7,1
2	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	–	2,98	170	–	–	0,3	pH 7,0
3	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	–	2,98	–	–	20	0,3	pH 7,0
4	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	–	2,98	–	20	–	0,3	pH 7,0
5	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	–	2,98	–	25	20	0,3	pH 7,0
6	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	–	2,98	170	20	–	0,3	pH 7,0
7	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	–	2,98	170	50	–	0,3	pH 7,0
8	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	–	2,98	170	75	–	0,3	pH 7,0
9	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	–	2,98	170	100	–	0,3	pH 7,0
10	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	–	2,98	170	25	20	0,3	pH 7,0
11	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	10	–	170	20	–	0,3	pH 7,0
12	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	10	–	170	50	–	0,3	pH 7,0

13	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	10	–	170	75	–	0,3	pH 7,0
14	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	10	–	170	25	16,5	0,3	pH 7,0
15	0,6 (100 Ед./мл)	32	0,33	10	–	170	50	50	0,3	pH 7,0
16	0,2 (33 Ед./мл)	32	0,33	10	–	60	25	–	0,1	pH 7,0
17	2,0 (333 Ед./мл)	32	0,33	10	–	200	100	0,025	0,9	pH 7,0

Пример 2. Анализ физической и химической стабильности композиций по изобретению, содержащих инсулин аспарт

Определение химической стабильности проводили для композиций 1–17, полученных по примеру 1, после термостатирования асептично заполненных ими картрижей при температуре 40° С в течение 1 и 2 недель.

Определение родственных инсулину аспарту примесей проводили методом ВЭЖХ с УФ-детектированием на колонке, заполненной октадецилсиликагелем, с размером частиц 5 мкм и размером пор 300 Å со скоростью потока подвижной фазы 1,0 мл/мин и при длине волны 214 нм.

Элюирование проводили в градиентном режиме подвижной фазой, состоящей из следующих компонентов:

подвижная фаза А (ПФ А): ацетонитрил : буферный раствор с pH 3,4 (1,4 % раствор (w/V) натрия сульфата безводного, 0,13 % раствор (V/V) ортофосфорной кислоты концентрированной, 2 М гидроксид натрия до pH 3,4 ± 0,05) 10:90 (V/V);

подвижная фаза Б (ПФ Б): ацетонитрил : вода 50:50 (V/V).

Количество примеси B28IsoAsp, дезамидированных (B3iso, A21Asp, B3Asp) и других родственных примесей определяли методом внутренней нормализации по площади абсорбции соответствующих пиков, измеренной в процентах от суммы площадей пиков, элюированных после никотинамида и консервантов.

Количество высокомолекулярного белка (ВМБ) определяли методом эксклюзионной жидкостной хроматографии на колонке, заполненной силикагелем гидрофильным для хроматографии с размером частиц 10 мкм и диаметром пор 125 Å. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил : уксусная кислота ледяная: 0,1 % раствор аргинина (20:15:65) (V/V/V). Элюирование проводили в изократическом режиме со скоростью потока 0,5 мл/мин при длине волны детектирования 276 нм.

Содержание ВМБ определяли методом внутренней нормализации по сумме площадей абсорбции всех пиков с временами удерживания меньшими, чем у пика мономера инсулина аспарт. Пики с временами удерживания больше, чем у пика мономера инсулина аспарт (никотинамид и консерванты), в расчете не учитывались.

Для оценки физической стабильности белковых композиций проводили анализ на склонность к образованию фибрилл с помощью Тиофлавина-Т (ThT). Выбранный метод описан в литературе, например, в патенте RU2533217. Склонность к образованию фибрилл определяли для композиций 1, 3 – 17, приведенных в примере 1, а также для готовой формы оригинального ЛП «Фиасп». В составе композиции 1 был воспроизведен состав ЛП «Фиасп». Анализ проводили сразу после приготовления композиций.

