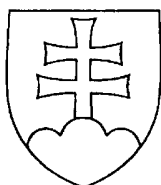


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **21. 5. 2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/292 423**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **21. 5. 2001**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **8. 6. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **6/2004**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US02/16464**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/094200**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1553-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

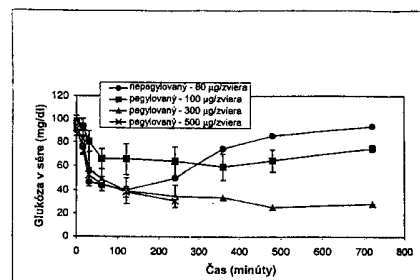
(51) Int. Cl.7 :

A61K 9/24,
A61K 38/28,
A61K 38/16

- (71) Prihlasovateľ: **NEKTAR THERAPEUTICS, San Carlos, CA, US;**
NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION, Huntsville, AL, US;
- (72) Pôvodca: **Patton John S., Portola Valley, CA, US;**
Kuo Mei-Chang, Palo Alto, CA, US;
Harris J. Milton, Huntsville, AL, US;
Leach Chester, El Granada, CA, US;
Perkins Kimberly, Belmont, CA, US;
Bueche Blaine, Castro Valley, CA, US;
- (74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Prípravok inzulínu na pľúčne podávanie**

(57) Anotácia:
Prípravok inzulínu na pľúčne podávanie obsahuje konjugát inzulínu kovalentne naviazaný na jeden alebo viaceré molekuly umelo pripraveného hydrofilného polyméru. Prípravky majú farmakokinetické a/alebo farmakodynamické vlastnosti signifikantne lepšie, ako sú vlastnosti natívneho inzulínu.



Prípravok inzulínu na pľúcne podávanie

Oblasť techniky

Vynález sa týka biologicky aktívnych, hydrofilných, polymérom modifikovaných derivátov inzulínu na podávanie do pľúc inhaláciou. Poskytujú sa aj spôsoby prípravy a podávania týchto derivátov.

Doterajší stav techniky

Inzulín je polypeptidový hormón, ktorý produkujú pankreatické β -bunky normálnych (nediabetických) osôb. Ľudský inzulín je polypeptidový hormón obsahujúci 51 aminokyselín, ktorý má molekulovú hmotnosť približne 5800 daltonov. Molekula inzulínu je zložená z dvoch peptidových reťazcov (reťazec A a B), ktorá obsahuje jednu disulfidovú väzbu v rámci podjednotky a dve disulfidové väzby medzi podjednotkami. Reťazec A je zložený z 21 aminokyselín a reťazec B je zložený z 30 aminokyselín. Oba reťazce inzulínu vytvárajú vysoko organizovanú štruktúru s niekoľkými α -helikálnymi regiónmi v reťazci A aj v reťazci B. Je zaujímavé, že izolované reťazce inzulínu sú neaktívne. Inzulín môže v roztoku existovať vo forme monoméru, diméru alebo hexaméru. Inzulín vo vysoko koncentrovaných prípravkoch používaných na subkutánne liečenie je hexamérny, avšak po rozpustení v telesných tekutinách sa stane monomérom. Inzulín je potrebný na regulovanie metabolizmu sacharidov znižovaním hladín glukózy v krvi; systémová nedostatočnosť inzulínu spôsobuje diabetes. Prežitie diabetických pacientov závisí od častého a dlhodobého podávania inzulínu, aby sa v krvi udržala prijateľná hladina glukózy.

Súčasná prípravky inzulínu sa vyznačujú nedostatkami, ktoré v liečení cukrovky môžu viesť k vážnym medicínskym komplikáciám. Napríklad štandardný zinkový inzulínový prípravok, ktorý diabetici najčastejšie používajú, je vo forme suspenzie mikrokryštálov inaktívneho hexamérneho inzulínu. Rozpustenie mikrokryštálov a disociácia hexaméru do aktívnej monoméromernej formy môže viesť k oneskorenej a individuálne variabilnej absorpcii inzulínu do krvného obehu (F. Liu

a spol., *Bioconjugate Chem.*, 8, 664-672 (1997); T. Uchio a spol., *Adv. Drug Del. Rev.*, 35, 289-306 (1999); K. Hinds a spol., *Bioconjugate Chem.*, 11, 195-201 (2000)). Nedostatkom inzulínových prípravkov je aj fyzikálna nestabilita v dôsledku tendencie inzulínu vytvárať fibrily a nerozpustné precipitáty. Precipitácia je zvlášť problematická u prípravkov, ktoré sa používajú v inzulínových pumpách. Taktiež formulovaný inzulín ľahko chemicky degraduje, napríklad neenzymatickou deamidáciou a vytváraním transformačných produktov s vysokou molekulovou hmotnosťou, ako sú napríklad kovalentné inzulínové diméry (J. Brange a spol., *Pharm. Res.*, 9, 715-726 (1992); J. Brange a spol., *Pharm. Res.*, 9, 727-734 (1992)). Existuje veľa dôkazov, že incidencia imunologických reakcií na inzulín môže byť výsledkom týchto kovalentných agregátov inzulínu (D. C. Robbins a spol., *Diabetes*, 36, 838-842 (1987)). Okrem toho aj vysoko vyčistený ľudský inzulín je mierne imunogénny (Kim, *tamtiež*).

Okrem vyššie uvedených problémov s nestabilitou prípravku sú z hľadiska podávania známe aj mnohé nevýhody spojené so súčasnými inzulínovými terapiami. Inzulín sa podáva najčastejšie vo forme podkožnej injekcie, typicky do brucha alebo do hornej časti stehien. Inzulín možno podávať aj intravenózne alebo intramuskulárne. Aby sa v krvi udržala prijateľná hladina glukózy, je často potrebné injikovať inzulín aspoň raz alebo dvakrát denne, pričom v prípade potreby sa podávajú aj ďalšie injekcie inzulínu. Agresívne liečenie cukrovky môže vyžadovať dokonca ešte častejšie injekcie, keď pacient si pomocou domácej diagnostickej súpravy starostlivejšie sleduje hladinu glukózy v krvi. Podávanie inzulínu formou injekcie je v mnohých prípadoch nežiadúce. Po prvé, mnohí pacienti to považujú za obtiažne a ťaživé, aby si sami pichali injekcie tak často, ako je to potrebné, aby si v krvi udržali potrebnú hladinu glukózy. V skutočnosti mnohí pacienti s cukrovkou 2. typu sa roky vyhýbajú liečeniu inzulínom práve pre strach z ihly. Takéto váhanie môže viesť k nepohode, ktorá v najväznejších prípadoch môže ohrozovať život. Okrem toho systémová absorpcia inzulínu z podkožnej injekcie je pomerne pomalá a často vyžaduje 45 až 90 minút, dokonca aj vtedy, keď sa použijú rýchlo pôsobiace prípravky inzulínu. Bolo preto cieľom poskytnúť alternatívne prípravky inzulínu a alternatívne cesty podávania, ktoré obchádzajú potrebu toho, aby si pacient sám pichal injekcie, a ktorý môže poskytnúť rýchlu systémovú dostupnosť inzulínu.

Preskúmalo sa mnoho neinjekčných typov prípravkov, napríklad orálne a nazálne, avšak ako výsledok tohto úsilia sa nevyvinul nijaký komerčne úspešný orálny alebo nazálny systém podávania inzulínu (Patton a spol., Adv. Drug Delivery Reviews, 1, 35 (2-3), 235-247 (1999), predovšetkým pre veľmi nízku a premenlivú biologickú dostupnosť (J. Hilsted a spol., Diabetologia 38, 680-684 (1995)). Hoci biologickú dostupnosť možno zvýšiť pomocou prostriedkov zvyšujúcich absorpciu, tieto prostriedky môžu poškodiť sliznicu.

Vyvinuli sa však inhalovateľné prípravky inzulínu, ktoré sa zdajú byť celkom sľubné v odstraňovaní vyššie uvádzaných problémov. Napríklad US patent číslo 5,997,848 (Patton a spol., Inhale Therapeutic Systems, Inc.) opisuje suché práškové prípravky inzulínu, ktoré sú (i) pri izbovej teplote chemicky a fyzikálne stabilné, a (ii) po inhalácii sa cez epitelové bunky alveolárnej oblasti rýchlo absorbujú do krvného obehu. Rýchlo pôsobiace inzulínové prípravky a spôsoby opisované v uvedenom patente obchádzajú potrebu obtiažnych samoinjekcií a v trojmesačných štúdiách o účinnosti v ľudskom systéme sa ukázalo, že poskytujú ekvivalentnú kontrolu glukózy u diabetikov s cukrovkou závislou od inzulínu typu I a II v porovnaní s podkožnými injekciami (Patton a spol., Adv. Drug Delivery Reviews, 1, 35 (2-3), 235-247 (1999)). Suché práškové inzulínové prípravky opisované Pattonom a spol., hoci na jednej strane odstraňujú problémy s nestabilitou prípravku a s nepohodou pacientov, stále ešte vyžadujú časté (napríklad v čase jedenia) inhalácie inzulínu na účinnú kontrolu glukózy. Okrem toho typický inzulínový dávkovací režim založený na rýchlom účinku inhalovateľného inzulínu stále ešte u diabetikov I. aj II. typu vyžaduje jednu dávku inzulínu s dlhodobým účinkom pred spaním. To znamená, že stále existuje potreba aktívnych rozpustných a stabilných foriem inzulínu, ktoré vyžadujú menej časté dávkovanie, t.j. inzulínové prípravky s dlhodobým účinkom, ktoré sú výhodne podávané inhaláciou.

Inzulínové prípravky s dlhodobým účinkom sa ideálne vyznačujú veľmi pomalým začiatkom a predĺženým, pomerne plochým vrcholom účinku. Súčasné injikovateľné prípravky inzulínu s dlhodobým účinkom, napríklad prípravok ultralente (zinková suspenzia inzulínu s predĺženým účinkom) a protamínová zinková inzulínová suspenzia, nie sú príliš uspokojivé. Tieto prípravky sa vyznačujú skôr

vrcholom účinku a neposkytujú nízku základnú koncentráciu inzulínu, sú nepredvídateľné a typicky sa vyznačujú dobou účinku, ktorá nie je dlhšia ako približne jeden deň. Dlhý biologický polčas inzulínu ultralente sťažuje určiť optimálny rozsah dávok a protamínový zinkový inzulín sa používa zriedka pre jeho nepredvídateľný a predĺžený priebeh účinku (Goodman a Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9. vydanie, zostavili Hardman a Limbird, 1996, strana 1500). Iné neúspešne skúšané injikovateľné prípravky s dlhodobým účinkom zahŕňajú prípravky s inzulínom naviazaným na albumín a hexamér inzulínu s kobaltom (A. Hoffman, E. Ziv, *Clin. Pharmacokinet.*, 33(4): 285-301 (1997)).

Preskúmalo sa aj mnoho pľúcnych prípravkov inzulínu s dlhodobým účinkom. Zahŕňajú lipozómy obsahujúce veľký nadbytok lipidu vo vzťahu k inzulínu (F.-Y. Liu a spol., *Pharm. Res.* 109, 228-232 (1993)), porézne poly(kyselina mliečna-kyselina glykolová) (PLGA) častice inzulínu (D. A. Edwards a spol., *Science* 276 (5320), 1868-1871 (1997)), nebulizované PLGA nanosféry (Y. Kawashima a spol., *J. Controlled Release*, 62 (1-2): 279-287 (1999)) a fosfolipidové/protamínové inzulínové prípravky (R. Vanbever a spol., *Proc. Control Rel. Bioact. Mater.* 25, 261-262 (1998). Nanešťastie sa ukázalo, že všetky tieto prípravky sú neuspokojivé, buď kvôli nízkej biologickej dostupnosti po podaní potkanom, alebo kvôli nedostatkom v prípravku. Existuje preto dávno pociťovaná potreba optimalizovaných inzulínových prípravkov s dlhodobým účinkom, ktoré sú biologicky aktívne, fyzikálne a chemicky stabilné, rozpustné vo vode, a výhodne sú monoméne. Takéto prípravky budú ideálne výhodne vhodné na pľúcne podávanie.

Podstata vynálezu

V jednom aspekte vynález je založený na inzulínových prípravkoch na podávanie do systémového obehu prostredníctvom hlbokých oblastí pľúc. Podstatou vynálezu je teda inzulínový prípravok na podávanie do pľúc, ktorý obsahuje konjugát inzulínu kovalentne spojený s jednou alebo viacerými molekulami umelo pripraveného hydrofilného polyméru. Vo výhodnom uskutočnení umelo pripravený hydrofilný polymér kovalentne naviazaný na inzulín je polyalkylénglykol,

napríklad polyetylén glykol (PEG), hoci všetky tu uvádzané uskutočnenia možno tak isto použiť aj v prípade iných umelo pripravených hydrofilných polymérov.

Všeobecne, konjugát inzulínu a polyméru podľa vynálezu má také farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti, ktoré sú lepšie ako sú vlastnosti natívneho inzulínu, osobitne vtedy, keď sa podáva do pľúc. V jednom uskutočnení konjugáty PEG a inzulínu poskytované podľa vynálezu majú dobrú absolútnu biologickú dostupnosť, ak sa podávajú do pľúc a hlboko do pľúc. V osobitnom uskutočnení konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu sa vyznačuje absolútnou pľúcnou biologickou dostupnosťou, ktorá je väčšia ako biologická dostupnosť natívneho inzulínu. Výhodne sa konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu vyznačuje absolútnou pľúcnou biologickou dostupnosťou, ktorá je aspoň 1,5- až 2,0-krát vyššia ako je biologická dostupnosť natívneho inzulínu. Vo výhodnom uskutočnení konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu sa vyznačuje absolútnou pľúcnou biologickou dostupnosťou, ktorá je vyššia ako približne 15 %, ešte výhodnejšie vyššia ako približne 20 %, alebo najvýhodnejšie vyššia ako približne 30 %.

V ďalšom uskutočnení konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu, ak sa podáva pľúcne, má T_{max} (čas potrebný na dosiahnutie maximálnej koncentrácie), ktorý je aspoň 1,5-krát vyšší ako je čas u natívneho inzulínu, alebo výhodnejšie je aspoň 2- až 3-krát vyšší, alebo ešte výhodnejšie aspoň päťkrát vyšší ako je T_{max} natívneho inzulínu.

Polyetylén glykoly na použitie v konjugátoch podľa vynálezu môžu mať niekoľko rôznych vlastností. V jednom uskutočnení vynálezu polyetylén glykolová časť konjugátu PEG a inzulínu podľa vynálezu je na konci ukončená inertnou alebo nereaktívnou terminálnou skupinou, napríklad alkoxy skupinou alebo špecificky metoxy skupinou.

