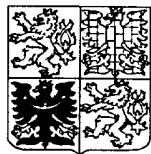


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

286 066

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1995 - 1541**

(22) Přihlášeno: **14.06.1995**

(30) Právo přednosti:
16.06.1994 US 1994/260647

(40) Zveřejněno: **14.02.1996**
(Věstník č. 2/1996)

(47) Uděleno: **08.11.1999**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ⁷:
C 07 K 14/62
A 61 K 38/28

(73) Majitel patentu:

ELI LILLY AND COMPANY,
Indianapolis, IN, US;

(72) Původce vynálezu:

Baker Jeffrey Clayton, Indianapolis, IN, US;
Carter Nancy Delores, Indianapolis, IN, US;
Frank Bruce Hill, Indianapolis, IN, US;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
120 00;

(54) Název vynálezu:

Způsob přípravy krystalického
LysB28ProB29-lidského inzulínu

(57) Anotace:

Způsob přípravy krystalického Lys^{B28}Pro^{B29}-lidského inzulínu
pro ošetřování diabetes, který se provádí krystalizací při pH 5,5 až
6,5 v přítomnosti solí zinku.

CZ 286066 B6

Způsob přípravy krystalického Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulinu

Oblast techniky

5

Vynález se týká monomerního analogu lidského inzulinu. Především se vynález týká způsobu přípravy krystalického analogu inzulinu. Způsob je užitečný pro čištění a výrobu Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulinu. Lys^{B28}Pro^{B29}–lidský inzulin je užitečný pro ošetřování diabetes.

10

Dosavadní stav techniky

Od zavedení inzulinu v roce 1920 se dosahuje stálých velkých pokroků ve zlepšení ošetřování diabetes mellitus. Hlavního pokroku se dosáhlo v čistotě a v dostupnosti inzulinu. Byly rovněž vyvinuty různé farmaceutické prostředky s různou časovou aktivací. Nehledě na toto zlepšení, terapie subkutánního vstřikování je stále neuspokojivá pro jedince potřebujícího regulaci a normalizaci glycemické kontroly. U jedinců dochází opakovaně k hyperglycemii nebo k hypoglycemii a k dlouhodobým komplikacím včetně retinopathy, neuropathy, nefropathy, mikroangiopathy a makroangiopathy.

20

Aby se předešlo extrémním glycemickým hladinám, diabetici často praktikují terapii opakovaného vstřikování, přičemž se inzulin podává při každém jídle. Nejrychleji působící, obchodně dostupný inzulin vykazuje vrchol příliš pozdě po vstříknutí a trvá příliš dlouho, než se dosáhne optimálního seřízení hladin glukózy. Nejnověji se věnuje velké úsilí vývoji inzulinových prostředků a inzulinových analogových prostředků, které by měly jinou kinetiku procesu subkutánní absorpce.

25

Jelikož všechny obchodní farmaceutické prostředky inzulinu obsahují inzulin ve spontánně asociovaném stavu a převážně v zinkové hexamerní formě, je domněnka, že stupněm limitujícím rychlost absorpce inzulinu z místa subkutánního vstřiku do krevního oběhu je disociace spontánně agregovaného inzulinového hexameru. K urychlení procesu absorpce se vyvinuly monomerní inzulinové analogy. Tyto monomerní inzulinové analogy vykazují srovnatelně rychlejší nastartování aktivity než inzulin za současného zachování biologické účinnosti nativního lidského inzulinu. Vykazují rychlejší absorpci na místě vstřiku a píkové působení inzulinu těsně s poobědovou glukózou jakožto odezvou na jídlo.

35

Vynález se týká nového způsobu přípravy krystalů takového monomerního analogu Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulinu (Lys^{B28}Pro^{B29}–hI). Lys^{B28}Pro^{B29}–hI je popsán v evropské zveřejněné přihlášce vynálezu číslo 383472. Není však popsán provozně schůdný proces přípravy Lys^{B28}Pro^{B29}–hI.