Приготовление растворов

Стоковый раствор тиофлавина

Берут точную навеску сухого реактива Тиофлавина Т, растворяют в метаноле до концентрации тиофлавина 1 мг/мл (что соответствует 3,14 мМ). Раствор тщательно перемешивают на вортексе, хранят защищая от света при температуре + 2 – 8 °С до 6 месяцев.

Рабочий раствор тиофлавина

Готовят рабочий раствор с концентрацией тиофлавина 200 мкМ в воде очищенной. Объем стокового раствора к воде очищенной рассчитывают в пропорции 1:14,7. Используют свежеприготовленным.

Аликвоты образцов по 100 мкл в трипликатах помещают в черный 96-луночный планшет, в качестве контрольной пробы используют воду очищенную. Во все лунки вносили по 10 мкл рабочего раствора тиофлавина. При заполнении планшета избегают крайних лунок (см. фиг.1). Планшет запечатывают прозрачной пленкой, помещают в планшетный мультимодульный ридер CLARIOstar (BMG, Германия). Детектируют флуоресцентный сигнал каждые 20 минут в течение 12 часов при длине волны 445/485 нм. Между считываниями планшет перемешивают при 700 об/мин. Перемешивание и детекцию проводят при температуре 37 °С.

По результатам измерений строят графики зависимости сигнала в относительных единицах флуоресценции от времени в часах для каждого образца. Для анализа используют 4-х параметрическую зависимость.

По графику определяют $T_{1/2max}$ – время, за которое агрегирует половина анализируемого образца. При получении графика в виде прямой на уровне нулевого

значения, образец признается не склонным к агрегации, в остальных случаях степень склонности к агрегации оценивается по T1/2max.

Наряду с T1/2max по кривой флуоресценции ThT визуально определяют время задержки как временную точку, в которой флуоресценция ThT отличается от фонового уровня.

В таблице 2 приведены результаты определения химической и физической стабильности композиций 1, 3–17, содержащих инсулин аспарт.

Таблица 2. Данные по физической и химической стабильности композиций 1, 3-17, содержащих инсулин аспарт, полученных по примеру 1.

Номер композиции	Физическая стабильность (в анализе с тиюфлавином Т)		Химическая стабильность, измеряемая как разница между содержанием примесей после инкубации и до инкубации в течение 1 (1w) и 2 недель (2w) при 40°C .							
	T1/2,ч	время задержки, ч и мин	B28IsoAsp		Сумма дезамидированных форм B3iso, A21Asp, B3Asp		Другие родственные примеси		ВМБ	
			1w	2w	1w	2w	1w	2w	1w	2w
0*	8,2	3ч 20 мин	1,0	2,3	1,1	1,7	1,7	2,6	0,2	0,4
1	8,3	3ч 40 мин	0,9	1,9	1,1	1,6	1,4	2,5	0,2	0,4
2	N/A**	N/A	1,5	2,7	1,4	1,9	3,8	6,0	1,4	2,5
3	8,4	3 ч 50 мин	0,8	1,5	0,8	1,3	1,2	2,0	0,1	0,3
4	8,4	3 ч 50 мин	0,6	1,3	0,7	0,9	1,0	1,6	0,1	0,3
5	8,5	4 ч 00 мин	0,5	1,0	0,4	0,7	0,9	1,3	0,1	0,3
6	8,6	3 ч 50 мин	0,8	1,2	0,6	0,9	0,9	1,6	0,2	0,4
7	8,6	3 ч 50 мин	0,6	1,0	0,4	0,7	0,6	1,2	0,1	0,3
8	8,5	4 ч 00 мин	0,5	0,8	0,4	0,5	0,4	1,0	0,1	0,2