V alternatívnom uskutočnení polyetylén glykolová časť konjugátu má takú architektúru, ktorá je osobitne vhodná na naviazanie na inzulín včítane lineárnych polyetylén glykolov a mnohoramenných alebo rozvetvených polyetylén glykolov. V ďalšom uskutočnení konjugát PEG a inzulínu môže zahŕňať dve monofunkčne odvodené molekuly inzulínu, ktoré sú vzájomne spojené di-aktivovaným polyetylén glykolom (inzulín-PEG-inzulín). Alternatívne, molekulu inzulínu v rámci tejto „činkovitej“ architektúry možno modifikovať ďalšími polyetylén glykolmi.

V ďalšom uskutočnení konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu zahŕňa vidlicovito vetvený polyetylén glykol s rozvetvenou časťou na jednom konci polymérového reťazca a dve voľné reaktívne skupiny (alebo násobok dvoch) spojené s rozvetvenou časťou na naviazanie na inzulín. V tomto uskutočnení vynálezu rozvetvená architektúra polyetylén glykolu umožňuje naviazanie polymérového reťazca na dve alebo viaceré molekuly inzulínu.

Polyetylén glykolová časť inzulínového konjugátu podľa vynálezu môže voliteľne obsahovať jednu alebo viaceré degradovateľné spojenia.

Inzulín je typicky kovalentne napojený na PEG prostredníctvom spojovacej časti, ktorá je umiestnená na konci molekuly PEG. Výhodné spojovacie časti na použitie podľa vynálezu zahŕňajú tie, ktoré sú vhodné na spojenie s reaktívnymi aminoskupinami inzulínu, napríklad aktívne estery, aktívne karbonáty, aldehydy a acetáty *N*-hydroxysukcínimidu.

V ďalšom uskutočnení vynálezu PEG kovalentne napojený na inzulín v konjugáte podľa vynálezu zahŕňa približne 2 až približne 300 podjednotiek (OCH₂CH₂), výhodne približne 4 až 200 podjednotiek, a výhodnejšie približne 10 až 100 podjednotiek.

V alternatívnom uskutočnení PEG kovalentne naviazaný na inzulín má nominálnu priemernú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 10000 daltonov. Vo výhodnom uskutočnení PEG má nominálnu priemernú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 5000 daltonov. V ešte výhodnejšom uskutočnení PEG má nominálnu priemernú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 2000 daltonov, alebo približne 200 až približne 1000 daltonov.

V osobitnom uskutočnení inzulínová časť konjugátu zahŕňa natívny ľudský inzulín.

V ďalšom uskutočnení konjugát prípravku podľa vynálezu sa vyznačuje čistotou, ktorá je vyššia ako 90 % (t.j. v konjugátovej časti prípravku 90 alebo viac % hmotnostných zahŕňa jeden alebo viaceré polyetylén glykoly s inzulínom). To znamená, že prípravky podľa vynálezu sa môžu vyznačovať vysokým stupňom čistoty konjugovanej inzulínovej zložky, t.j. v prípravku nie sú merateľné množstvá voľných polyetylén glykolov a iných nečistôt súvisiacich s PEG.

V jednom uskutočnení prípravok podľa vynálezu zahŕňa konjugát, v ktorom inzulín je kovalentne naviazaný na PEG v jednom alebo viacerých zo svojich amino miest. Inzulín obsiahnutý v prípravku podľa vynálezu môže byť monosubstituovaný (t.j. má iba jeden kovalentne naviazaný PEG). Osobitné monosubstituované konjugáty PEG a inzulínu podľa vynálezu majú polyetylén glykolovú časť kovalentne naviazanú na polohu molekuly inzulínu, ktorá môže byť skupina PheB1, GlyA1 a LysB29.

Vo výhodnom uskutočnení polyetylén glykolová časť je kovalentne naviazaná na inzulín v mieste PheB1. PEG v jednom uskutočnení aspoň v 75 % miest B-1Phe inzulínu je kovalentne naviazaných na PEG. V ďalšom uskutočnení aspoň približne 90 % miest B-1Phe inzulínu je kovalentne naviazaných na PEG.

Prípravky podľa vynálezu môžu zahŕňať aj zmes monokonjugovaného a dikonjugovaného inzulínu a PEG, ktorá má ktorúkoľvek vlastnosť alebo vlastnosti opísané vyššie. Takéto prípravky môžu ďalej zahŕňať trikonjugovaný inzulín a PEG.

V alternatívnom uskutočnení konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu sa vyznačuje takou rýchlosťou proteolýzy, ktorá je znížená v porovnaní s nepegylovaným alebo natívnym inzulínom.

Prípravok podľa vynálezu môže zahŕňať aj zmes konjugátu PEG a inzulínu a nie chemickým spôsobom modifikovaného alebo natívneho inzulínu.

Do vynálezu sa zahŕňa aj prípravok opísaný vyššie vo forme aerosólu.

Prípravky podľa vynálezu možno rozpustiť alebo suspendovať v tekutej alebo suchej forme a okrem toho môžu zahŕňať aj farmaceuticky prijateľný excipient.

Poskytuje sa aj biologicky aktívny konjugát polyetylén glykolu a inzulínu, ktorý je vhodný na podávanie inhaláciou do hlbokých častí pľúc.

V ďalšom aspekte vynález poskytuje spôsob na podávanie konjugátu PEG a inzulínu cicavčiemu subjektu, ktorý takýto konjugát potrebuje, inhaláciou prípravku PEG a inzulínu podľa opisu vyššie vo forme aerosólu.

V ďalšom aspekte vynález poskytuje aj spôsob na poskytovanie v podstate neimunogénneho inzulínového prípravku na podávanie do pľúc. Spôsob zahŕňa kovalentné naviazanie inzulínu na jednu alebo viaceré molekuly umelo pripraveného hydrofilného polymérneho konjugátu podľa opisu vo vynáleze a podávanie prípravku

do pľúc pacientovi inhaláciou. Týmto spôsobom inzulín prechádza do pľúc a vstupuje do krvného obehu.

V ďalšom aspekte sa poskytuje spôsob na poskytovanie inzulínového prípravku s predĺženým účinkom na podávanie do pľúc ľudského subjektu. Spôsob zahŕňa kovalentné naviazanie inzulínu na jednu alebo viaceré molekuly umelo pripraveného hydrofilného polyméru na poskytovanie prípravku, ktorý zahŕňa konjugát inzulínu a hydrofilného polyméru a podávanie prípravku do pľúc subjektu inhaláciou. Po podaní inzulín prechádza do pľúc a vstupuje do krvného obehu a zvýšené hladiny inzulínu v krvi sa udržujú aspoň 8 hodín po podaní.

Konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu vo forme aerosólu a podávaný inhaláciou je užitočný na liečenie cukrovky (diabetes mellitus, DM).

Tieto a iné objekty a vlastnosti vynálezu budú jasnejšie po prečítaní nasledujúceho podrobného opisu.

Návrh, syntéza a charakterizovanie rôznych zástupcov konjugátov PEG a inzulínu bolo optimalizované na pulmonárne podávanie do pľúc. Hoci príprava molekúl PEG a inzulínu bola už opísaná dávnejšie, použitie kovalentného naviazania PEG na poskytovanie prípravkov inhalovateľného inzulínu s predĺženým účinkom nebolo predtým dokázané. V tomto ohľade výzva, ktorej prihlasovatelia čelili, bola poskytnúť konjugáty PEG a inzulínu s optimálnym vyvážením počtu, lokalizácie, štruktúry a molekulovej hmotnosti reťazcov PEG kovalentne naviazaných na molekuly inzulínu na poskytnutie inzulínových prípravkov vhodných na podávanie do systémového obehu, výhodne cez hlboké časti pľúc. V súvislosti s vyššie uvedeným, sa prekvapujúco zistilo, že určité inzulínové prípravky modifikované polyetylén glykolom majú jednu alebo niekoľko z nasledujúcich vlastností: (i) sú biologicky aktívne, t.j. majú aspoň 5 % aktivity natívneho inzulínu, alebo výhodne ich biologická aktivita sa buď aspoň do značnej miery udržiava, alebo sa iba minimálne znižuje v porovnaní s aktivitou natívneho inzulínu, (ii) absorbujú sa z pľúc do krvného obehu (na rozdiel od „ostávania“ v pľúcach), (iii) sú chemicky a fyzikálne stabilné, (iv) ak sa podávajú do pľúc, dosahujú také koncentrácie inzulínu v krvi, ktoré sú zvýšené nad základnou hladinou aspoň približne ešte 8 hodín po podaní, (v) sú rezistentné voči enzýmom degradujúcim inzulín, a (vi) majú také biologické polčasy, ktoré sú dlhšie ako je polčas nepegylovaného inzulínu po

podaní inhaláciou, podrobnosti ktorých budú zrejmé po prečítaní nasledujúceho opisu.

I. Definície

Nasledujúce výrazy, tak ako sa používajú vo vynáleze, majú uvedený význam.

Tak, ako sa používajú v špecifikácii a v priložených nárokoch, formy v singulári zahŕňajú aj odkazy v pluráli, pokiaľ kontext jasne nediktuje inak.

„Inzulín“ tak, ako sa používa vo vynáleze, zahŕňa aj proinzulín a obsahuje všetky vyčistené izolované polypeptidy, ktoré majú časť alebo celú primárnu štrukturálnu konformáciu (to znamená, vedľa seba ležiacu sériu aminokyselinových zvyškov) a aspoň jednu z biologických vlastností prírodného inzulínu. Všeobecne, výraz „inzulín“ zahŕňa prírodný a synteticky odvodený inzulín zahŕňajúci aj jeho glykoformy aj analógy včítane polypeptidov s jednou alebo viacerými modifikáciami aminokyselín (deléciami, inzerciami alebo substitúciami) v takom rozsahu, že do značnej miery si uchovávajú aspoň 80 % alebo viac terapeutickú aktivitu spojenú s inzulínom s plnou dĺžkou (ešte pred chemickou modifikáciou s hydrofilným, umelo pripraveným polymérom podľa opisu vynálezu. Inzulíny podľa vynálezu možno vyprodukovať akýmkoľvek štandardným spôsobom zahŕňajúcim, avšak neobmedzujúcim sa na pankreatickú extrakciu, rekombinantnú expresiu a polypeptidovú syntézu *in vitro*. Natívny inzulín alebo inzulín divého typu môže byť prírodný (t.j. izolovaný z prírodného zdroja) alebo vytvorený synteticky.

„Fyziologicky štiepateľná“ alebo „degradovateľná“ väzba znamená slabú väzbu, ktorá vo fyziologických podmienkach reaguje s vodou (t.j. hydrolyzuje sa). Výhodné sú také väzby, ktorých polčas hydrolyzy pri pH 8 a 25 °C je menej ako približne 30 minút. Tendencia väzby hydrolyzovať vo vode nezávisí len od všeobecného typu väzby spájajúcej dva centrálné atómy, ale aj od substituentov naviazaných na tieto centrálné atómy. Primerané hydrolyticky nestabilné alebo slabé väzby zahŕňajú, avšak sa neobmedzujú iba na karboxylátester, fosfátester, anhydridy, acetály, ketály, acyloxyalkyléter, imíny, ortoestery, peptidy a oligonukleotidy.

„Hydrolyticky stabilné“ spojenie alebo väzba sa vzťahuje na chemickú väzbu, typicky kovalentnú väzbu, ktorá je vo vode značne stabilná, to znamená, že vo fyziologických podmienkach sa dlho nehydrolyzuje vo väčšom rozsahu. Príklady hydrolyticky stabilných väzieb zahŕňajú, avšak sa neobmedzujú na nasledujúce väzby: väzby uhlík-uhlík (napríklad v alifatických reťazcoch), étery, amidy, uretány, a podobne. Všeobecne, hydrolyticky stabilná väzba je taká väzba, ktorej rýchlosť hydrolyzy je vo fyziologických podmienkach nižšia ako 1 až 2 % denne. Rýchlosť hydrolyzy reprezentatívnych chemických väzieb možno nájsť vo väčšine štandardných učebníc chémie.

„PEG“ alebo polyetylén glykol tak, ako sa používa vo vynáleze, zahŕňa všetky poly(alkylén oxidy) rozpustné vo vode. Polyetylén glykoly na použitie podľa vynálezu najtypickejšie obsahujú nasledovnú štruktúru: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$, kde terminálne skupiny alebo skutočná architektúra celkovej PEG časti môže byť rôzna. Jeden všeobecne používaný PEG je PEG s ukončeným koncom, kde jeden koniec PEG je ukončený pomerne inaktívnou skupinou, typicky alkoxy skupinou, napríklad metoxy skupinou ($-\text{OCH}_3$), a na druhom konci je hydroxyl, ktorý môže byť chemicky modifikovaný. Špecifické PEG formy na použitie pri príprave inzulínových konjugátov podľa vynálezu, ako sú napríklad rozvetvené, lineárne, vidlicovito vetvené polyetylén glykoly a podobne, budú podrobnejšie opísané nižšie.

„Konjugát PEG a inzulínu“ sa vzťahuje na molekulu inzulínu (podľa definície vyššie), na ktorú je kovalentne naviazaná alebo pripojená aspoň jedna polyetylén glykolová časť a vykazuje stupeň inzulínovej aktivity (napríklad približne 2 % až približne 100 % alebo viac biologickej aktivity natívneho inzulínu).

„Nominálna priemerná molekulová hmotnosť v kontexte hydrofilného, umelo pripraveného polyméru podľa vynálezu, napríklad PEG, sa vzťahuje na priemernú molekulovú hmotnosť polyméru, ktorá sa typicky stanovuje s použitím size exclusion chromatografie, rozptylu svetla alebo skutočnej rýchlosti v 1,2,4-trichlórbenzéne. Polyméry podľa vynálezu sú typicky polydisperzné, ktorých nízka hodnota polydisperzity je nižšia ako približne 1,05.

„Lipofilná časť“ je časť molekuly, ktorá po naviazaní na hydrofilný polymér podľa vynálezu prostredníctvom degradovateľnej alebo nedegradovateľnej väzby je schopná podstatne zmeniť hydrofilnú povahu polyméru a tým aj konjugátu polyméru

a inzulínu. Typické lipofilné skupiny, napríklad mastné kyseliny, zahŕňajú približne 12 až 22 atómov uhlíka.

„Značne neimunogénny konjugát inzulínu podľa vynálezu má zníženú imunogenitu v porovnaní s natívnym inzulínom. Imunogenitu možno určiť stanovením koncentrácie protilátok u myši alebo výhodne u králikov po podaní konjugátu PEG a inzulínu v porovnaní s nemodifikovaným inzulínom.