40

Krystalizace inzulinu je v oboru dobře známa. Počáteční objevy spadají do roku 1926, kdy Abel krystaloval inzulin v isoelektrické oblasti z roztoku pufrovaného brucinem, pyridinem a octanem amonným (Abel J. J., Proc. Nat'l Acad. Sci. U. S. 12, str. 132, 1926). Peterson a kol. popisují v americkém patentovém spise číslo 2 920 104 inzulinové krystaly, způsob jejich přípravy a farmaceutické prostředky, které je obsahují. V současné době sestává průmyslový proces krystalizace inzulinu z nastavení zásaditosti inzulinového roztoku, obsahujícího 0,25N kyselinu octovou, přibližně 2 g/l inzulinu a 2 % (procenta jsou vždy míněna hmotnostně, pokud není uvedeno jinak) zinečnaté soli na hodnotu pH 5,9 až 6,0 zásadou, s výhodou hydroxidem amonným (Jens Brange, Galenics of Insulin, Springer-Verlag, 1987). Především jestliže se Lys^{B28}–Pro^{B29}–hI podrobuje podmínkám, které umožňují vytvářet jakékoliv zinečnaté krystaly, nedojde k takové krystalizaci.

50

Vynález se týká způsobu krystalizace $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ jedinečného pro molekulu, to znamená podmínek, za kterých nekrytaluje lidský inzulin.

5 Podstata vynálezu

Způsob přípravy krystalického $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ -lidského inzulinu spočívá podle vynálezu v tom, že se krystaluje $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ -lidského inzulin z roztoku obsahujícího $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ -lidský inzulin, zinečnatou sůl, alespoň 0,3N organickou kyselinu ze souboru zahrnujícího kyselinu octovou, citrónovou a glycin a fenolickou sloučeninu volenou ze souboru zahrnujícího fenol, resorcinol, m-kresol, methyl-p-hydroxybenzoát a jejich směsi při hodnotě pH 5,5 až 6,5.

Způsobem podle vynálezu se produkují vysoce kvalitní zinečnaté krystaly ve vysokém výtěžku v provozním měřítku. Krystaly vytvářejí stálou pevnou formu molekuly. Krystalická pevná hmota je obzvláště výhodná, jelikož se snadněji charakterizuje, čistí a je farmaceuticky elegantnější než pevné látky, které jsou amorfni. Proto je způsob vhodný pro průmyslové využití.

Jak shora uvedeno, týká se vynález způsobu přípravy krystalického $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ -lidského inzulinu. Výraz „ $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ -lidský inzulin“ nebo „ $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ “ se zde vždy míní rychle působící analog inzulinu, který je méně náchylný k dimerizaci nebo ke spontánní asociaci. $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ je lidský inzulin, jehož prolin je v poloze B28 řetězce B je substituován lysinem a lysin je v poloze B29 řetězce B substituován prolinem, jak je popsáno v evropské zveřejněné přihlášce vynálezu číslo 383472.

Všechny zkratky, používané pro aminokyseliny, jsou v souladu s 37 C, F, R, § 1.822(b) (2) úřadu United States Patent & Trademark Office.

Výrazem „fenolická sloučenina“ nebo „fenolický derivát“ se zde vždy míní fenol, resorcinol, n-kresol nebo methyl-p-hydroxy-benzoát nebo jejich směsi.

Výrazem „krystalizace“ se zde vždy míní vytváření krystalů $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ -lidského inzulinu.

Výraz „fyziologicky vhodná zásada“ je pracovníkům v oboru znám. Jakožto fyziologicky vhodné zásady se příkladně uvádějí hydroxid sodný, hydroxid draselný a hydroxid amonný. Výhodný je hydroxid amonný.

Zinkem se vždy míní zinečnatá sůl, přičemž se procenta míní hmotnostně a vztahují se na obsažený zinek. Vytváření inzulinových krystalů bylo široce studováno. Lidský inzulin se provozně krystaluje v přítomnosti 0,25N kyseliny octové, 1,6 až 2,1 g/l inzulinu a 2 % zinečnaté soli při hodnotě pH 5,95 až 6,05. Krystalizace postupuje přecházením krystalizační směsi z kyselé oblasti za přidání zásady, zpravidla hydroxidu sodného. Je nejvíce překvapivé, že rozpustný $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ nekrytaluje za známých podmínek přípravy inzulinových krystalů. O $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ se uvádí, že vykazuje minimální spontánní asociaci a agregaci. Poznatek, že $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ neagreguje zaznamenali jako první Brems a kol., Protein Engineering, 5:6, str 527 až 533 (1992). Minimální spontánní asociace a agregace, pro kterou je analog monomerní, způsobuje pravděpodobně, že $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ nekrytaluje za podmínek, vyvinutých pro inzulin.