9	8,7	4 ч 20 мин	0,3	0,6	0,3	0,4	0,3	0,9	0,1	0,2
10	8,7	4 ч 20 мин	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,7	0,1	0,1
11	8,6	3 ч 50 мин	0,6	1,0	0,5	0,6	0,8	1,3	0,2	0,4
12	8,6	3 ч 50 мин	0,5	0,9	0,3	0,5	0,5	1,1	0,1	0,3
13	9,0	4 ч 40 мин	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	0,9	0,1	0,2
14	9,0	4 ч 40 мин	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2	0,5	0,1	0,1
15	9,5	5 ч 00 мин	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,4	0,1	0,1
16	10	5 ч 40 мин	0,6	1,0	0,4	0,7	0,7	1,3	0,1	0,3
17	8,4	3ч 50 мин	0,6	1,0	0,4	0,7	0,6	1,2	0,1	0,3

* Оригинальный ЛП «Фиасп»; **N/A – «no analysis», не анализировали.

На основании изучения химической и физической стабильности композиций инсулина аспарта, приготовленных с использованием как фосфатного буфера, так и трис-буфера, неожиданно было обнаружено, что при добавлении лизина и/или его соли и/или комбинации лизина и/или его соли с аргинином и/или его солью количество примесей после 2 недель хранения при 40°C в композициях по изобретению существенно и достоверно меньше, чем в прототипе, при этом по сравнению с прототипом улучшается также и физическая стабильность.

Никотинамид, используемый в составе композиции без добавления аминокислот, (композиция 2), оказывает негативное влияние на химическую стабильность при хранении. Аргинин в составе композиции 1, воспроизводящей ЛП «ФИАСП», препятствует химической деградации, одной из причин которой является добавление никотинамида, что отражается в уменьшении содержания ВМБ, дезамидированных инсулинов после 2 недель хранения при 40°C в сравнении с содержанием примесей в композиции 2, не содержащей аргинин. При замене аргинина в композиции 1 эквимольным количеством лизина (композиция 6) содержание примесей достоверно уменьшается, повышение концентрации лизина до 100 мМ способствует еще большему снижению количества примесей. Концентрация лизина более 100 мМ

нежелательна в связи с ухудшением физической стабильности композиций. Наименьшее количество примесей отмечено при использовании комбинации лизина и аргинина (композиция 10).

Аналогичные результаты получены для композиций с использованием трис-буфера (композиции 11–17), при этом отмечена лучшая химическая стабильность композиций, приготовленных с использованием трис-буфера по сравнению с аналогичными композициями, приготовленными с использованием фосфатного буфера.

Для композиций, не содержащих никотинамид (композиции 3–5) также показано достоверное преимущество стабилизации лизином или комбинацией лизина с аргинином по сравнению со стабилизацией аргинином.

Пример 3. Приготовление композиций по изобретению, содержащих инсулин глулизин

В одном из вариантов фармацевтические композиции по настоящему изобретению получают в виде водных растворов. В таблице 3 приведен качественный и количественный состав некоторых приготовленных композиций. Композиции по изобретению включают в себя, но без ограничения, композиции 2–7, приведенные в таблице 3. Состав композиции 1 соответствует составу оригинального ЛП «Апидра®», раствор для подкожного введения, 100 Ед./мл. В составах композиций 2–7 воспроизведен состав оригинального ЛП с добавлением L-лизина гидрохлорида или комбинации L-лизина гидрохлорида и L-аргинина гидрохлорида.

Способ получения композиций включает:

- а) приготовление раствора инсулина глулизина путем его растворения в воде или буфере;
- б) приготовление раствора консерванта путем его растворения в воде или буфере;
- в) приготовление раствора изотонического агента путем его растворения в воде или буфере;
- г) приготовление раствора поверхностно-активного вещества путем его растворения в воде или буфере;
- д) приготовление раствора лизина и/или комбинации лизина с аргинином путем растворения аминокислот и/или их солей в воде или буфере;
- е) смешивание раствора а) и растворов б), в), г), д) в соответствии с составом композиций, приведенных в таблице 3;
- ж) доведение рН смеси е) до значения 7,3 с последующей стерилизующей фильтрацией.