„Alkyl“ sa vzťahuje na uhľovodíkové reťazce, ktorých dĺžka je typicky 1 až 15 atómov. Uhľovodíkové reťazce sú výhodne, avšak nie nevyhnutne nasýtené a môžu voliteľne obsahovať aj ďalšie napojené funkčné skupiny. Uhľovodíkové reťazce môžu byť rozvetvené alebo nerozvetvené. Alkylskupiny zahŕňajú napríklad etyl, propyl, 1-metylbutyl, 1-etylpropyl a 3-metylpentyl. V jednom výhodnom uskutočnení podľa vynálezu konjugáty zahŕňajúce alkylovaný PEG, a osobitne lineárny alkylovaný PEG sú tie, ktorých alkylová časť nie je mastná kyselina alebo iná lipofilná časť.

„Nižší alkyl“ sa vzťahuje na alkyl obsahujúci 1 až 5 atómov uhlíka a môže to byť priamy alebo rozvetvený reťazec, napríklad metyl, etyl, *n*-butyl, izobutyl, *tert*-butyl.

„Absolútne pľúcna biologická dostupnosť“ znamená percento dávky lieku (napríklad konjugátu PEG a inzulínu podľa vynálezu), ktorá sa podá do pľúc a absorbuje sa a vstúpi do krvného obehu cicavca, v porovnaní s intravenóznou dávkou natívneho inzulínu. Reprezentatívne modelové systémy na stanovenie absolútnej pľúcnej biologickej dostupnosti zahŕňajú potkana, psa, králika a opicu. Inhalovateľné prípravky obsahujúce konjugáty PEG a inzulínu podľa vynálezu sa v jednom aspekte vyznačujú absolútnou pľúcnou biologickou dostupnosťou aspoň 20 % v plazme alebo v krvi, pričom absolútna pľúcna biologická dostupnosť môže byť 10 až 30 % alebo viac. Všeobecne, v závislosti od špecifickej povahy konjugátu PEG a inzulínu, konjugát podľa vynálezu sa vyznačuje absolútnou pľúcnou biologickou dostupnosťou, hodnota ktorej môže byť 10 %, 12 %, 15 %, 18 %, 20 %, 22 %, 25 %, 30 %, 32 %, 35 % alebo viac. Absolútnu pľúcnu biologickú dostupnosť možno odhadnúť meraním absorpcie z priameho intratracheálneho podania, instilácie, alebo inhalácie prípravku obsahujúceho konjugát PEG a inzulínu.

„Fáza distribúcie“ vo vzťahu na biologický polčas konjugátu PEG a inzulínu sa vzťahuje na počiatočnú rýchlu fázu, počas ktorej sa inzulín stratí z plazmy. Terminálna pomalá alebo eliminačná fáza polčasu sa vzťahuje na pomalú fázu, počas ktorej sa inzulín eliminuje z tela.

„Predĺžený účinok“ inzulínu sa vzťahuje na inzulín, trvanie účinku (t.j. zvýšené hladiny nad základnou hladinou) ktorého je aspoň 6 hodín, výhodne aspoň 8 hodín.

„Potlačená hladina glukózy“ sa vzťahuje na hladiny glukózy v krvi (napríklad po podaní konjugátu PEG a inzulínu podľa vynálezu), ktoré sú potlačené pod hodnoty základnej hladiny.

„Farmaceuticky prijateľná soľ“ zahŕňa, avšak sa neobmedzuje, na soľ aminokyselín, soli pripravené s anorganickými kyselinami, napríklad chloridy, sulfáty, fosfáty, difosfáty, hydrobromidy a nitráty, alebo soli pripravené s organickými kyselinami, napríklad maláty, maleáty, fumaráty, vínany, jantarany, etyljantarany, citráty, acetáty, laktáty, metánsulfonáty, benzoáty, askorbáty, *para*-toluénsulfonáty, palmoáty, salicyláty a stearáty, ako aj estoláty, glyceptáty a laktobionáty. Podobne, soli obsahujúce farmaceuticky prijateľné kationy obsahujú, avšak sa neobmedzujú na sodík, draslík, vápnik, horčík, hliník, lítium a amónium (včítane substituovaného amónia).

„Aminokyselina“ sa vzťahuje na akúkoľvek zlúčeninu obsahujúcu aminoskupinu a karboxylovú skupinu. Hoci aminoskupina sa najčastejšie vyskytuje v polohe, ktorá susedí s karboxyfunkciou, aminoskupina môže byť umiestnená v ktorejkoľvek polohe v molekule. Aminokyselina môže obsahovať aj ďalšie funkčné skupiny, napríklad amino, tio, karboxyl, karboxamid, imidazol a podobne. Aminokyselina môže byť syntetická alebo prírodná a môže sa použiť buď v jej racemickej alebo opticky aktívnej (D- alebo L-) forme včítane rôznych pomerov enantiomérov.

„Peptidy“ sa skladajú z dvoch alebo viacerých aminokyselín spojených peptidickou väzbou. Peptidy môžu byť homo- alebo heteropeptidy (t.j. zložené z rovnakých alebo rôznych aminokyselinových zvyškov podľa definície vyššie) a môžu mať rôznu dĺžku od dvoch do niekoľko sto aminokyselín.

„Suchý prášok“ sa vzťahuje na práškový prípravok, ktorý typicky obsahuje menej ako približne 10 % vlhkosti.

Prípravok, ktorý je „vhodný na pulmonárne podávanie“, sa vzťahuje na prípravok, ktorý sa dá previesť do aerosólu a pacient ho dokáže inhalovať tak, aby sa časť aerosólových častíc dostala do pľúc, aby sa umožnil prienik do dolných dýchacích ciest a alveol. Takýto prípravok sa považuje za „vdýchateľný“ alebo „inhalovateľný“.

„Aerosólové“ častice sú kvapalné alebo tuhé častice suspendované v plyne, typicky ako výsledok spustenia (alebo zapnutia) inhalačného zariadenia, napríklad inhalátora na suché prášky, atomizátora, inhalátora s dávkovačom alebo nebulizátora.

„Emitovaná dávka“ alebo „ED“ poskytuje indikáciu podania liekového prípravku z vhodného inhalačného zariadenia po spustení alebo rozptyle. Špecifickejšie, pre prípravky so suchými práškami ED je miera percenta prášku, ktorý sa získa z balenia s jednotkovými dávkami a ktorý vyjde z náustka inhalátora. ED sa definuje ako pomer dávky podanej inhalátorom a nominálnej dávky (t.j. hmotnosť prášku na jednotku dávky umiestnenej do vhodného inhalačného zariadenia pred jeho spustením). ED je experimentálne stanovený parameter a určuje sa typicky pomocou *in vitro* zariadenia, ktoré je zostavené tak, aby napodobňovalo dávkovanie pre pacienta. Na stanovenie ED hodnoty sa nominálna dávka suchého prášku, typicky v jednotkovej dávkovej forme, sa umiestni do vhodného inhalátora na suchý prášok (napríklad toho, ktorý je opísaný v US patente č. 5,785,049, Inhale Therapeutic Systems), ktorý sa potom spustí, čím sa prášok rozptýli. Výsledný aerosólový oblak sa potom pomocou vákua vytlačí zo zariadenia, kde sa zachytí na dechtovom filtri pripojenom k náustku zariadenia. Množstvo prášku, ktoré sa dostane na filter, znamená emitovanú dávku. Napríklad pre dávkovú formu obsahujúcu 5 mg suchého prášku umiestnenú do inhalačného zariadenia, ak výsledkom disperzie prášku je 4 mg prášku na dechtovom filtri podľa opisu vyššie, potom emitovaná dávka pre suchý práškový prípravok je $4 \text{ mg} / 5 \text{ mg (nominálna dávka)} \times 100 = 80 \%$. Pre nehomogénne prášky hodnoty ED poskytujú indikáciu podávania liečiva, nie suchého prášku, z inhalačného zariadenia po spustení, a sú založené na množstve liečiva a nie na celkovej hmotnosti prášku. Podobne pre MDI a nebulizátorové dávkové formy ED

zodpovedá percentu liečiva, ktoré sa získa z dávkovej formy a ktorá odchádza z náustku inhalačného zariadenia.

„Dávka jemných častíc“ („FPD“ alebo fine particle dose) je definovaná ako hmotnostné percento častíc prášku, ktorých aerodynamický priemer je nižší ako 3,3 μm , ktorá sa typicky stanovuje meraním v kaskádovom impaktore Andersenovho typu. Tento parameter poskytuje indikáciu percenta častíc s najväčším potenciálom dosiahnuť hlboké časti pľúc pacienta na systémový príjem liečiva.

„Dispergovateľný“ alebo „disperzný“ prášok je taký prášok, ktorého ED hodnota je aspoň 30 %, výhodnejšie 40 až 50 %, a ešte výhodnejšie aspoň 50 až 60 % alebo viac.

„Hmotnostný stredný priemer“ alebo „MMD“ (mass median diameter) je miera priemernej veľkosti častíc, pretože prášky podľa vynálezu sú všeobecne polydisperzné (t.j. pozostávajú z častíc rôznej veľkosti). Hodnoty MMD podľa opisu vo vynáleze sa stanovujú centrifugačnou sedimentáciou, hoci možno použiť akýkoľvek počet bežne používaných spôsobov na meranie priemernej veľkosti častíc (napríklad elektrónová mikroskopia, rozptyl svetla, laserová difrakcia).

„Hmotnostný stredný aerodynamický priemer“ alebo „MMAD“ je miera aerodynamickej veľkosti rozptýlenej častice. Aerodynamický priemer sa používa na opis aerosólového prášku ohľadne jeho správania sa počas usadzovania a znamená priemer sférického telesa jednotkovej hustoty, ktorej sedimentačná rýchlosť vo vzduchu je rovnaká ako je sedimentačná rýchlosť častice. Aerodynamický priemer zahŕňa tvar častice, hustotu a fyzikálnu veľkosť častice. Tak, ako sa používa vo vynáleze, MMAD sa vzťahuje na distribúciu strednej hodnoty alebo mediánu aerodynamickej veľkosti častíc aerosólového prášku stanovenej kaskádovým impaktom, ak nie je uvedené inak.

„Farmaceuticky prijateľný excipient alebo nosič“ sa týka excipienta, ktorý možno voliteľne zahrnúť do prípravku podľa vynálezu. Výhodné pre prípravky na inhalovanie sú excipienty, ktoré možno podať do pľúc bez výrazných vedľajších toxikologických účinkov subjektu, a osobitne do pľúc subjektu.

„Farmakologicky účinné množstvo“ alebo „fyziologicky účinné množstvo“ znamená množstvo konjugátu PEG a inzulínu, ktoré je prítomné v terapeutickom prípravku podľa opisu vo vynáleze, ktoré je potrebné na poskytnutie požadovanej

hladiny inzulínu v krvnom obehu, ktoré vedie k cieľovej hladine glukózy v krvi. Presné množstvo závisí od mnohých faktorov, napríklad od daného konjugátu PEG a inzulínu, použitého podávacieho zariadenia, komponentov a od fyzikálnych vlastností terapeutického prípravku, cieľovej populácie pacientov, údajov pacientov, a podobne, a osoby oboznámené s problematikou ich môžu ľahko stanoviť podľa informácií poskytovaných podľa vynálezu.

II. Hydrofilné, umelo pripravené konjugáty polyméru a inzulínu

Pripravilo sa niekoľko ilustrujúcich konjugátov PEG a inzulínu podľa vynálezu. Hoci výhodným polymérom na použitie v konjugátoch podľa vynálezu je polyetylén glykol, možno použiť aj iné, vo vode rozpustné hydrofilné, umelo pripravené polyméry. Iné polyméry vhodné na použitie podľa vynálezu zahŕňajú polyvinylpyrolidón, polyvinylalkohol, polyakryloylmorfolín, polyoxazolín a poly(oxyetylované polyoly), napríklad poly(oxyetylovaný glycerol), poly(oxyetylovaný sorbitol), a polyoxyetylovaná glukóza). Možno použiť aj polyméry zahŕňajúce podjednotky alebo bloky podjednotiek vybrané z vyššie opísaných polymérov rozpustných vo vode. Okrem toho možno použiť aj kopolyméry polyetylén glykolu a polypropylén glykolu. Polyméry podľa vynálezu sú výhodne bez skupín mastných kyselín alebo iných lipofilných častí.

Nasledujúca sekcia ilustruje, že opatrným výberom jednej alebo viacerých PEG častí reagencií pegylácie, miest pegylácie inzulínu, podmienok pegylácie a následného vyčistenia konjugátu možno získať prípravky s obsahom konjugátu PEG a inzulínu s požadovanými klinickými vlastnosťami (lepšie farmakokinetické a/alebo farmakodynamické vlastnosti). Špecifické vlastnosti konjugátov PEG a inzulínu podľa vynálezu sú poskytnuté nižšie.

A. Štruktúrne vlastnosti polyméru a výsledný konjugát

Konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu typicky zahŕňa jeden alebo viaceré reťazce PEG, ktoré majú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 40000 daltonov a výhodne približne 200 až približne 10000 daltonov. Výhodne, PEG na použitie podľa vynálezu má priemernú molekulovú hmotnosť, ktorá je v niektorom z nasledujúcich oblastí: približne 200 až 10000 daltonov, približne 200 až približne

7500 daltonov, približne 200 až približne 6000 daltonov, približne 200 až približne 5000 daltonov, približne 200 až približne 3000 daltonov, približne 200 až približne 2000 daltonov, a približne 200 až približne 1000 daltonov. Príkladné konjugáty pripravené s polyetylén glykolmi s molekulovou hmotnosťou 5000 daltonov, 2000 daltonov a 750 daltonov sú uvedené v príkladoch 1 až 4.

Výhodné konjugáty PEG a inzulínu na podávanie do pľúc majú PEG časť, ktorej molekulová hmotnosť je nižšia ako 5000 daltonov, výhodne nižšia ako približne 2000 daltonov, a dokonca nižšia ako približne 1000 daltonov. V jednom osobitnom uskutočnení vynálezu konjugát PEG a inzulínu má časť PEG, ktorej priemerná molekulová hmotnosť je 200, 300, 400, 500, 600, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 alebo 5000. Polyetylén glykoly s vyššou molekulovou hmotnosťou môžu byť v niektorých prípadoch menej výhodné pre svoj potenciál strácať aktivitu molekuly inzulínu, alebo v prípade pľúcnych aplikácií znižovať účinnosť pri prechode pľúcami (príklad 8).

Kým polyetylén glykoly s nižšou molekulovou hmotnosťou môžu byť výhodné pri zvyšovaní biologickej dostupnosti, reťazce PEG s vyššími molekulovými hmotnosťami, napríklad s molekulovými hmotnosťami 5000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000 alebo 40000 daltonov alebo viac, hoci sa všeobecne zistilo, že znižujú biologickú dostupnosť natívneho inzulínu, môžu byť výhodné pri zvyšovaní biologického polčasu, osobitne v prípade injekčných prípravkov. To znamená, že výrazné zlepšenie farmakokinetických parametrov, napríklad oblasti pod krivkou (area under the curve, AUC) v prípade konjugátu PEG a inzulínu s vyššou molekulovou hmotnosťou (v porovnaní s natívnym inzulínom) môže viac ako kompenzovať jeho zníženú aktivitu.