Vynález popisuje podmínky, za kterých $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ krystaluje v přítomnosti zinku a fenolické sloučeniny za vytvoření stálé, krystalické pevné látky. Výhodné fenolické sloučeniny jsou voleny ze souboru zahrnujícího fenol, resorcinol a jejich směsi. Jak přítomnost zinku, tak fenolické sloučeniny mají pro krystalizaci rozhodující význam.

Roztok $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ se připravuje rozpouštěním inzulinového analogu ve vodném ředidle. Koncentrace $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ je přibližně 1,8 g/l až 2,5 g/l. Rozpuštění se může napomáhat tak, jak je běžné pro rozpouštění kyselin, to znamená snižováním hodnoty pH na přibližně 3,0 až 3,5 přidáváním fyziologicky vhodné kyseliny, s výhodou kyseliny chlorovodíkové. Jakožto další

5 fyziologicky vhodné kyseliny se uvádějí kyselina octová, citrónová a fosforečná.

Koncentrace organické kyseliny, volené ze souboru zahrnujícího kyselinu octovou, citrónovou a glycin, je alespoň 0,3 N; pod 0,3 N se vytváří ve velké míře amorfní produkt. S výhodou se $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ rozpouští v přibližně 0,8 až 1,2 N kyseliny octové; nejvýhodněji se používá 1N

10 kyseliny octové.

Množství přidávaného zinku je takové, aby konečná koncentrace byla přibližně 40 mg až přibližně 400 mg na gram analogu. Zinek se s výhodou přidává ve formě soli. Jakožto

15 reprezentativní příklad zinečnatých solí se uvádějí octan, bromid, chlorid, fluorid, jodid a síran zinečnatý. Pracovníkům v oboru je jasné, že existují další četné soli, kterých se rovněž může použít při způsobu podle vynálezu. S výhodou se používá octanu a chloridu zinečnatého, jelikož tyto soli nezavádějí další chemické ionty do průmyslově vhodného procesu. Optimální koncentrace zinku při krystalizaci je přibližně 100 až přibližně 300 mg na 1 g $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$.

20 Podmínky krystalizace jsou citlivé na fenolickou sloučeninu, zásadu a koncentraci zinku; to znamená, že pracovník v oboru musí nastavit shora uvedené parametry k dosažení dobře definovaných krystalů. Optimální podmínky pro systém fenolická sloučenina-zásada se mění v uvedených mezích. S výhodou je fenolickou sloučeninou fenol v koncentraci přibližně 0,15 až přibližně 0,25 % (objem/objem, konečná koncentrace). Nejvýhodněji se pracuje s koncentrací

25 fenolické sloučeniny 0,2 %

Způsob, podle kterého se $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ rozpouští v roztoku nebo podle kterého se fenolická sloučenina, zinek a $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ přidávají do roztoku nemají při způsobu podle vynálezu rozhodující význam. Je však rozhodující, aby fenolická sloučenina interagovala s $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ pod isoelektrickým bodem $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$. V souhlase s tím se krystalizace má začínat

30 přidáním buď zinku, nebo nastavením bazicity roztoku z kyselé oblasti na přibližnou hodnotu pH 5,5 až 6,5 přidáním fyziologicky vhodné zásady. Jakožto fyziologicky vhodné zásady se uvádějí hydroxid sodný, draselný a amonný. Výhodnou zásadou je hydroxid amonný.

35 Krystalizace se má provádět nastavením zásaditosti roztoku obsahujícího $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-lidský}$ inzulin, zinek, alespoň 0,3 N organickou kyselinu, volenou ze souboru zahrnujícího kyselinu octovou, citrónovou a glycin a fenolickou sloučeninu, na hodnotu pH přibližně 5,5 až přibližně 6,5 za použití fyziologicky vhodné zásady. S výhodou se hodnota pH nastavuje na přibližně 5,9 až přibližně 6,2. Krystaly se vytvářejí po nastavení hodnoty pH.

40

S výhodou se $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ rozpouští v přibližně 1N kyselině octové (pokud je potřeba podpořit rozpouštění, hodnota pH se má nastavit na 3,0 až 3,5). Do roztoku se přidá fenolická sloučenina a v roztoku se nechá nastavit rovnováha. Hodnota pH roztoku se upraví na přibližně 5,5 až přibližně 6,5 fyziologicky vhodnou zásadou. S výhodou se jakožto zásady používá

45 hydroxidu amonného, přičemž se hodnota pH nastavuje na 5,9 až 6,2. Krystalizace se iniciuje přidáním zinku.