з) асептическое заполнение приготовленными композициями картриджей.

Композиции по изобретению могут быть получены любым другим способом.

Таблица 3. Качественный и количественный состав композиций по изобретению, содержащих инсулин глулизин

Номер композиции	Инсулин-глулизин, мМ (Ед./мл)	м-крезол, мМ	Трометамол, мМ	Натрия хлорид	Полисорбат 20, % масс./об.	L-Лизин·HCl, мМ	L-аргинин·HCl, мМ	HCl, NaOH до pH 7,3
1	0,6 (100 Ед./мл)	29	49,5	85,6	0,001	–	–	pH 7,3
2	0,6 (100 Ед./мл)	29	49,5	85,6	0,001	20	–	pH 7,3
3	0,6 (100 Ед./мл)	29	49,5	85,6	0,001	–	20	pH 7,3
4	0,6 (100 Ед./мл)	29	49,5	85,6	0,001	25	10	pH 7,3
5	0,6 (100 Ед./мл)	29	49,5	85,6	0,001	25	20	pH 7,3
6	0,2 (33 Ед./мл)	29	49,5	85,6	0,001	10	–	pH 7,3
7	2,0 (333 Ед./мл)	29	49,5	85,6	0,001	100	–	pH 7,3

Пример 4. Анализ физической и химической стабильности композиций по изобретению, содержащих инсулин глулизин

Определение химической стабильности проводили для композиций 1–7, полученных по примеру 3, после термостатирования асептично заполненных ими картрижей при температуре 40° С в течение 1 и 2 недель.

Определение родственных инсулину глулизин примесей проводили методом ВЭЖХ с УФ-детектированием на колонке, заполненной октадецилсиликагелем, с размером частиц 5 мкм и размером пор 100 Å со скоростью потока подвижной фазы 1,0 мл/мин и при длине волны 214 нм.

Элюирование проводили в градиентном режиме подвижной фазой, состоящей из следующих компонентов:

подвижная фаза А (ПФ А): ацетонитрил : буферный раствор с рН 2,3 (0,1 М раствор сульфата натрия, ортофосфорная кислота q.s. до рН 2,3) 10:90 (V:V);

подвижная фаза В (ПФ В): ацетонитрил : буферный раствор с рН 2,3 (0,1 М раствор сульфата натрия, ортофосфорная кислота q.s. до рН 2,3) 50:50 (V:V).

Количество примеси А21-дезамидоинсулин глулизин и других родственных примесей определяли методом внутренней нормализации по площади абсорбции соответствующих пиков, измеренной в процентах от суммы площадей пиков, элюированных после метакрезола.

Количество ВМБ в композициях, содержащих инсулин глулизин определяли по методике, аналогичной определению ВМБ в композициях, содержащих инсулин аспарт (см. Пример 2). Содержание ВМБ определяли методом внутренней нормализации по сумме площадей абсорбции всех пиков с временами удерживания меньшими, чем у пика мономера инсулина глулизин. Пики с временами удерживания большими, чем у пика мономера инсулина глулизин (пик метакрезола) в расчете не учитывались.

Физическую стабильность композиций, содержащих инсулин глулизин, оценивали аналогично оценке физической стабильности композиций, содержащих инсулин аспарт (см. Пример 2).

В таблице 4 приведены результаты определения стабильности композиций, содержащих инсулин глулизин.

Таблица 4. Данные по химической стабильности композиций 1–7, содержащих инсулин глулизин, полученных по примеру 3.