Čo sa týka počtu podjednotiek, polyetylén glykoly na použitie podľa vynálezu typicky zahŕňajú taký počet podjednotiek (OCH_2CH_2), ktorý je v niektorej z nasledujúcich oblastí: 2 až približne 900 podjednotiek, približne 4 až približne 200 podjednotiek, približne 4 až približne 170 podjednotiek, približne 4 až približne 140 podjednotiek, približne 4 až približne 100 podjednotiek, približne 10 až približne 100 podjednotiek, približne 4 až približne 70 podjednotiek, približne 4 až približne 45 podjednotiek, a približne 4 až približne 25 podjednotiek.

Konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu môže byť monosubstituovaný (t.j. PEG je naviazaný na jedno reaktívne miesto inzulínu), disubstituovaný (PEG časti sú naviazané na dve reaktívne miesta), trisubstituovaný, alebo má polyméry dokonca naviazané na viac ako 3 miestach molekuly inzulínu. Monosubstituovaný, disubstituovaný a trisubstituovaný inzulín sa podľa vynálezu uvádza ako monomér, dimér a trimér polyetylén glykolu (PEG). Multisubstituovaný inzulín (to znamená inzulín, ktorého PEG časti sú kovalentne naviazané na 2 alebo viacerých miestach inzulínu) má typicky, avšak nie nevyhnutne naviazanú rovnakú PEG časť na každé reaktívne miesto. To znamená, že do úvahy prichádzajú prípravky obsahujúce konjugáty PEG a inzulínu, ktoré majú viac ako jeden typ PEG časti naviazaný na molekulu inzulínu. Výhodné prípravky podľa vynálezu obsahujú hlavne monoméne a/alebo dimérne konjugáty inzulínu. Prekvapujúco sa zistilo, že prípravky obsahujúce konjugát PEG a inzulínu, ktoré nie sú z hľadiska miesta špecifické (obsahujú zmes konjugátov PEG a inzulínu, ktoré sú kovalentne naviazané na viac ako jedno reaktívne miesto), majú lepšie farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti ako sú vlastnosti natívneho inzulínu, osobitne ak sa podávajú do pľúc (príklad 11).

Vzhľadom na polohu PEG substitúcie molekula inzulínu má niekoľko miest, ktoré sú vhodné na pegyláciu, pričom amino miesta sú všeobecne, avšak nie nevyhnutne výhodné. Špecifické aminoskupiny inzulínu vhodné na pegyláciu zahŕňajú oba *N*-konce, GlyA1, PheB1 a LysB29. Tieto miesta na molekule inzulínu sa tu uvádzajú jednoducho aj ako A1, B1 a B29. Elektrofilne aktivované polyetylén glykoly na použitie na naviazanie na reaktívne aminoskupiny na inzulíne zahŕňajú mPEG-ALD, mPEG-sukcínimidylpropionát, mPEG-sukcínimidylbutanoát, mPEG-CM-HBA-NHA, mPEG-benzotriazolkarbonát, mPEG-acetaldehyddietylacetál a podobne (Shearwater Corporation, Huntsville, Alabama).

Prípravok podľa vynálezu môže podľa jedného uskutočnenia obsahovať prevažne (viac ako 90 %) monosubstituovaný inzulín, napríklad mono-A1 inzulín, mono-B1 inzulín alebo mono-B29 inzulín. Takéto prípravky môžu obsahovať: i) mono-A1 inzulín, ii) zmes mono-A1 inzulínu a mono-B1 inzulínu, alebo iii) zmes mono-A1, mono-B1 a mono-B29 inzulínu. Prípravok podľa vynálezu môže

obsahovať prevažne disubstituovaný inzulín, napríklad di-A1,B1-inzulín, alebo di-A1,B29-inzulín, alebo di-B1,B29-inzulín, alebo ich akékoľvek kombinácie.

Podobne, prípravok podľa vynálezu môže obsahovať zmes rôznych konjugátov PEG a inzulínu (napríklad PEG naviazaný na ktorúkoľvek možnú kombináciu miest na naviazanie). Ak sa amino miesta na inzulíne použijú ako príklad, prípravok podľa vynálezu môže obsahovať ktorýkoľvek alebo viaceré z nasledujúcich konjugátov PEG a inzulínu: mono-A1-PEG inzulín, mono-B1-inzulín, mono-B29-inzulín, di-A1,B1-inzulín, di-A1,B29-inzulín, alebo tri-A1,B1,B29-inzulín. V jednom uskutočnení výhodné prípravky sú tie, ktoré obsahujú prevažne monoméry a diméry. Reprezentatívne prípravky môžu zahŕňať zmes konjugátov PEG a inzulínu obsahujúcu aspoň 75 % kombinovaného monoméru a diméru, aspoň približne 80 % kombinovaného monoméru a diméru, alebo aspoň približne 85 až 90 % kombinovaného monoméru a diméru (napríklad príklady 5 a 6).

PheB1 je osobitne výhodné miesto na chemickú modifikáciu naviazaním polyetylénglykolu. Osobitne, prípravok konjugátu PEG a inzulínu na použitie podľa vynálezu sa môže v jednom uskutočnení charakterizovať ako prípravok, v ktorom aspoň 70 % miest B-1 na inzulíne je kovalentne naviazaných na PEG bez ohľadu na celkový počet konjugátov PEG a inzulínu v prípravku (napríklad tabuľka 3A, príklad 5).

Alternatívne uskutočnenia zahŕňajú také uskutočnenia, v ktorých aspoň 75 % miest B-1 na inzulíne je kovalentne naviazaných na PEG, alebo v ktorých aspoň 80 % miest B-1 na inzulíne je kovalentne naviazaných na PEG, alebo v ktorých aspoň 90 % miest B-1 na inzulíne je kovalentne naviazaných na PEG.

Prekvapujúco sa zistilo, že náhodné zmesi konjugátov PEG a inzulínu (pripravených skôr náhodne ako cieľenou pegyláciou), ak sa podajú do pľúc, vedú k zvýšenej hladine inzulínu v krvi, ktorá pretrvá aspoň 6 hodín a typickejšie aspoň 8 hodín alebo viac po podaní. Takéto zmesi sú výhodné nielen pre ich vhodné farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti, ale aj preto, lebo ich syntéza je oveľa jednoduchšia (nevyžaduje viac syntetizačných krokov, nevyžaduje použitie ochranných skupín, nevyžaduje opakované čistiace kroky, atď.) ako zodpovedajúci cieľený prístup.

Alternatívne miesta v molekule natívneho inzulínu, ktoré možno chemicky modifikovať kovalentným naviazaním PEG zahŕňajú oba C-konce, Arg22B, His10B, His5A, Glu4A, Glu17A, Glu13B a Glu21B.

Okrem natívneho inzulínu možno použiť aj nenatívne inzulíny, v ktorých je jedna alebo viaceré aminokyselinové substitúcie, inzercie alebo delécie, aby sa pre chemické modifikácie naviazaním jednej alebo viacerých PEG častí získali ďalšie miesta. Toto uskutočnenie vynálezu je osobitne užitočné na zavedenie ďalších prispôbených pegylačných miest v rámci molekuly inzulínu, napríklad na vytvorenie konjugátu PEG a inzulínu, ktorý má lepšiu rezistenciu voči enzymatickej degradácii. Takýto prístup poskytuje väčšiu flexibilitu pri plánovaní optimalizovaného inzulínového konjugátu s požadovanou aktivitou, stabilitou, solubilitou a farmakologickými vlastnosťami. Hoci je možné vykonať mutácie, napríklad cielenou mutagenézou v ľubovoľnom počte pozícií na molekule inzulínu, výhodný je taký variant inzulínu, v ktorom ktorýkoľvek z prvých štyroch aminokyselín v reťazci B je nahradený cysteínovým zvyškom. Takéto cysteínové zvyšky môžu potom reagovať s aktivovaným polyetylén glykolom, ktorý je špecifický pre reakciu s tiolovými skupinami, napríklad *N*-maleimidový polymér alebo iný derivát podľa opisu v US patente č. 5,739,208 a v medzinárodnej patentovej prihláške č. WO 01/62827. Príkladné sulfhydryl-selektívne polyetylén glykoly na použitie v tomto osobitnom uskutočnení podľa vynálezu zahŕňajú mPEG-rozvetvený maleinid (mPEG(MAL)₂), mPEG2-rozvetvený maleimid (mPEG2(MAL)₂), mPEG-maleimid (mPEG-MAL) a mPEG2-maleimid (mPEG2-MAL) (Shearwater Corporation). Štruktúra týchto aktivovaných polyetylén glykolov je nasledovná: mPEG-CONH-CH[CH₂CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂-MAL], mPEG2-lyzín-NH-CH[CH₂CONH-(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂-MAL]₂, mPEG-MAL a mPEG2-lyzín-NH-CH₂CH₂NH-C(O)CH₂CH₂MAL.

V prípade potreby možno použiť ďalšie mutácie v sekvencii natívneho inzulínu, aby sa zvýšila biologická aktivita konjugátu PEG a inzulínu, ktorého biologická aktivita je v dôsledku pegylácie trochu znížená. Jednou takouto mutáciou je Thr8 namiesto His8. Ďalšie mutácie možno nájsť napríklad v Diabetes Care, 13(9), (1990), ktorého obsah sa týmto referenčne začleňuje.

Polyetylénglykoly na použitie podľa vynálezu môžu mať mnoho rôznych štruktúr: lineárnu, vidlicovo vetvenú, rozvetvenú, činkovitú, a podobne. PEG sa typicky aktivuje vhodnou aktivujúcou skupinou primeranou na naviazanie požadovaného miesta alebo miest na molekulu inzulínu. Aktivovaný PEG má reaktívnu skupinu na konci na reakciu s inzulínom. Výraz „linker“, tak ako sa používa vo vynáleze, zahŕňa aktivujúcu skupinu umiestnenú na konci PEG na reakciu s inzulínom a môže ďalej zahŕňať aj ďalšie (typicky inertné) atómy umiestnené medzi polyetylénglykolovou časťou polyméru a aktivovanou skupinou na konci kvôli ľahšej príprave aktivovaného PEG. Linkery môžu obsahovať akýkoľvek počet atómov, avšak výhodné sú také linkery, ktoré obsahujú metylény vsunuté medzi hlavný reťazec PEG a koncovú aktivujúcu skupinu, napríklad ako v mPEG-sukcínimidylpropionáte a mPEG-butanoáte. V tejto oblasti sú známe reprezentatívne aktivované deriváty PEG a spôsoby na konjugáciu týchto prostriedkov s liečivom, napríklad s inzulínom, a sú ďalej opísané v práci autorov S. Zalipsky a spol., „Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides“, v *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J.M. Harris, Plenum Press, New York (1992), a v *Advanced Drug Reviews*, 16:157-182 (1995).

V jednom osobitnom uskutočnení vynálezu v PEG časti konjugátu nie je prítomná jedna alebo viaceré lipofilné skupiny, ktoré dokážu výrazne modifikovať rozpustnosť polyméru alebo konjugátu polyméru a inzulínu vo vode. To znamená, že polymér alebo neinzulínová časť konjugátu podľa vynálezu môže obsahovať skupinu atómov, o ktorých sa predpokladá, že sú viac lipofilné ako hydrofilné (napríklad uhlíkový reťazec obsahujúci približne 2 až 8 až 12 atómov uhlíka), avšak ak prítomnosť takejto skupiny alebo skupín nie je dostačujúca na výraznú zmenu hydrofilnej povahy polyméru alebo konjugátu, potom takáto časť môže byť obsiahnutá v konjugátoch podľa vynálezu. To znamená, že samotný inzulínový konjugát podľa vynálezu je skôr hydrofilný ako lipofilný alebo amfifilný. Polymérová časť konjugátu inzulínu pred naviazaním na inzulín, buď obsahujúci alebo neobsahujúci takúto lipofilnú skupinu, má typicky vysoké číslo hydrofilnej/lipofilnej rovnováhy (HLB). Číslo HLB sa zakladá na hmotnostných percentách každého typu skupiny (hydrofilnej alebo lipofilnej) v molekule; hodnoty sú typicky približne 1 až 40.

Polymér na použitie v konjugátoch podľa vynálezu sa celkove charakterizuje ako hydrofilný, bez ohľadu na prítomnosť jedného alebo viacerých lipofilných substituentov. V jednom uskutočnení podľa vynálezu polymérna časť konjugátu sa vyznačuje takým číslom HLB, ktoré je vyššie ako 25 a výhodnejšie vyššie ako 30, alebo ešte výhodnejšie vyššie ako 35. V určitých uskutočneniach vynálezu, v ktorých takáto lipofilná časť môže byť prítomná, táto časť sa výhodne nenachádza na konci PEG reťazca.

Rozvetvené polyetylén glykoly na použitie v konjugátoch podľa vynálezu zahŕňajú tie polyetylén glykoly, ktoré sú opísané v medzinárodnej patentovej prihláške WO 96/21469, obsah ktorej sa tu v celom rozsahu referenčne začleňuje. Všeobecne, rozvetvené polyetylén glykoly môžu byť vyjadrené vzorcom $R(\text{PEG-OH})_n$, kde R znamená centrálné „jadro“ molekuly a n znamená počet vetiev. Rozvetvené polyetylén glykoly majú centrálné jadro, z ktorého sú vysunuté 2 alebo viaceré „PEG“ vetvy. V rozvetvenej konfigurácii rozvetvené polymérové jadro má jedno reaktívne miesto na naviazanie na inzulín. Rozvetvené polyetylén glykoly na použitie podľa vynálezu typicky zahŕňajú menej ako 4 PEG vetvy, a výhodnejšie zahŕňajú menej ako 3 PEG vetvy. Rozvetvené polyetylén glykoly ponúkajú výhodu, že majú jedno reaktívne miesto naviazané na väčší, hustejší polymérový oblak ako ich lineárne PEG náprotivky. Jeden osobitný typ rozvetveného PEG môže byť vyjadrený ako $(\text{MeO-PEG-})_p\text{R-X}$, kde p znamená 2 alebo 3, R znamená štruktúru centrálného jadra, napríklad lyzín alebo glycerol, ktorý má 2 alebo 3 naviazané PEG vetvy, a X znamená akúkoľvek vhodnú funkčnú skupinu, ktorá je alebo ktorú možno aktivovať na naviazanie na inzulín. Jeden osobitne výhodný rozvetvený PEG je mPEG2-NHS (Shearwater Corporation, Alabama), ktorého štruktúra je mPEG2-lyzín-sukcínimid.