At' se již krystalizace provádí jakkoliv vytvářejí se krystaly za míchání nebo bez míchání a mohou se oddělit a promýt. S výhodou se krystalizace provádí za míchání. $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ se

50 může nechat popřípadě vykristalovat k napomáhání filtraci. Krystaly se mohou oddělit a vysušit o sobě známými způsoby. Pokud se krystaly shromáždí odfiltrováním, může se přidávat přídavný zinek do filtrátu nebo do matečného louhu k získání dalšího $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$. Krystaly, připravené způsobem podle vynálezu, mají vysokou kvalitu a v provozním měřítku se získají ve

vysokém výtěžku. Krystaly představují stabilní pevnou formu drogové substance, vhodnou pro konečné operace. Krystalizací se nemění čistota nebo agregační kinetika materiálu.

5 Krystalizační teplota nemá rozhodující význam. Vhodnou je teplota přibližně 4 až přibližně 26 °C. S výhodou se provádí krystalizace při teplotě přibližně 22 až 24 °C.

10 Lys^{B28}Pro^{B29}-hI se může připravovat jakýmkoliv způsobem peptidové syntézy včetně klasických (roztokových) způsobů, způsobů v pevné fázi, polosyntetických způsobů, a nejnovějších rekombinantních DNA způsobů. Způsob přípravy Lys^{B28}Pro^{B29}-lidského inzulinu popisuje například Chance a kol. v evropské zveřejněné přihlášce vynálezu číslo 383472.

Následující příklady pouze dále objasnění způsob přípravy inzulinových analogů a není záměrem, aby vynález jakkoliv omezovaly.

15

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

20

Zředí se 846,5 g Lys^{B28}Pro^{B29}-hI ve 116 litrech kyseliny octové jakožto pufru na absorbanci při 276 nm 2,25 čištěnou vodou (260,6 l) a ledovou kyselinou octovou (19,44 l) v nádobě z nerezavějící oceli na konečnou koncentraci 1N kyseliny octové. Přidá se ztekucená sloučenina fenolu do roztoku v množství 2 ml/l (celkový objem 792 ml) a zjistí se hodnota pH roztoku pod 25 3. Hodnota pH roztoku se nastaví na 6,01 přidáním 24 litrů hydroxidu amonného a roztok se zahřeje na teplotu 22 °C. Po zahřátí se přidá 5,35 litrů vodného roztoku chloridu zinečnatého (2 %, hmotnost/objem). Znova se kontroluje hodnota pH, přičemž se zjistí, že je v žádoucím oboru (5,9 až 6,1) a roztok se míchá po dobu 12 hodin. Roztok se rychle ochladí na teplotu 8 °C, míchání se zastaví, krystaly se nechají usadit v průběhu 18 hodin při teplotě 2 až 8 °C. Po usazení krystalů se 370 l supernatantu dekantuje a zbylý supernatant a krystaly se převedou do menší nádoby pro další usazení za použití části dekantovaného supernatantu k vypláchnutí původní nádoby. Po 14 hodinách usazování se dekantuje 6 l supernatantu za získání přibližně 9 l vrstvy mokrých krystalů a supernatantu.

35 Krystaly jsou suspendované v tomto objemu a odstředí se v šesti odstředivkách o objemu jednoho litru za počtu otáček 4000/min (přibližně 4000 x g) v odstředivce DPR6000 po dobu 45 minut. Aby se veškerá suspenze krystalů zpracovala v 6 odstředivkách, je zapotřebí dvojího plnění. Kapalina se dekantuje. Krystaly (přibližně 250 ml na nádobu) se suspendují v 500 ml čištěné vody na odstředivku a opět se odstředí za počtu otáček 4000/min po dobu 45 minut. Krystaly se resuspendují v odstředivkách použitím přibližně 500 ml chlazeného (na teplotu 2 až 40 8 °C) alkoholu SD No. 3A Absolute na odstředivku a opět se odstředí za počtu otáček 4000/min po dobu 15 minut. Alkoholový koncentrát se dekantuje a alkoholové promytí se provádí ještě dvakrát. Alkoholom promyté krystaly (1,9 kg mokré hmotnosti) se suší ve vakuu.