Номер композиции	Химическая стабильность, измеряемая как разница между содержанием примесей после инкубации и до инкубации в течение 1 (1w) и 2 недель (2w) при 40°C .					
	А21-дезамидоинсулин глулизин		Другие родственные примеси		ВМБ	
	1w	2w	1w	2w	1w	2w
0*	1,0	1,5	1,3	1,4	0,2	0,4
1	1,1	1,3	1,2	1,5	0,2	0,4
2	0,8	1,0	0,7	1,0	0,1	0,3
3	0,9	1,2	1,1	1,3	0,2	0,4

4	0,6	0,7	0,4	0,7	0,1	0,3
5	0,5	0,6	0,4	0,6	0,1	0,2
6	0,9	1,1	0,8	1,1	0,1	0,3
7	0,6	0,8	0,5	0,8	0,1	0,3

* Оригинальный ЛП «Апидра®»

На основании изучения химической и физической стабильности композиций 1 – 7, содержащих инсулин глулизин, неожиданно было обнаружено, что при добавлении лизина и/или его соли и/или комбинации лизина и/или его соли с аргинином и/или его солью количество примесей после 2 недель хранения при 40°C в композициях по изобретению существенно и достоверно меньше, чем в прототипе, при этом по сравнению с прототипом улучшается также и физическая стабильность.

Повышение концентрации лизина до 100 мМ способствует снижению количества примесей. Концентрация лизина более 100 мМ нежелательна в связи с ухудшением физической стабильности композиций. Наименьшее количество примесей отмечено при использовании комбинации лизина и аргинина.

Пример 5. Приготовление композиций по изобретению, содержащих инсулин лизпро

В одном из вариантов фармацевтические композиции по настоящему изобретению получают в виде водных растворов. В таблице 5 приведен качественный и количественный состав некоторых приготовленных композиций. Композиции по изобретению включают в себя, но без ограничения, композиции 2–8, приведенные в таблице 5. Состав композиции 1 соответствует составу оригинального ЛП «Хумалог», раствор для внутривенного и подкожного введения, 100 Ед./мл. В составах композиций 2–7 воспроизведен состав оригинального ЛП с добавлением L-лизина гидрохлорида или комбинации L-лизина гидрохлорида и L-аргинина гидрохлорида.

Способ получения композиций включает:

- а) приготовление раствора инсулина путем его растворения в воде или буфере;
- б) приготовление раствора цинка путем растворения оксида цинка в растворе разбавленной соляной кислоты;
- в) приготовление раствора консерванта путем его растворения в воде или буфере;

- г) приготовление раствора изотонического агента путем его растворения в воде или буфере;
- д) приготовление раствора лизина и/или аргинина путем растворения аминокислот и/или их солей в воде или буфере;
- е) смешивание раствора а) и растворов б), в), г), д) в соответствии с составом композиций, приведенных в таблице 1;
- ж) доведение pH смеси е) до значения 7–8 с последующей стерилизующей фильтрацией.
- з) асептическое заполнение приготовленными композициями картриджей.

Композиции по изобретению могут быть получены любым другим способом.

Таблица 5. Качественный и количественный состав композиций по изобретению, содержащих инсулин лизпро

Номер композиции	Инсулин-лизпро, мМ (Ед./мл)	м-крезол, мМ	Zn ²⁺ , мМ (в форме оксида цинка)	Глицерин, % масс./об.	Натрия гидрофосфат, мМ	L-Лизин · HCl, мМ	L-аргинин · HCl, мМ	HCl, NaOH до pH 7–8
1	0,6 (100 Ед./мл)	29	0,3	1,6	7,0	–	–	pH 7
2	0,6 (100 Ед./мл)	29	0,3	1,6	7,0	20	–	pH 7
3	0,6 (100 Ед./мл)	29	0,3	1,6	7,0	–	20	pH 7
4	0,6 (100 Ед./мл)	29	0,3	1,6	7,0	25	10	pH 7
5	0,6 (100 Ед./мл)	29	0,3	1,6	7,0	25	20	pH 7
6	0,2 (33 Ед./мл)	29	0,3	1,6	7,0	10	–	pH 7
7	1,2 (200 Ед./мл)	29	0,3	1,6	7,0	75	–	pH 7
8	2,0 (333 Ед./мл)	29	0,3	1,6	7,0	100	–	pH 7

Пример 6. Анализ физической и химической стабильности композиций по изобретению, содержащих инсулин лизпро

Определение химической стабильности проводили для композиций 1–8 (композиции, содержащие инсулин лизпро), полученных по примеру 5, после термостатирования асептично заполненных ими картрижей при температуре 40° С в течение 1 и 2 недель.