V ďalšej rozvetvenej štruktúre „pendantný PEG“ má reaktívne skupiny na naviazanie proteínov, ktoré sú umiestnené skôr pozdĺž hlavného reťazca PEG ako na konci PEG reťazcov, tak ako v predchádzajúcom príklade. Reaktívne skupiny vysunuté z hlavného PEG reťazca na naviazanie na inzulín môžu byť rovnaké alebo rôzne. Pendantné PEG štruktúry môžu byť užitočné, avšak sú všeobecne menej výhodné, osobitne na prípravky na inhalovanie.

Alternatívne, polyetylénglykolová časť konjugátu PEG a inzulínu môže mať vidlicovito vetvenú štruktúru, ktorá má rozvetvenú časť na jednom konci polymérového reťazca a dve voľné reaktívne skupiny (alebo akýkoľvek násobok dvoch) naviazané na rozvetvenú časť na pripojenie k inzulínu. Príkladné vidlicovito vetvené polyetylénglykoly sú opísané v medzinárodnej patentovej prihláške číslo WO 99/45964, obsah ktorej sa tu referenčne začleňuje. Vidlicovito vetvený polyetylénglykol môže na opačnom konci polymérového reťazca voliteľne zahŕňať alkyl alebo „R“ skupinu. Špecifickejšie, vidlicovito vetvený konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu má nasledujúci vzorec: R-PEG-L(Y-inzulín)_n, kde R znamená alkyl, L znamená hydrolyticky stabilný bod na vetve a Y znamená spojovaciu skupinu, ktorá poskytuje chemické naviazanie vidlicovito vetveného polyméru na inzulín, a_n znamená násobok dvoch. L môže znamenať jednu „jadrovú“ skupinu, napríklad „-CH-“, alebo môže zahŕňať dlhší reťazec atómov. Príkladné L skupiny zahŕňajú lyzín, glycerol, pentaerytritol alebo sorbitol. Osobitný atóm vetvy v rozvetvenej časti je typicky uhlík.

V jednom osobitnom uskutočnení vynálezu naviazanie vidlicovito vetveného PEG na molekulu inzulínu, (Y), je hydrolyticky stabilné. Vo výhodnom uskutočnení n znamená 2. Vhodné Y časti pred konjugáciou s reaktívnym miestom na inzulíne zahŕňajú, avšak neobmedzujú sa na aktívne estery, aktívne karbonáty, aldehydy, izokyanáty, izotiokyanáty, epoxidy, alkoholy, maleimidy, vinylsulfóny, hydrazidy, ditiopyridíny a jódacetamidy. Výber vhodnej aktivujúcej skupiny závisí od plánovaného miesta naviazania na molekule inzulínu a odborník v danej oblasti techniky ju môže ľahko určiť. Zodpovedajúca Y skupina vo výslednom konjugáte PEG a inzulínu je taká, ktorá je výsledkom reakcie aktivovaného vidlicovito vetveného polyméru s vhodným reakčným miestom na inzulíne. Špecifická identita takejto konečnej väzby je pre osobu oboznámenú s problematikou zrejmá. Napríklad ak reakčný vidlicovito vetvený PEG obsahuje aktivovaný ester, napríklad sukcinimid alebo maleimid ester, konjugácia prostredníctvom amino miesta na inzulíne vedie k vytvoreniu zodpovedajúcej amido väzby. Tieto osobitné vidlicovito vetvené polyméry sú osobitne výhodné, pretože poskytujú konjugáty, ktorých mólový pomer inzulínu k PEG je 2:1 alebo vyšší. Je pravdepodobné, že takéto konjugáty budú blokovať miesto inzulínového receptora, pričom budú stále

poskytovať flexibilnú štruktúru na ochranu inzulínu voči enzymatickej degradácii, napríklad enzýmom degradujúcim inzulín.

V podobnom uskutočnení vidlicovito vetvený konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu má nasledujúci vzorec: $R-[PEG-L(Y-inzulín_2)]_n$. V tomto prípade R znamená centrálnu jadrovú štruktúru, na ktorú je naviazaný aspoň jeden konjugát PEG a inzulínu. Špecificky, výhodné vidlicovito vetvené polyméry podľa tohto aspektu vynálezu sú tie, kde n sa volí zo skupiny pozostávajúcej z 1, 2, 3, 4, 5 a 6. Príkladné jadrové R štruktúry možno tiež odvodiť z lyzínu, glycerolu, pentaerytritolu alebo sorbitolu.

V alternatívnom uskutočnení v ktorejkoľvek reprezentatívnej štruktúre poskytovanej podľa vynálezu chemická väzba medzi inzulínom a vetvou polyméru môže byť degradovateľná (t.j. hydrolyticky nestabilná). Alternatívne, hlavný reťazec polyméru môže obsahovať jednu alebo viaceré degradovateľné väzby, aby sa umožnilo *in vivo* generovanie konjugátu PEG a inzulínu, ktorý má menší PEG reťazec ako pôvodne podávaný konjugát. Takéto voliteľné vlastnosti polymérového konjugátu môžu po podaní poskytovať ďalšiu kontrolu výsledných požadovaných farmakologických vlastností konjugátu. Napríklad možno podať veľký a pomerne inertný konjugát (t.j. taký, ktorý obsahuje jeden alebo viaceré naviazané PEG reťazce s molekulovou hmotnosťou vyššou ako približne 10000, kde konjugát nemá v podstate nijakú biologickú aktivitu), ktorý sa potom hydrolyzuje buď v pľúcach alebo v krvnom obehú a generuje sa biologicky aktívny konjugát, ktorý má časť, ktorá bola pôvodne prítomná v PEG reťazci. Takýmto spôsobom možno vlastnosti konjugátu PEG a inzulínu prispôbiť trochu účinnejšie. Napríklad absorpcia pôvodného polymérového konjugátu môže byť pomalá po podaní, ktoré môže byť, avšak nie nevyhnutne, inhaláciou. Po *in vivo* štiepení hydrolyticky degradovateľnej väzby sa uvoľní buď voľný inzulín (v závislosti od polohy degradovateľnej väzby) alebo inzulín s malou naviazanou polyetylénovou značkou a ľahšie sa absorbuje cez pľúca a/alebo sa pohybuje v krvnom obehú.

V jednej vlastnosti tohto uskutočnenia podľa vynálezu konjugát intaktného polyméru sa pred hydrolýzou po podaní degraduje iba minimálne, takže hydrolýza štiepateľnej väzby stačí na usmernenie pomalého uvoľňovania aktívneho inzulínu

do krvného obehu, na rozdiel od enzymatickej degradácie inzulínu pred jeho uvoľnením do systémového obehu.

Primerané fyziologicky štiepatelné väzby zahŕňajú, avšak neobmedzujú sa na ester, karbonátester, karbamát, sulfát, fosfát, acyloxyalkyléter, acetál a ketál. Takéto konjugáty by mali mať fyziologicky štiepatelnú väzbu, ktorá je počas skladovania a po podaní stabilná. Napríklad konjugát PEG-štiepatelná väzba-inzulín by mal zachovať svoju integritu po výrobe konečného farmaceutického prípravku, po rozpustení v primeranom nosiči, ak sa použije, a po podaní bez ohľadu na spôsob podania.

Osobitnejšie, podľa všeobecného opisu vyššie, konjugáty PEG a inzulínu obsahujúce biologicky degradovateľné väzby a užitočné podľa vynálezu majú nasledovné štruktúry: PEG1-W-PEG2-inzulín (kde PEG1 a PEG2 môžu byť rovnaké alebo rôzne, alebo PEG-W-inzulín, kde W znamená slabú, biologicky degradovateľnú väzbu. Konjugáty obsahujú PEG vetvy alebo časti PEG vetví, ktoré sa dajú *in vivo* odstrániť (t.j. sú štiepatelné). Tieto osobitne modifikované inzulíny sú typicky v intaktnom stave do značnej miery biologicky neaktívne, buď kvôli veľkosti intaktnej PEG časti molekuly, alebo kvôli sterickéj blokáde aktívnych miest na molekule inzulínu reťazcom PEG. Takéto konjugáty sa však štiepia vo fyziologických podmienkach, čím sa uvoľní inzulín alebo biologicky aktívny konjugát PEG a inzulínu, ktorý je schopný absorbovať sa do systémového krvného obehu, napríklad z pľúc. V prvej štruktúre uvádzanej ako príklad časť PEG1 môže mať ktorúkoľvek z mnohých rôznych architektúr diskutovaných vo vynáleze, a typicky má molekulovú hmotnosť aspoň 10000, takže konjugát sa po podaní neabsorbuje rýchlo. PEG2 časť molekuly má výhodne molekulovú hmotnosť nižšiu ako približne 5000 daltonov, výhodnejšie nižšiu ako 1000 daltonov. Vzhľadom na sekundárnu štruktúru uvádzanú ako príklad, PEG-W-inzulín, PEG časť všeobecne má molekulovú hmotnosť aspoň 10000 daltonov alebo viac.

V ďalšom špecifickom uskutočnení vynálezu konjugát PEG a inzulínu má činkovitú štruktúru, v ktorej dve inzulínové časti sú vzájomne spojené centrálnym polyetylén glykolom. Špecifickejšie, takéto konjugáty môžu mať štruktúru inzulín-Y-PEG-Z-inzulín, kde Y a Z znamenajú hydrolyticky stabilné väzobné skupiny, ktoré viažu inzulín k PEG časti. V osobitnom uskutočnení Z znamená aktivovaný sulfón,

ktorý je pred konjugáciou vhodný na reakciu s tiolovými skupinami na inzulíne (napríklad s cysteínmi). Alternatívne, Y a Z môžu znamenať akúkoľvek skupinu vhodnú na kovalentné naviazanie s inzulínom. Ďalšie príklady sú uvedené v US patente číslo 5,900,461, obsah ktorého je tu referenčne začlenený.

Ďalšie reprezentatívne mono- a difunkčné polyetylénglykoly, ktoré majú buď lineárnu alebo rozvetvenú štruktúru na použitie na prípravu konjugátov podľa vynálezu, si možno kúpiť od firmy Shearwater Corporation (Alabama). Ilustračné štruktúry sú opísané v katalógu firmy Shearwater za rok 2001 "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications", obsah ktorého sa tu referenčne začleňuje.

B. Príprava

Reakčné podmienky na naviazanie PEG na inzulín sú rôzne, v závislosti od daného použitého derivátu PEG, miesta naviazania na inzulín a osobitného typu reakčnej skupiny (t.j. lyzínu oproti cysteínu), požadovaného stupňa pegylácie, a podobne, a odborník v danej oblasti techniky ich môže ľahko určiť.

Ako je uvedené nižšie podrobne, syntéza konjugátov podľa vynálezu môže byť cielená podľa miesta (príklady 1, 2 a 4) alebo môže byť náhodná (príklad 3). Vhodné PEG aktivujúce skupiny na reakciu s amínovými skupinami inzulínu (napríklad GlyA1, PheB1, Lys29B) sú tresilát, aldehyd, epoxid, karbonylimidazol, aktívne karbonáty (napríklad sukcinimidylkarbonát), acetál a aktívne estery, napríklad *N*-hydroxylsukcinimid (NHS) a polyetylénglykoly odvodené prostredníctvom NHS. Z nich najreaktívnejšie sú PEG karboxymetyl-NHS, norleucín-NHS a sukcinimidylkarbonát. Ďalšie PEG prostriedky na naviazanie na inzulín zahŕňajú PEG sukcinimidylsukcinát a propionát. PEG aktívne estery vhodné na použitie podľa vynálezu, napríklad tie, ktoré majú jednu časť kyseliny propánovej alebo butánovej, sú opísané v US patente číslo 5,672,662, obsah ktorého sa tu v celom rozsahu začleňuje. Špecifické aktívne estery na použitie na prípravu konjugátov podľa vynálezu zahŕňajú mPEG-sukcinimidylpropionát a mPEG-sukcinimidylbutanoát (príklady 1 až 4).

Optimalizované experimentálne podmienky pre špecifický konjugát môže odborník v danej oblasti techniky ľahko určiť, typicky rutinným experimentovaním.

Reaktívne skupiny vhodné na aktiváciu PEG polyméru na naviazanie na tiolovú (sulfhydrylovú) skupinu na inzulíne zahŕňajú vinylsulfóny, jódacetamid, maleimid a ditioortopyridín. Osobitne výhodné reagenty zahŕňajú PEG-vinylsulfóny a PEG-maleimid. Ďalšie reprezentatívne vinylsulfóny na použitie podľa vynálezu sú opísané v US patente číslo 5,739,208, obsah ktorého sa tu referenčne začleňuje.

V niektorých prípadoch prípravky podľa vynálezu zahŕňajú selektívne pegylovaný inzulín, t.j. výsledné konjugáty sú značne homogénne ohľadne polohy a stupňa pegylácie. To znamená, že pegylácia aminoskupiny selektívna vo vzťahu k miestu vedie k prípravku s inzulínovým konjugátom, kde naviazanú PEG časť má hlavne plánované miesto pegylácie, napríklad PheB1. V závislosti od plánovaného miesta pegylácie môže byť potrebná syntetická stratégia ochrany alebo odstránenia ochrany, aby sa zabránilo pegylácii necieľových reaktívnych miest v rámci molekuly inzulínu, napríklad použitím ochrannej skupiny, napríklad *tert*-BOC (*tert*-butoxykarbonyl) alebo di-BOC (di-butoxykarbonyl). Iné vhodné amino-ochranné skupiny zahŕňajú karbobenzoxy (CBZ), tritylové deriváty, napríklad trityl (Tr), dimetoxytrityl (DMTr) a podobne. Iné ochranné skupiny, napríklad cyklické diacylové skupiny alebo nitrofenylsulfenyl (Nps) môžu byť tiež užitočné na ochranu amino-funkcií. Príkladná cielená syntéza prípravku obsahujúceho 5K-PEG-inzulín sa poskytuje v príklade 1 a 2.

Takéto cielené naviazanie použité na poskytnutie inzulínových konjugátov podľa vynálezu vedie k prípravkom, ktoré sa vyznačujú vysokým stupňom substitúcie na osobitnom reaktívnom mieste na molekule inzulínu. Tieto prípravky možno potom v prípade potreby ďalej čistiť a poskytnúť prípravky obsahujúce značne čisté mono- alebo difunkčné PEG inzulíny.