45

Příklad 2

50 Připraví se roztok Lys^{B28}Pro^{B29}-hI o koncentraci přibližně 2 g/l na konečnou koncentraci 1M kyseliny octové (podle absorbance při 280 nm). Do roztoku se přidá ztekucená fenolová sloučenina (3,3 ml/l roztoku) s nastavením hodnoty pH 5,9 až 6,2 použitím koncentrovaného roztoku hydroxidu amonného a do roztoku se přidá chlorid zinečnatý ve formě 2 % (hmotnost/objem) nebo 20 % (hmotnost/objem) roztoku do konečné koncentrace 40 až 160 mg chloridu zinečnatého na gram Lys^{B28}Pro^{B29}-hI. Vzniklé krystaly se nechají usadit a matečný louh se odstraní dekantací s následným odstředěním. Krystaly se promyjí suspendováním ve vodě

a odstředěním a nakonec absolutním ethanolem před vysušením ve vakuu. Druhý výtěžek krystalů se může získat přidáním chloridu zinečnatého do matečného louhu v množství 160 mg/g Lys^{B28}Pro^{B29}-hI.

5

Příklad 3

Připraví se roztok Lys^{B28}Pro^{B29}-lidského inzulinu (222 mg) ve 100 ml vody Milli-Q. Podle stanovení chromatografií HPLC obsahuje roztok 2,0 mg Lys^{B28}Pro^{B29}-hI na 1 ml roztoku. Roztok se vyčechá nastavením hodnoty pH na přibližně 3,0 10% kyselinou chlorovodíkovou. Odeberou se čtyři 5 ml podíly a hodnota pH se v 1N kyselině octové přidáním ledové kyseliny octové upraví na hodnotu nižší než 3,5. Do každého vzorku se přidá 10 µl ztekucené fenolové sloučeniny a pak 6 µl roztoku chloridu zinečnatého ve vodě (20 % hmotnost/objem). Hodnota pH se upraví na 6,0 přidáním buď koncentrovaného hydroxidu amonného, nebo roztoku hydroxidu sodného (10%, hmotnost/objem) nebo hydroxidu draselného (10%, hmotnost/objem). Roztoky se míchají po dobu přibližně 15 minut a pak se nechají stát v zakrytém stavu při teplotě místnosti. Přibližně po dvou hodinách se vytvoří dobře definované rhombohedrální krystaly ve všech třech roztocích, přičemž se krystaly vytvářejí mnohem rychleji v roztocích s upravenou hodnotou pH hydroxidem draselným.

20

Příklad 4

Rozpustí se přibližně 42 mg Lys^{B28}Pro^{B29}-hI ve 20 ml vody Milli-Q, obsahující 1,2 ml ledové kyseliny octové. Přidá se 44 ml ztekucené sloučeniny fenolu do prvního vzorku a 34 ml ztekucené sloučeniny fenolu do druhého vzorku, v obou případech se hodnota pH nastavuje na 6,0 přidáním koncentrovaného roztoku hydroxidu amonného, načež se přidá 45 ml vodného roztoku chloridu zinečnatého (20% hmotnost/objem). Roztok se míchá po dobu přibližně 5 minut a nechá se pak stát zakrytý při teplotě místnosti. Po přibližně 24 hodinách se vytvoří dobře definované rhombohedrální krystaly.

30

Příklad 5

Připraví se roztok Lys^{B28}Pro^{B29}-lidského inzulinu (222 mg) ve 100 ml vody Milli-Q. Podle stanovení chromatografií HPLC obsahuje roztok 2,0 mg Lys^{B28}Pro^{B29}-hI na 1 ml roztoku. Roztok se vyčechá nastavením hodnoty pH na přibližně 3,0 10% kyselinou chlorovodíkovou. Odeberou se čtyři 5 ml podíly a hodnota pH se v 1N kyselině octové přidáním ledové kyseliny octové upraví na hodnotu nižší než 3,5. Do jednotlivých vzorků se přidá buď m-kresol (12 µl), nebo fenol (10 µl), nebo resorcinol (2,1 µl roztoku ve vodě obsahujícího 100 mg/ml) nebo methylparabenu (1,6 ml roztoku ve vodě obsahujícího 10 mg/ml), čímž se získají roztoky pro krystalizaci obsahující podobně molární poměry peptidu k fenolické sloučenině. Do každého vzorku se přidá 6 ml roztoku chloridu zinečnatého ve vodě (20% hmotnost/objem). Hodnota pH se upraví na 6,0 přidáním koncentrovaného hydroxidu amonného. Roztoky se míchají po dobu přibližně 15 minut a pak se nechají stát v zakrytém stavu při teplotě místnosti. Přibližně po dvou hodinách se vytvoří dobře definované rhombohedrální krystaly v roztoku obsahujícím fenol. Roztoky, obsahující methylparaben, vytvářejí něco hůře definovaných planárních krystalů. Roztoky, obsahující m-kresol a resorcinol nevytvářejí krystaly za uvedených podmínek.