Определение примеси A21-дезамидоинсулин лизпро и других родственных инсулину лизпро примесей проводили методом ВЭЖХ с УФ-детектированием на колонке, заполненной октадецилсиликагелем с размером частиц 3,5 мкм. В качестве элюента использовали подвижную фазу, состоящую из следующих компонентов:

подвижная фаза А (ПФ А): буферный раствор перхлората натрия pH 2,2;

подвижная фаза В (ПФ В): ацетонитрил для хроматографии.

Элюирование проводили в градиентном режиме со скоростью потока подвижной фазы 0,9 мл/мин и при длине волны детектирования 214 нм.

Количество примеси A21 дезамидоинсулин лизпро и других родственных примесей определяли методом внутренней нормализации по площади абсорбции соответствующих пиков, измеренной в процентах от суммы площадей пиков, элюированных после метакрезола.

Количество ВМБ в композициях, содержащих инсулин лизпро определяли по методике, аналогичной определению ВМБ в композициях, содержащих инсулин аспарт или инсулин глулизин (см. Пример 2). Содержание ВМБ определяли методом внутренней нормализации по сумме площадей абсорбции всех пиков с временами удерживания меньшими, чем у пика мономера инсулина лизпро. Пики с временами удерживания большими, чем у пика мономера инсулина лизпро (пик метакрезола) в расчете не учитывались.

Физическую стабильность композиций, содержащих инсулин лизпро оценивали аналогично оценке физической стабильности композиций, содержащих инсулин аспарт (см. Пример 2).

В таблице 6 приведены результаты определения химической и физической стабильности композиций, содержащих инсулин лизпро.

На основании изучения химической и физической стабильности композиций 1 – 8, содержащих инсулин лизпро, неожиданно было обнаружено, что при добавлении лизина и/или его соли и/или комбинации лизина и/или его соли с аргинином и/или его солью количество примесей после 2 недель хранения при 40° С в композициях по

изобретению было существенно и достоверно меньше, чем в прототипе, при этом по сравнению с прототипом улучшается также и физическая стабильность.

Повышение концентрации лизина до 100 мМ способствует снижению количества примесей. Концентрация лизина более 100 мМ нежелательна в связи с ухудшением физической стабильности композиций. Наименьшее количество примесей отмечено при использовании комбинации лизина и аргинина.

Таблица 6. Данные по физической и химической стабильности композиций 1 – 8, содержащих инсулин лизпро, полученных по примеру 5.

Номер композиции	Физическая стабильность (в анализе с тиюфлавином Т)		Химическая стабильность, измеряемая как разница между содержанием примесей после инкубации и до инкубации в течение 1 (1w) и 2 недель (2w) при 40°C .					
			A21-дезамидоинсулин лизпро		Другие родственные примеси		ВМБ	
	T1/2,ч	время задержки, ч и мин	1w	2w	1w	2w	1w	2w
0*	8,3	3ч 40 мин	1,5	2,3	1,3	2,0	0,2	0,4
1	8,4	3ч 50 мин	1,3	2,0	1,2	2,2	0,2	0,4
2	8,7	4 ч 20 мин	0,9	1,0	0,8	1,5	0,1	0,3
3	8,4	3ч 50 мин	1,3	1,9	1,0	1,9	0,2	0,4
4	8,8	4 ч 40 мин	0,7	0,8	0,7	1,0	0,1	0,3
5	8,8	4 ч 40 мин	0,4	0,6	0,5	0,9	0,1	0,2
6	9,0	4 ч 40 мин	1,0	1,1	1,0	1,7	0,2	0,3
7	8,7	4 ч 20 мин	0,8	0,9	0,6	1,3	0,1	0,3
8	8,7	4 ч 20 мин	0,7	0,8	0,5	1,1	0,1	0,1