Značne čistý prípravok obsahujúci PEG inzulín je taký prípravok, ktorý obsahuje konjugát PEG a inzulínu s čistotou aspoň 90 %, a výhodne aspoň 95 % podľa ktoréhokoľvek z nasledujúcich analytických spôsobov. Z tohto hľadiska sa čistota vzťahuje na obsah konjugátu PEG a inzulínu. To znamená, že konjugát PEG a inzulínu s čistotou aspoň 90 % obsahuje aspoň 90 % hmotnostných konjugátov PEG a inzulínu, a zvyšných takmer 10 % znamená nečistoty, ktoré nie sú konjugát PEG a inzulínu. Konjugáty PEG a inzulínu podľa vynálezu sa typicky čistia s použitím jedného alebo viacerých čistiacich spôsobov, napríklad iónovo-

výmennou chromatografiou, size exclusion chromatografiou, afinitnou chromatografiou, hydrofóbnou interakčnou chromatografiou a chromatografiou s reverznou fázou. Celkovú homogenitu výsledného PEG inzulínu (počet prítomných foriem PEG a inzulínu) možno stanoviť pomocou jednej alebo viacerých z nasledujúcich spôsobov: chromatograficky, elektroforézou, hmotnostnou spektrometriou a osobitne MALDI-MS, a NMR spektroskopiou. Jeden osobitne užitočný spôsob na identifikovanie miest modifikácie inzulínu je RP-HPLC mapovanie peptidov spojené s testom identity USP pre ľudský inzulín s použitím endoproteinázy Glu-C (príklad 6).

C. Charakteristika konjugátov PEG a inzulínu

Podľa jedného aspektu vynálezu sa poskytujú prípravky obsahujúce PEG a inzulín, ktoré sú vhodné na pľúcne podávanie. Podľa *in vivo* údajov v príkladoch 7 až 11, konjugáty PEG a inzulínu podľa vynálezu po podaní do pľúc majú lepšie farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti ako natívny inzulín. Ukázalo sa, že inzulín možno modifikovať polyetylén glykolmi s molekulovou hmotnosťou až 5000 K až 10000 K alebo viac a stále si uchovávajú aktivitu. Aktivita reprezentatívneho konjugátu PEG a inzulínu, 5K-PEG-inzulín, je ukázaná v príklade 7. Okrem toho, ako vidieť z príkladov poskytovaných podľa vynálezu, príkladné konjugáty PEG a inzulínu, ktoré majú PE reťazce s priemernou molekulovou hmotnosťou medzi 750 daltonov až 2000 daltonov až 5000 daltonov, keď sa podávajú intravenózne a do pľúc, nie sú veľmi zadržované v pľúcach, ak sa podávajú do pľúc, ako sa dokázalo podľa sérových koncentrácií inzulínu, a sú efektívne pri značnom potlačení glukózy (príklady 7 až 11), ktorá v určitých prípadoch trvá výrazne dlhšie ako v prípade natívneho inzulínu. Okrem toho vynález poskytuje konjugáty Peg a inzulínu, ktoré, ak sa podávajú do pľúc, vykazujú rýchly nástup účinku (do 1 hodiny po podaní). Súhrn farmakokinetických a farmakodynamických parametrov príkladných prípravkov PEG a inzulínu podľa vynálezu je poskytnutý v tabuľke 13.

Všeobecne, prípravok PEG a inzulínu podľa vynálezu sa vyznačuje jednou alebo viacerými z nasledujúcich vlastností. Konjugáty PEG a inzulínu podľa vynálezu si uchovávajú aspoň merateľnú mieru špecifickej aktivity. To znamená, že konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu má špecifickú aktivitu približne medzi 2 %

až približne 100 % alebo viac v porovnaní so špecifickou aktivitou natívneho inzulínu. V jednom výhodnom uskutočnení vynálezu konjugát PEG a inzulínu má aspoň 10 % alebo viac biologickej aktivity v porovnaní s nemodifikovaným, natívnym inzulínom, a je v podstate neimunogénny. Biologická aktivita konjugátu podľa vynálezu je výhodne približne 5 % až aspoň približne 20 % alebo viac biologickej aktivity natívneho inzulínu. Biologická aktivita konjugátu podľa vynálezu sa môže charakterizovať nepriamo, napríklad kontrolovaním glukózy v krvi a hladín inzulínu na vygenerovanie zodpovedajúcich farmakodynamických a/alebo farmakokinetických údajov, alebo rádioimunoanalytickým testom (RIA).

Pri braní sérových koncentrácií inzulínu do úvahy po podaní konjugátu PEG a inzulínu napríklad do pľúc, konjugáty opisované podľa vynálezu majú typický vrchol (napríklad dosahujú C_{max} alebo najvyšší bod v koncentračnej krivke) približne 2 až 8 hodín po podaní dávky, a typickejšie majú vrchol približne 3 až 6 hodín a podobne. Okrem toho chemicky modifikované inzulíny podľa vynálezu, a osobitne predĺžený účinok inzulínových prípravkov poskytovaných podľa vynálezu sú účinné na poskytnutie merateľného účinku znižujúceho glukózu a udržateľných koncentrácií inzulínu počas dlhšieho obdobia v porovnaní s natívnym inzulínom. Špecifickejšie, konjugát PEG a inzulínu po podaní do pľúc má zvýšené hladiny inzulínu (zvýšené v porovnaní s bazálnou alebo základnou hladinou) aspoň približne ešte 6 hodín a výhodne aspoň ešte 8 hodín po podaní. Výhodne, konjugát PEG a inzulínu po podaní do pľúc vedie k zvýšenej krvnej hladine inzulínu počas predĺženého obdobia aspoň 9 hodín, 10 hodín, 12 hodín alebo aspoň 14 hodín po podaní, kedy sa dajú zistiť vyššie ako základné koncentrácie inzulínového konjugátu v krvnom obehú počas takéhoto predĺženého času po podaní. V príkladoch sa poskytujú reprezentatívne prípravky s takýmito vlastnosťami.

Podľa opisu vyššie inzulínový konjugát podľa vynálezu je účinný na znižovanie hladiny glukózy v krvi. Čo sa týka schopnosti prípravkov podľa vynálezu potláčať koncentráciu krvnej glukózy, konjugát PEG a inzulínu, ak sa podá napríklad do pľúc, je účinný pri potláčaní hladín glukózy v krvi pod bazálnu hladinu aspoň 6 hodín po podaní. Osobitnejšie, prípravok PEG a inzulínu podľa vynálezu je účinný pri potláčaní hladín glukózy v krvi pod základnú koncentráciu aspoň počas 8 hodín,

výhodne aspoň počas 10 hodín, alebo výhodnejšie aspoň 12 hodín alebo viac po podaní.

Okrem toho, prípravky PEG a inzulínu podľa vynálezu majú takú absolútnu pľúcnu biologickú dostupnosť, ktorá je lepšia v porovnaní s natívnym inzulínom. Špecificky, prípravok PEG a inzulínu podľa vynálezu má takú absolútnu pľúcnu biologickú dostupnosť, ktorá je aspoň 1,2-krát vyššia ako je absolútna pľúcna biologická dostupnosť natívneho inzulínu, výhodne aspoň 1,5-krát vyššia v porovnaní s natívnym inzulínom, výhodnejšie aspoň 2-krát vyššia alebo ešte vyššia, alebo ešte výhodnejšie aspoň 2,5- alebo 3-krát vyššia v porovnaní s natívnym inzulínom. (Ilustrujúce výsledky sú poskytnuté v tabuľke 13.)

III. Prípravky

Prípravky obsahujúce konjugát polyméru a inzulínu podľa vynálezu možno podávať v čistej forme alebo v terapeutických/farmaceutických prípravkoch obsahujúcich ďalšie excipienty, rozpúšťadlá, stabilizátory, atď., podľa osobitného spôsobu podania a dávkovacej formy. Konjugáty podľa vynálezu možno podávať parenterálne aj neparenterálne. Špecifické spôsoby podania zahŕňajú orálne, rektálne, bukálne, topické, nazálne, oftalmické, subkutánne, intramuskulárne, intravenózne, transdermálne a pulmonárne podanie. Najvýhodnejšie spôsoby sú parenterálne a pulmonárne podanie.

Farmaceutické prípravky pre cicavčie a výhodne ľudské podanie typicky zahŕňajú aspoň jeden konjugát PEG a inzulínu podľa vynálezu spolu s jedným alebo s viacerými farmaceuticky prijateľnými nosičmi podľa podrobnejšieho opisu nižšie, osobitne pre pulmonárne prípravky. Prípravky podľa vynálezu, napríklad na parenterálne podanie, sú najtypickejšie tekuté roztoky alebo suspenzie, kým inhalovateľné prípravky na pľúcne podávanie sú všeobecne tekutiny alebo prášky, pričom práškové prípravky sú všeobecne výhodné. Ďalšie, hoci menej výhodné prípravky chemicky modifikovaných inzulínov podľa vynálezu zahŕňajú sirupy, krémy, masti, tablety, a podobne.

Prípravky a zodpovedajúce dávky inzulínu sa líšia v závislosti od koncentrácie biologickej aktivity použitého inzulínu. Injikovateľný inzulín sa meria v USP inzulínových jednotkách a v USP inzulínových ľudských jednotkách (U);

jedna jednotka inzulínu sa rovná množstvu, ktoré je potrebné na zníženie koncentrácie krvnej glukózy u hladujúceho králika na 45 mg/dl (2,5mM). Typické koncentrácie inzulínových prípravkov na injekciu sú v rozsahu 30 až 100 jednotiek/ml, čo znamená približne 3,6 mg inzulínu na jeden mililiter. Množstvo inzulínu potrebné na dosiahnutie požadovaného fyziologického účinku u pacienta sa mení v závislosti nielen od údajov pacienta a jeho choroby (napríklad diabetes typu I oproti typu II), ale aj od sily a od daného typu použitého inzulínu. Napríklad rozsah dávkovania regulárneho inzulínu (s rýchlym účinkom) je približne 2 až 0,3 U inzulínu na kilogram telesnej hmotnosti denne. Prípravky podľa vynálezu sú v jednom aspekte účinné na dosiahnutie koncentrácie glukózy v krvi 90 až 140 mg/dl u hladujúcich pacientov dostávajúcej terapiu, a postprandiálnu hodnotu nižšiu ako približne 250 mg/dl. Odborník v danej oblasti techniky ľahko určí presné dávkovanie v súvislosti s farmakodynamikou a farmakokinetikou presného inzulínového konjugátu použitého na daný spôsob podávania, a dá sa ľahko nastaviť podľa periodického sledovania hladiny glukózy.

Jednotlivé dávkovania (na báze inhalácie) inhalovateľných prípravkov inzulínového konjugátu sú typicky v rozsahu medzi 0,5 mg až 15 mg inzulínového konjugátu, kde požadované celkové dávkovanie sa typicky dosiahne v 1 až 10 vdýchnutiach a výhodne v 1 až 4 vdýchnutiach. Priemerne sa celková dávka PEG-inzulínu podaného inhaláciou v jednom podaní sa pohybuje približne medzi 10 U až približne 400 U, pričom každé jednotlivé dávkovanie alebo jednotkové dávkovanie znamená (zodpovedajúc jednému podaniu inhaláciou) približne 5 U až 400 U.

A. Inhalovateľné prípravky chemicky modifikovaného inzulínu

Podľa opisu vyššie, jedna z výhodných spôsobov podávania konjugátu inzulínu podľa vynálezu je inhalácia do pľúc. Osobitné komponenty prípravku, charakteristiky a prostriedky na podávanie sú nižšie podrobne opísané.

Množstvo inzulínového konjugátu v prípravku znamená množstvo potrebné na podanie terapeuticky účinného množstva inzulínu na jednotkovú dávku na dosiahnutie aspoň jedného z terapeutických účinkov natívneho inzulínu, t.j. schopnosti kontrolovať hladiny krvnej glukózy takmer na úroveň normoglykémie. V praxi je toto množstvo veľmi rôzne v závislosti od daného inzulínového konjugátu,

jeho aktivity, závažnosti liečeného diabetického stavu, populácie pacientov, stability prípravku, a podobne. Prípravok všeobecne obsahuje približne 1 % hmotnostných až približne 99 % hmotnostných PEG-inzulínu, typicky približne 2 % až približne 95 % hmotnostných konjugátu, a typickejšie približne 5 % až 85 % hmotnostných konjugátu, a závisí aj od relatívneho množstva excipientov/prísad obsiahnutých v prípravku. Špecifickejšie, prípravok typicky obsahuje aspoň približne jedno z nasledujúcich percent PEG-inzulínu: 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % alebo viac % hmotnostných. Práškové prípravky výhodne obsahujú aspoň 60 %, napríklad približne 60 až 100 % hmotnostných PEG-inzulínu. Treba mať na pamäti, že do prípravkov opísaných podľa vynálezu sa môže inkorporovať viac ako jeden inzulín a že použitie výrazu „látka“ alebo „inzulín“ nijakým spôsobom nevylučuje použitie dvoch alebo viacerých inzulínov alebo kombináciu inzulínu s inou účinnou látkou. (Napríklad ilustrujúci prípravok konjugátu obsahujúceho PEG a inzulín môže zahŕňať aj natívny inzulín.)

A.1. Excipienty

Prípravky podľa vynálezu vo väčšine prípadov zahŕňajú jeden alebo viaceré excipienty. Výhodné sú sacharidové excipienty, buď samostatne alebo v kombinácii s inými excipientami alebo prísadami. Reprezentatívne sacharidy na použitie v prípravkoch podľa vynálezu zahŕňajú cukry, deriváty cukrov, napríklad alditoly, aldónové kyseliny, esterifikované cukry a polyméry cukrov. Príkladné sacharidové excipienty vhodné na použitie podľa vynálezu zahŕňajú napríklad monosacharidy ako je napríklad fruktóza, maltóza, galaktóza, glukóza, D-manóza, sorbóza, a podobne; monosacharidy ako je napríklad laktóza, sacharóza, trehalóza, celobióza, a podobne; polysacharidy ako je napríklad rafinóza, melezitóza, malto-dextríny, dextrány, škroby a podobne; a alditoly ako je napríklad manitol, xylitol, maltitol, laktitol, xylitol, sorbitol (glucitol), pyranozylsorbitol, myoinozitol a podobne. Výhodné sú neredukujúce cukry, cukry, ktoré sú schopné tvoriť značne suchú amorfnú alebo sklovitú fázu v kombinácii s inzulínovým konjugátom, a cukry s relatívne vysokou T_{gs} (napríklad T_{gs} vyššou ako 40 °C, výhodne vyššou ako 50 °C, výhodnejšie vyššou ako 60 °C, a ešte výhodnejšou ako 70 °C, a najvýhodnejšie s T_{gs} vyššou ako 80 °C a viac).

Ďalšie excipienty zahŕňajú aminokyseliny, peptidy a osobitne oligoméry zahŕňajúce 2 až 9 aminokyselín, a výhodnejšie di- až pentaméry, a polypeptidy, z ktorých všetky môžu byť rovnaké alebo rôzne. Reprezentatívne aminokyseliny zahŕňajú glycín (gly), alanín (ala), valín (val), leucín (leu), izoleucín (ile), metionín (met), prolín (pro), fenylalanín (phe), tryptofán (trp), serín (ser), treonín (thr), cysteín (cys), tyrozín (tyr), asparagín (asp), kyselina glutámová (glu), lyzín (lys), arginín (arg), histidín (his), norleucín (nor) a ich modifikované formy. Osobitne výhodná aminokyselina je leucín.