45

Postupuje se podobným způsobem použije se však desetiny množství resorcinolu a hodnota pH se upravuje roztokem hydroxidu sodného (10% hmotnost/objem), přičemž se získají dobře definované rhombohedrální krystaly. Tento příklad dokládá, že rutinní optimalizací podmínek se s fenolickými sloučeninami mohou vytvářet dobře definované krystaly.

Příklad 6

Připraví se roztok Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulinu (222 mg) ve 100 ml vody Milli–Q. Podle stanovení chromatografií HPLC obsahuje roztok 2,0 mg Lys^{B28}Pro^{B29}–hI na 1 ml roztoku. Roztok se vyčerpá nastavením hodnoty pH na přibližně 3,0 10% kyselinou chlorovodíkovou. Odeberou se čtyři 5 ml podíly a hodnota pH se v 0,25 N kyselině octové přidáním ledové kyseliny octové upraví na hodnotu nižší než 3,5. Do vzorku se přidá 20 µl vodného roztoku chloridu zinečnatého (2% hmotnost/objem). Hodnota pH se nastaví na 6,0 přidáním koncentrovaného roztoku hydroxidu amonného. Roztok se míchá po dobu přibližně 15 minut a nechá se stát v zakrytém stavu při teplotě místnosti. Po přibližně 24 hodinách se nepozorují žádné krystaly v roztoku nýbrž amorfni sraženina, která se usazuje na dnu nádoby.

Pro kontrolu se jiný 5 ml podíl odtáhne a zpracuje se způsobem podle příkladu 1 za použití hydroxidu amonného. Vytvoří se dobře definované rhombohedrální krystaly Lys^{B28}Pro^{B29}–hI. Jestliže se zpracovává za podmínek podle příkladu 1 za použití hydroxidu amonného lidský inzulin (2,3 mg/ml v 1N kyselině octové), nevytvoří se v průběhu sedmi dnů žádné krystaly.

Tato zkouška dokládá, že podmínky rutinně používané pro krystalizaci biosyntetického lidského inzulinu jsou nevhodné pro krystalizaci Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulinu a podobně krystalizační podmínky pro krystalizaci Lys^{B28}Pro^{B29}–hI nevedou k produkci krystalů lidského inzulinu.

Příklad 7

Obdobným způsobem jako podle příkladu 1 se provádí krystalizace za náhrady 1N kyseliny octové 1N kyselinou citrónovou. Krystalizací se získají dobře definované krystaly Lys^{B28}Pro^{B29}–hI.

Průmyslová využitelnost

Způsob přípravy krystalického inzulinového analogu užitečný pro čištění a výrobu Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulinu pro ošetřování diabetes.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy krystalického Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulinu, **vyznačující se tím**, že se krystaluje Lys^{B28}Pro^{B29}–lidský inzulin z roztoku obsahujícího Lys^{B28}Pro^{B29}–lidský inzulin, zinečnatou sůl, alespoň 0,3N organickou kyselinu ze souboru zahrnujícího kyselinu octovou, citronovou a glycin fenolickou sloučeninu volenou ze souboru zahrnujícího fenol, resorcinol, m–kresol, methyl–p–hydroxybenzoát a jejich směsi při hodnotě pH 5,5 až 6,5.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že koncentrace Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulinu v roztoku je 1,8 až 2,5 g/l, fenolickou sloučeninou je fenol a koncentrace zinečnaté soli je 40 až 400 mg/g Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulinu.

3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že koncentrace fenolické sloučeniny je objemově 0,15 až 0,25 %, vztaženo na konečný objem.

4. Způsob podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se krystalizace provádí při hodnotě pH 5,9 až 6,2.

5

5. Způsob přípravy krystalického Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulínu podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že

10 a) se vnáší fenol v objemovém množství 0,15 až 0,25 %, vztaženo na konečný objem, do roztoku Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulínu obsahujícího 1,8 až 2,5 g/l v 1N kyselině octové,

b) hodnota pH se nastaví na 5,9 až 6,2 hydroxidem amonným a

15 c) přidává se roztok soli zinku do konečné koncentrace 40 až 400 mg zinečnaté soli na 1 g Lys^{B28}Pro^{B29}–lidského inzulínu.

20

Konec dokumentu