* Оригинальный ЛП «Хумалог»

Список литературы:

1. Селиванова О. М., Гришин С. Ю., Глякина А. В. и др. Анализ аналогов инсулина и стратегия их дальнейшей разработки. *Успехи биологической химии*. 2018, 58: 313–346.
2. Brange J., Owens D. R., Kang S., Volund A. Monomeric Insulins and Their Experimental and Clinical Implications. *Diabetes Care*. 1990, 13(9), 923–954. doi:10.2337/diacare.13.9.923
3. Schlein M. Insulin Formulation Characterization – the Thioflavin T Assays. *AAPS Journal*. 2017, 19(2): 397 – 408.
4. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения «Фиасп». URL: <http://grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения 30.08.22).
5. Brange J. Stability of Insulin. Kluwer Academic Publisher. 1994, 18–23.
6. Paquot N., Scheen A. J. Faster aspart insulin (FIASP®). *Revue Medicale de Liege*. 2018; 73 (4): 211–215.
7. Muchmore D. B. Pump Users Clamor for Faster Insulin: Is Fast-Acting Insulin Aspart Ready for Them? *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2018; 12(1): 152–154. doi:10.1177/1932296817750166
8. Ahem T. J., Manning M. C. Stability of Protein Pharmaceuticals. Plenum Press. New York. 1992.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для снижения уровня глюкозы в крови у субъекта, содержащая быстродействующий инсулин и аминокислоту, которая представляет собой лизин или его соль, или комбинацию лизина или его соли с аргинином или его солью.
2. Композиция по п.1, в которой быстродействующий инсулин выбран из группы, включающей инсулин аспарт (B28Asp), инсулин лизпро (B28LysB29Pro), инсулин глулизин (3BLys29BGlu).
3. Композиция по п. 2, в которой быстродействующий инсулин представляет собой инсулин аспарт (B28Asp).
4. Композиция по п.1, в которой аминокислота представляет собой лизин или его соль.
5. Композиция по п. 1, в которой аминокислота представляет собой комбинацию лизина или его соли с аргинином или его солью.
6. Композиция по п. 3, в которой аминокислота представляет собой лизин или его соль.
7. Композиция по п.3, в которой аминокислота представляет собой комбинацию лизина с аргинином.
8. Композиция по п. 2, в которой быстродействующий инсулин представляет собой глулизин (3BLys29BGlu).
9. Композиция по п. 8, которая дополнительно содержит метионин.
10. Композиция по п. 1, в которой инсулин присутствует в количестве от примерно 0,2 мМ (33 Ед./мл) до примерно 2мМ (333 Ед./мл).
11. Композиция по п.1, в которой инсулин присутствует в количестве от примерно 0,3 мМ (50 Ед./мл) до примерно 1,2 мМ (200 Ед./мл).
12. Композиция по п.10 или п.11, отличающаяся тем, что инсулин представляет собой инсулин аспарт и композиция дополнительно содержит соединение никотиновой кислоты.
13. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что в качестве соединения никотиновой кислоты содержит никотинамид.
14. Композиция по п.13, содержащая от примерно 1 мМ и до примерно 200 мМ никотинамида.
15. Композиция по п. 10 или п.11, содержащая от примерно 1мМ до примерно 100 мМ лизина или его соли.