Výhodné excipienty na použitie v inhalovateľných prípravkoch sú di- a tripeptidy obsahujúce dva alebo viaceré leucylové zvyšky podľa opisu v medzinárodnej patentovej prihláške PCT/US00/09785 firmy Inhale Therapeutic Systems, ktorá sa tu referenčne začleňuje v celom rozsahu.

Výhodné sú aj di- a tripeptidy, ktorých teplota prechodu do sklovitosti je vyššia ako približne 40 °C, výhodnejšie vyššia ako 50 °C, ešte výhodnejšie vyššia ako 60 °C a najvýhodnejšie vyššia ako 70 °C.

Hoci pre svoju obmedzenú rozpustnosť vo vode sú menej výhodné, ďalšie peptidy zvyšujúce stabilitu a aerosólové vlastnosti na použitie podľa vynálezu sú tetraméry a pentaméry obsahujúce ľubovoľnú kombináciu aminokyselín podľa opisu vyššie. Výhodnejšie, tetramér alebo pentamér zahŕňa dva alebo viaceré leucínové zvyšky. Leucínové zvyšky môžu byť v akejkolvek polohe peptidu, kým na zostávajúcich (t.j. neleucylových) polohách je akákoľvek aminokyselina opísaná vyššie za predpokladu, že rozpustnosť vo vode výsledného tetraméru alebo pentaméru je aspoň približne 1 mg/ml. Neleucylové aminokyseliny v tetraméri alebo pentaméri sú výhodne hydrofilné aminokyseliny ako je napríklad lyzín, čím sa zvyšuje rozpustnosť peptidu vo vode.

Polyaminokyseliny, a osobitne tie, ktoré zahŕňajú ktorúkoľvek aminokyselinu opísanú podľa vynálezu, sú tiež vhodné na použitie ako stabilizátory. Výhodné sú polyaminokyseliny ako je napríklad polylyzín, kyselina polyglutámová a poly(lys, ala).

Ďalšie excipienty a prísady užitočné v prípravkoch a spôsoboch podľa vynálezu zahŕňajú, avšak sa neobmedzujú iba na proteíny, nebiologické polyméry a biologické polyméry, ktoré môžu byť prítomné samostatne alebo v kombinácii.

Vhodné excipienty sa poskytujú v medzinárodnej patentovej prihláške číslo WO 96/32096 a 98/16205. Výhodné sú excipienty s teplotou prechodu do sklovitosti (T_g) vyššou ako približne 35 °C, výhodne vyššou ako približne 40 °C, ešte výhodnejšie vyššou ako približne 45 °C, najvýhodnejšie vyššou ako 55 °C.

Príkladné proteínové excipienty zahŕňajú albumíny, ako je napríklad ľudský sérový albumín (HAS), rekombinantný ľudský albumín (rHA), želatína, kazeín, hemoglobín, a podobne. Prípravky môžu tiež zahŕňať tlmivý roztok alebo prostriedok na úpravu pH, typicky, avšak nie nevyhnutne, soľ pripravenú z organickej kyseliny alebo zásady. Reprezentatívne tlmivé roztoky zahŕňajú soli organických kyselín, kyseliny askorbové, glukónové, uhličité, vínne, jantárové, octové alebo ftalové. Iné vhodné tlmivé roztoky zahŕňajú Tris, hydrochlorid trometamínu, borát, glycerolfosfát a fosfát. Vhodné sú aj aminokyseliny ako napríklad glycín.

Prípravky podľa vynálezu môžu zahŕňať aj ďalšie polymérne excipienty/prísady, napríklad polyvinylpyrolidóny, deriváty celulózy ako je napríklad hydroxypropylmetylcelulóza, Ficolly (polymérny cukor), hydroxyetylškrob (HES), dextráty (napríklad cyklodextríny ako napríklad 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrín a sulfobutyl-éter- β -cyklodextrín), polyetylén glykoly a pektín.

Prípravky môžu ďalej zahŕňať dochucovadlá, prostriedky na tmenie chuti, anorganické soli (napríklad chlorid sodný), antimikrobiálne prostriedky (napríklad benzalkóniumchlorid), sladidlá, antioxidanty, povrchovo aktívne látky (napríklad polysorbáty, napríklad TWEEN 20 a TWEEN 80, a pluroniká ako sú napríklad F68 a F88 komerčne dostupné od firmy BASF), sorbitanestery, lipidy (napríklad fosfolipidy ako je napríklad lecitín a iné fosfatidylcholíny, fosfatidyletanolamíny, hoci výhodne nie vo forme lipozómov), masné kyseliny a masné estery, steroidy (napríklad cholesterol) a chelačné prostriedky (napríklad EDTA, zinok a iné podobné vhodné kationy). Použitie určitých disubstituovaných fosfatidylcholínov na prípravu perforovaných mikroštruktúr (t.j. dutých, poréznych mikrosfér) sa opisuje podrobnejšie nižšie. Iné farmaceutické excipienty a/alebo prísady vhodné na použitie v prípravkoch podľa vynálezu sú uvedené v práci Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 19. vydanie, Williams & Williams (1995), a v Physician's Desk Reference, 52. vydanie, Medical Economics, Montvale, NJ (1998).

V jednom uskutočnení v prípravku podľa vynálezu môžu chýbať látky podporujúce penetráciu, ktoré môžu zapríčiniť dráždenie a sú toxické vo vysokých koncentráciách často potrebných na poskytnutie značnej podpory absorpcie. Špecifické podporné látky, ktoré môžu byť neprítomné v prípravkoch podľa vynálezu, sú látky podobné detergentom, napríklad deoxycholát, laureth-9, DDPC, glykocholát a fusidáty. Avšak určité podporujúce látky, napríklad tie, ktoré chránia inzulín pred enzymatickou degradáciou, napríklad inhibítory proteáz a peptidáz, ako je napríklad alfa-1 antiproteáza, kaptopril, tienfan a inhibítory proteáz HIV, možno v určitých uskutočneniach vynálezu začleniť do prípravkov PEG-inzulínu podľa vynálezu. V ďalšom uskutočnení konjugáty PEG a inzulínu podľa vynálezu môžu chýbať lipozómy, lipidické matrice a kapsulačné prostriedky.

Všeobecne, farmaceutické prípravky podľa vynálezu obsahujú približne 1 % až približne 99 % hmotnostných excipientu, výhodne približne 5 až 98 % hmotnostných excipientu, výhodnejšie približne 15 až 95 % hmotnostných excipientu. Ešte výhodnejšie, prípravok sušený rozprašovaním obsahuje približne 0 až 50 % hmotnostných excipientu, výhodnejšie 0 až 40 % hmotnostných excipientu. Všeobecne, vysoká inzulínová koncentrácia sa vyžaduje vo finálnom farmaceutickom prípravku. Optimálne množstvo excipientu/prísady sa typicky určuje experimentálne, t.j. prípravou prípravkov obsahujúcich rôzne množstvá excipientov (nízke až vysoké), preskúmaním chemickej a fyzikálnej stability PEG-inzulínu, MMAD a dispergovateľnosti farmaceutických prípravkov, a potom preskúmaním rozsahu, pri ktorom sa dosiahne optimálna účinnosť aerosólu bez výrazných vedľajších účinkov na stabilitu inzulínu.

A.2 Príprava suchých práškov

Prípravky suchých práškov podľa vynálezu zahŕňajúce konjugát s obsahom PEG a inzulínu možno pripraviť ktorýmkoľvek spôsobom na sušenie, výhodne sušením pomocou rozprašovania. Tento spôsob sušenia prípravku sa uskutočňuje napríklad podľa všeobecného opisu v Spray Drying Handbook, 5. vydanie, K. Masters, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1991), a v Platz, R. a spol., medzinárodná patentová prihláška číslo WO 97/41833 (1997) a WO 96/32149 (1996), obsah ktorých sa tu referenčne začleňuje.

Roztoky konjugátov PEG a inzulínu sa sušia rozprašovaním vo vhodnom sprejovom sušiacom zariadení, napríklad v takom, ktoré je komerčne dostupné od dodávateľov, napríklad Niro A/S (Dánsko), Buchi (Švajčiarsko) a podobne, vedúce k dispergovateľnému suchému prášku. Optimálne podmienky na sušenie rozprašovaním roztokov obsahujúcich PEG a inzulín sú rôzne, v závislosti od komponentov prípravku, a všeobecne sa určujú experimentálne. Plyn použitý na rozprašenie materiálu je typicky vzduch, hoci sú vhodné aj inertné plyny ako je napríklad dusík alebo argón. Okrem toho teplota vstupujúceho aj vystupujúceho plynu použitého na usušenie rozprašeného materiálu je taká, že nezapríčiňuje degradáciu PEG-inzulínu v rozprašenom materiáli. Takéto teploty sa typicky určujú experimentálne, hoci všeobecne teplota pri vstupe je približne 50 °C až približne 200 °C a pri výstupe je približne 30 °C až približne 150 °C. Výhodné parametre zahŕňajú atomizačný tlak približne 137,88 kPa až 1034,1 kPa (20 až 150 psi) a výhodne približne 206,82 kPa až 275,76 kPa až 689,4 kPa (30 až 40 až 100 psi). Použitý atomizačný tlak má typicky jednu z nasledujúcich hodnôt: 137,88, 206,82, 275,76, 344,7, 413,64, 482,58, 551,52, 620,46, 689,4, 758,34, 827,28 kPa (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 psi) alebo viac.

Respirovateľné prípravky obsahujúce PEG a inzulín s vlastnosťami opísanými podľa vynálezu sa môžu pripraviť aj sušením určitých komponentov prípravku, ktoré vedú k vzniku prášku s perforovanou mikroštruktúrou podľa opisu vo WO 99/16419, ktorého celý obsah sa tu referenčne začleňuje. Prášky s perforovanou mikroštruktúrou typicky zahŕňajú duté mikrosféry sušené rozprašovaním s relatívne tenkou poréznu stenou ohraničujúcou veľkú vnútornú dutinu. Prášky s perforovanou mikroštruktúrou sa môžu dispergovať vo vybranom suspenznom médiu (ako je napríklad nevodný a/alebo fluorizovaný fúkací prostriedok) na poskytnutie stabilizovaných disperzií ešte pred sušením. Použitie perforovaných (alebo poréznych) mikroštruktúr alebo mikročastíc s pomerne nízkou hustotou výrazne znižuje príťažlivé sily medzi časticami, čím sa znižujú šmykové sily, čo vedie k zvýšenej tekutosti a dispergovateľnosti výsledných práškov a k zníženiu degradácie vložkovaním, sedimentáciou alebo krémovaniu ich stabilizovaných disperzií.

Podobne, prípravok obsahujúci PEG a inzulín na pľúcne podávanie môže zahŕňať aerodynamicky ľahké častice podľa opisu v US patente číslo 6,136,295.

Práškový prípravok podľa vynálezu sa môže pripraviť aj lyofilizáciou, vákuovým sušením, sušením rozprašovaním a zmrazovaním, spracovaním superkritických kvapalín (napríklad podľa opisu autorov Hanna a spol., US patent číslo 6,063,138), sušením na vzduchu, alebo inými formami sušenia odparovaním.

V ďalšom spôsobe suché prášky možno pripraviť aglomerovaním komponentov prášku, preosievaním materiálov na získanie aglomerátov, sféronizovaním na poskytnutie sférickejšieho aglomerátu, a určením rozmerov, aby sa získal produkt s uniformnými rozmermi, napríklad podľa opisu autorov C. Ahlneck a spol., medzinárodná PCT prihláška číslo WO 95/09616, 1995, ktorá sa tu referenčne začleňuje.

Suché prášky možno pripraviť aj zmiešaním, drvením, preosievaním alebo prúdovým mletím komponentov prípravku do formy suchého prášku.

Po príprave sa prípravky obsahujúce suchý prášok výhodne udržiavajú v suchých podmienkach (t.j. v podmienkach s pomerne nízkou vlhkosťou) počas výroby, spracovania a skladovania. Bez ohľadu na použitý spôsob sušenia spôsob vedie výhodne k inhalovateľným, vysoko dispergovateľným časticiam zahŕňajúcim chemicky modifikovaný inzulín podľa vynálezu.

A.3 Vlastnosti prípravkov suchých práškov

Prášky podľa vynálezu sú ďalej charakterizované niekoľkými vlastnosťami, hlavne jednou alebo viacerými z nasledujúcich: (i) konzistentne vysoká disperznosť, ktorá sa uchová aj počas skladovania, (ii) malé aerodynamické rozmery častíc (MMAD), (iii) lepšie dávkové hodnoty jemných častíc, t.j. prášky majú vyššie percento častíc s rozmermi menšími ako 3,3 μm MMAD. Všetky tieto vlastnosti prispievajú k zvýšenej schopnosti prášku penetrovať do tkanív dolných dýchacích ciest (t.j. do alveol) na podanie do systémového obehu. Tieto fyzikálne charakteristiky inhalovateľných práškov podľa vynálezu, ktoré sú podrobne opísané nižšie, sú dôležité pre maximalizáciu účinnosti aerosólového podania takýchto práškov do hlbokých častí pľúc.

Suché prášky podľa vynálezu sa skladujú z aerosólovateľných častíc, ktoré sú schopné penetrovať do pľúc. Častice podľa vynálezu majú stredný hmotnostný priemer (MMD) nižší ako približne 20 až 30 μm , alebo nižší ako 20 μm , alebo nižší ako približne 10 μm , výhodne nižší ako približne 7,5 μm , a výhodnejšie nižší ako 4 μm , a dokonca nižší ako približne 3,5 μm , a obyčajne sú v rozsahu 0,1 až 5 μm v priemere. Výhodné prášky sa skladajú z častíc, ktorých MMD je približne 0,2 až 4,0 μm . V niektorých prípadoch prášok obsahuje aj nerespirovateľné častice nosiča, ako je napríklad laktóza, kde nerespirovateľné častice sú typicky väčšie ako približne 40 μm v priemere.

Prášky podľa vynálezu sa ďalej vyznačujú veľkosťou aerosólových častíc, ktorá je nižšia ako je približne 10 μm stredného hmotnostného aerodynamického priemeru (MMAD), pričom MMAD je výhodne nižší ako približne 5 μm , výhodnejšie nižší ako 4 μm , ešte výhodnejšie nižší ako 3,5 μm , a najvýhodnejšie nižší ako 3 μm . Stredné hmotnostné aerodynamické priemery práškov sú typicky v rozsahu približne 0,1 až 10 μm , výhodne približne 0,2 až 5,0 μm MMAD, výhodnejšie približne 1,0 až 4,0 μm MMAD, a ešte výhodnejšie približne 1,5 až 3,0 μm . Malé aerodynamické priemery možno všeobecne dosiahnuť kombináciou optimalizovaných sušiacich podmienok rozprašovaním a voľbou a koncentráciou excipientov.