16. Композиция по п.10 или п.11, содержащая от примерно 1мМ до примерно 100 мМ комбинации лизина или его соли с аргинином или его солью.
17. Композиция по п.1, дополнительно содержащая ион металла, консервант(ы), изотонический агент(ы) и стабилизатор(ы), буфер(ы) и регуляторы кислотности.
18. Композиция по п.1 для применения в лечении или профилактике гипергликемии, сахарного диабета 2 типа, нарушения толерантности к глюкозе, сахарного диабета 1 типа.
19. Инъецируемый инсулиновый препарат для снижения уровня глюкозы в крови у субъекта, содержащий композицию по любому из пп. 1-17.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Blank	1	3	4	5	6	7	8	9		
C		Blank	1	3	4	5	6	7	8	9		
D		Blank	1	3	4	5	6	7	8	9		
E		Blank	10	11	12	13	14	15	16	17		
F		Blank	10	11	12	13	14	15	16	17		
G		Blank	10	11	12	13	14	15	16	17		
H												

Примечания:

Blank — вода очищенная

1 - 17 — номер композиции

Фиг.1. Пример заполнения планшета испытываемыми и контрольным образцами при определении склонности к образованию фибрилл.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2023/050272

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/08 (2006.01); A61K 38/28 (2006.01); A61K 47/18 (2017.01); A61P 3/10 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/08, 31/198, 38/00, 38/28, 47/18, 47/20, A61P 3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSearch, Espacenet, Patentscope, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2014/102623 A1 (WOCKHARDT LIMITED) 03.07.2014, points 1, 2, 4 of the claims, pages 1, 11-16	1-8, 15-19 9, 12-14
X	WO 2014/096985 A2 (WOCKHARDT LIMITED) 26.06.2014, the claims, pages 15-16, 23-24, examples 1, 4, 6	1-8, 10-11, 19
Y	US 2015/0119323 A1 (SANOFI) 30.04.2015, points 1, 2, 6-7, 15, 26 of the claims, paragraph [0061]	9
Y	US 2009/0304665 A1 (GREGORY I. FROST et al.) 10.12.2009, points 1, 19-20 of the claims, paragraphs [0018], [0105]	9
Y	EP 2612677 A1 (NOVO NORDISK A/S) 10.07.2013, the claims, paragraph [0016]	12-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 March 2024 (11.03.2024)

Date of mailing of the international search report

11 April 2024 (11.04.2024)

Name and mailing address of the ISA/
RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ		
A61K 9/08 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01) A61P 3/10 (2006.01)		
Согласно Международной патентной классификации МПК		
B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА		
Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)		
A61K 9/08, 31/198, 38/00, 38/28, 47/18, 47/20, A61P 3/10		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)		
PatSearch, Espacenet, Patentscope, PubMed		
C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	WO 2014/102623 A1 (WOCKHARDT LIMITED) 03.07.2014,	1-8, 15-19
Y	пункты 1, 2, 4 формулы, страницы 1, 11-16	9, 12-14
X	WO 2014/096985 A2 (WOCKHARDT LIMITED) 26.06.2014, формула,	1-8, 10-11, 19
	страницы 15-16, 23-24, примеры 1, 4, 6	
Y	US 2015/0119323 A1 (SANOFI) 30.04.2015, пункты 1, 2, 6-7, 15, 26 формулы,	9
	параграф [0061]	
Y	US 2009/0304665 A1 (GREGORY I. FROST et al.) 10.12.2009, пункты 1, 19-20	9
	формулы, параграфы [0018], [0105]	
Y	EP 2612677 A1 (NOVO NORDISK A/S) 10.07.2013, формула, параграф [0016]	12-14
☐ последующие документы указаны в продолжении графы C. ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении		
* “А” “D” “E” “L” “O” “P”	Особые категории ссылочных документов: документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным документ, цитируемый заявителем в международной заявке более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	“Т” “Х” “У” “&”
более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста документ, являющийся патентом-аналогом		
Дата действительного завершения международного поиска		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске
11 марта 2024 (11.03.2024)		11 апреля 2024 (11.04.2024)
Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация тел. +7(499)240-60-15, факс +7(495)531-63-18		Уполномоченное лицо: Орлова Т. Телефон № 8(495)531-64-81