Prášky obsahujúce PEG a inzulín podľa vynálezu možno ďalej charakterizovať podľa hustoty. Práškový prípravok na inhaláciu má všeobecne sypkú hmotnosť približne 0,1 až 10 g/cm^3 , výhodne približne 0,1 až 2 g/cm^3 , a výhodnejšie približne 0,15 až 1,5 g/cm^3 .

Obsah vlhkosti práškov je všeobecne nižší ako približne 20 % hmotnostných, obyčajne nižší ako približne 10 % hmotnostných, a výhodne nižší ako približne 5 % hmotnostných. Výhodné prášky podľa vynálezu majú obsah vlhkosti, ktorý je nižší ako jeden alebo viaceré z nasledujúcich hmotnostných percent: približne 15 %, 10 %, 7 %, 5 %, alebo 3 %. Takéto tuhé látky s nízkym obsahom vlhkosti mávajú väčšiu stabilitu počas balenia a skladovania.

Okrem toho spôsoby sušenia rozprašovaním a stabilizátory opísané podľa vynálezu sú účinné na poskytnutie vysoko disperzných prípravkov obsahujúcich PEG a inzulín. Pre práškové prípravky emitovaná dávka (ED) týchto práškov je

typicky vyššia ako 30 % a obyčajne vyššia ako 40 %. Výhodnejšie, ED práškov podľa vynálezu je vyššia ako 50 %, a často je vyššia ako 60 %.

Prípravky opísané podľa vynálezu vykazujú dobrú stabilitu aj ohľadne chemickej a fyzikálnej stability, t.j. aerosólových vlastností v čase. Ohľadne chemickej stability prípravok obsahujúci konjugát PEG a inzulín všeobecne nedegraduje viac ako o 15 % po usušení rozprášením. To znamená, že prášok obsahuje aspoň 85 % intaktného konjugátu PEG a inzulínu, výhodne aspoň 90 alebo 95 % intaktného konjugátu, a ešte výhodnejšie obsahuje približne 97 % alebo viac intaktného PEG-inzulínu. Spôsob sušenia rozprašovaním výhodne vedie k práškom, ktoré majú menej ako približne 10 % agregátov celkového proteínu, to znamená, že viac ako 90 % hmotnostných chemicky modifikovaného inzulínu je v monomérskej forme.

Čo sa týka aerosólových vlastností, prípravky podľa vynálezu sa všeobecne vyznačujú poklesom emitovanej dávky o menej ako približne 20 %, výhodne menej ako približne 15 %, a výhodnejšie o menej ako 10 %, ak sa skladujú pri izbovej teplote počas troch mesiacov.

A.4 Podávanie prípravku

Prípravky PEG a inzulínu podľa opisu vynálezu možno podať s použitím akéhokoľvek inhalátora na suché prášky (DPI), t.j. inhalačného zariadenia, ktoré využíva pacientov inhalovaný dych ako nosič na transport liečiva vo forme suchého prášku do pľúc. Výhodné sú inhalačné zariadenia na suché prášky firmy Inhale Therapeutic Systems podľa opisu autorov Patton, J. S. a spol., US patent číslo 5,458,135, 17. október 1995; Smith, A. E. a spol., US patent číslo 5,740,794, 21. apríl 1998; a Smith, A. E. a spol., US patent číslo 5,785,049, 28. júl 1998, začlenené tu referenčne. Pri podávaní pomocou zariadenia takéhoto typu je práškové liečivo obsiahnuté v rezervoári s perforovateľným krytom alebo iným prístupovým povrchom, výhodne je to balenie alebo nádobka blisterového typu, kde rezervoár môže obsahovať jednu dávkovú jednotku alebo mnohonásobné dávkové jednotky. Vhodné spôsoby na plnenie veľkého počtu dutín (t.j. balení s jednotkovou dávkou) s presne určenými dávkami liečiva vo forme suchého prášku opísali napríklad autori

Parks, D. J. a spol., medzinárodná patentová prihláška WO 97/41031, 6. november 1997, ktorá je tu referenčne začlenená.

Iné disperzné zariadenia na suché prášky na podávanie do pľúc zahŕňajú napríklad zariadenia opísané autormi Newell, R. E. a spol., európsky patent číslo EP 129985, 7. september 1988; Hodson, P. D. a spol., európsky patent číslo EP 472598, 3. júl 1996; Cocozza, S. a spol., európsky patent číslo EP 467172, 6. apríl 1994, a Lloyd, L. J. a spol., US patent číslo 5,522,385, 4. jún 1996, začlenené tu referenčne. Na podávanie suchých práškov obsahujúcich PEG-inzulín sú vhodné inhalačné zariadenia, ako je napríklad Astra-Draco „TURBUHALER“. Tento typ zariadenia podrobne opísali Virtanen, R., v US patente číslo 4,668,218, 26. máj 1987; Wetterlin, K. a spol., US patent číslo 4,667,668, 26. máj 1987; a Wetterlin, K. a spol., US patent číslo 4, 805,811, 21. február 1989, ktoré sú tu všetky referenčne začlenené. Iné vhodné zariadenia zahŕňajú inhalátory na suché prášky, ako je napríklad Rotahaler[®] (Glaxo), Discus[®] (Glaxo), Spiros[™] inhalátor (Dura Pharmaceuticals) a Spinhaler[®] (Fisons). Vhodné sú aj zariadenia, ktoré využívajú použitie piestu na poskytnutie vzduchu buď na naloženie práškového liečiva, na zdvihnutie liečiva z plochy nosiča pretlačením vzduchu cez túto plochu, alebo na zmiešanie vzduchu s práškovým liečivom v miešacej komôrke s následným zavedením prášku do pacienta cez náustok zariadenia, podľa opisu autora Mulhauser, P., a spol., US patent číslo 5,388,572, 30. september 1997, začlenený tu referenčne.

Inhalovateľný prípravok obsahujúci PEG a inzulín možno podať aj prostredníctvom inhalátora pod tlakom, ktorý podáva presne určené dávky (MDI), napríklad inhalátor na presné dávky typu Ventolin[®], ktorý obsahuje roztok alebo suspenziu liečiva vo farmaceuticky inertnej hnacej kvapaline, ako je napríklad chlór-fluóruhl'ovodík alebo fluóruhl'ovodík podľa opisu v Laube a spol., US patent číslo 5,320,094, 14. jún 1994, a Rubsamen a spol., US patent číslo 5,672,581 (1994) oba sú tu referenčne začlenené.

Podobne, PEG-inzulíny podľa vynálezu možno rozpustiť alebo suspendovať v rozpúšťadle, napríklad vo vode alebo vo fyziologickom roztoku, a podávať nebulizáciou. Nebulizátory na podávanie aerosólového roztoku zahŕňajú AERx[™]

(Aradigm), Ultravent[®] (Mallinkrodt), Pari LC Plus[™] alebo Pari LC Star[™] (Pari GmbH, Nemecko), DeVilbiss Pulmo-Aide, a Acorn II[®] (Marquest Medical Products).

Podľa opisu vyššie, konjugáty PEG a inzulínu podľa vynálezu možno podať aj parenterálne intravenóznou injekciou, alebo menej výhodne intramuskulárnou alebo subkutánnou injekciou. Presné komponenty takýchto prípravkov môže odborník v danej oblasti techniky ľahko určiť. Vhodné formulačné typy na parenterálne podávanie zahŕňajú roztoky pripravené na injikovanie, suché prášky na kombináciu s rozpúšťadlom pred použitím, suspenzie pripravené na injikovanie, suché nerozpustné prípravky na kombinovanie s nosičom pred použitím, emulzie a kvapalné koncentráty na zriedenie pred podaním. Napríklad injikovateľný roztok prípravku obsahujúceho PEG a inzulín podľa vynálezu môže zahŕňať prípravok rozpustený vo vodnom nosiči, napríklad vo vodnom chloride sodnom, V Ringerovom roztoku, injekčnom roztoku dextrózy, laktátovom Ringerovom roztoku a podobne, a môžu zahŕňať jeden alebo viaceré farmaceuticky prijateľné kompatibilné excipienty alebo prísady podľa opisu vyššie.

IV. Použitie

Prípravky podľa vynálezu sú užitočné, keď sa podávajú akýmkoľvek vhodným spôsobom podania, a výhodne inhaláciou alebo injekciou, v terapeuticky účinnom množstve cicavčiemu subjektu na liečenie diabetes mellitus, a osobitne cukrovky I. alebo II. typu.

Všetky články, knihy, patenty a iné publikácie, na ktoré sa vo vynáleze odkazuje, sa týmto v celom rozsahu referenčne začleňujú.

Nasledujúce príklady ilustrujú, avšak nijako neobmedzujú rozsah vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkrese

Obrázok 1 znázorňuje rýchlosť enzymatického natrávenia ilustračného konjugátu PEG a inzulínu („750-2 PEG inzulín“) v porovnaní s nemodifikovanou inzulínovou kontrolou podľa podrobného opisu v príklade 6.

Obrázok 2 ukazuje priemerné koncentrácie inzulínu v sére po intravenóznom podaní ilustrujúcich prípravkov pegylovaného (5K PEG inzulín) v porovnaní s nepegylovaným inzulínom (podrobnosti sú uvedené v príklade 7).

Obrázok 3 ukazuje koncentrácie glukózy v krvi po intravenóznom podaní príkladných prípravkov pegylovaného (5K PEG inzulín) v porovnaní s nepegylovaným inzulínom (podrobnosti sú uvedené v príklade 7).

Obrázok 4 ukazuje priemerné koncentrácie inzulínu v sére po intratracheálnej instilácii pegylovaného (150 μg /zvíera, 5K PEG inzulín) v porovnaní s nepegylovaným ľudským inzulínom (40 μg /zvíera) u potkaních samcov (príklad 8).

Obrázok 5 ukazuje priemerné koncentrácie glukózy v krvi po intratracheálnej instilácii pegylovaného (150 μg /zvíera, 5K PEG inzulín) v porovnaní s nepegylovaným ľudským inzulínom (40 μg /zvíera) u potkaních samcov (príklad 8).

Obrázok 6 ukazuje priemerné koncentrácie inzulínu v sére po intratracheálnej instilácii pegylovaného (750-1 PEG inzulínu) v porovnaní s nepegylovaným ľudským inzulínom u potkaních samcov (príklad 9).

Obrázok 7 ukazuje priemerné koncentrácie glukózy v krvi po intratracheálnej instilácii pegylovaného (750-1 PEG inzulín) v porovnaní s nepegylovaným ľudským inzulínom u potkaních samcov (príklad 9).

Obrázok 8 ukazuje priemerné koncentrácie inzulínu v sére po intratracheálnej instilácii pegylovaného (750-1 PEG inzulín, 80 a 160 μg /zvíera) v porovnaní s nepegylovaným ľudským inzulínom (80 μg /zvíera) u potkaních samcov (príklad 10).

Obrázok 9 ukazuje priemerné koncentrácie glukózy v krvi po intratracheálnej instilácii pegylovaného (750-1 PEG inzulín, 80 a 160 μg /zvíera) v porovnaní s nepegylovaným ľudským inzulínom (80 μg /zvíera) u potkaních samcov (príklad 10).

Obrázok 10 ukazuje priemerné koncentrácie inzulínu v sére po intratracheálnej instilácii pegylovaného (750-2 PEG inzulín, 80 μg /zvíera) v porovnaní s nepegylovaným ľudským inzulínom (80 μg /zvíera) u potkaních samcov (príklad 11).

Obrázok 11 ukazuje priemerné koncentrácie glukózy v krvi po intratracheálnej instilácii pegylovaného (750-1 PEG inzulín, 80 μg /zvíera) v porovnaní

s nepegylovaným ľudským inzulínom (80 µg/zviera) u potkaních samcov (príklad 11).

Obrázok 12 ukazuje priemerné koncentrácie glukózy v krvi po intra-tracheálnej instilácii pegylovaného (2K PEG inzulín, 300 µg/zviera, 600 µg/zviera, 900 µg/zviera a 1200 µg/zviera) v porovnaní s nepegylovaným ľudským inzulínom (80 µg/zviera) u potkaních samcov (príklad 12).

Obrázok 13 ukazuje priemerné koncentrácie inzulínu v sére po intravenóznom podaní ilustrujúceho prípravku pegylovaného (2K PEG inzulín) v porovnaní s nepegylovaným inzulínom (podrobnosti sú uvedené v príklade 13).

Obrázok 14 ukazuje koncentrácie glukózy v krvi po intravenóznom podaní príkladného prípravku pegylovaného (2K PEG inzulín) v porovnaní s nepegylovaným inzulínom (podrobnosti sú uvedené v príklade 13).

Príklady uskutočnenia vynálezu

Materiály a spôsoby

Polyetylén glykolové reagenty sa získali od firmy Shearwater Corporation (Huntsville, Alabama).

Ľudský inzulín sa získal od firmy Diosynth, Inc.

Príklad 1

Syntéza Di-N^{αA1},N^{εB29}-t-Boc-inzulínu

Prípravok zložený hlavne z monopegylovaného inzulínu sa pripravil cieľovým spôsobom podľa opisu v príklade 1 a 2 s použitím lineárneho polyetylén glykolu s 5000 daltonov.

Pripravil sa najprv di-chránený inzulín podľa nasledujúceho opisu. 602 mg ľudského inzulínu (0,103 mmol) sa rozpustil v 3,0 ml bezvodého dimetylsulfoxidu (DMSO) obsahujúceho 166 µl trietylamínu. Do inzulínového roztoku sa pridalo 50 µl di-*tert*-butyldikarbonátu (0,215 mmol). Po 60 minútach pri izbovej teplote sa reakčný roztok vylial do 240 ml acetónu, potom sa pridali 3 kvapky 6M HCl na začatie

vločkovania. Precipitát sa izoloval filtráciou a vysušil vo vákuu. Reakčný produkt sa vyčistil preparatívnou HPLC s použitím kolóny Waters 25×100 mm C18 (priemerná veľkosť častíc 15 μm ; veľkosť pórov 100Å). Zmesi acetonitrilu a 0,1 % TFA v deionizovanej vode boli použité ako eluenty rýchlosťou 3,0 ml/min. Produkt sa vyzoloval a destiloval, aby sa odstránil acetonitril a potom sa lyofilizoval. Výťažok bol 164,8 mg (26,7%, molekulová hmotnosť približne 6000 prostredníctvom MALDI).

Príklad 2

Syntéza monopegylovaného inzulínového konjugátu mPEG-5K-SPA-PheB1
 $N^{\alpha B1}$ -metoxypoly(etylénglykol 5K-inzulín (mPEG5K-PheB1-inzulín)

150 mg (približne 0,025 mmol) nanovo čisteného di- $N^{\alpha A1}$, $N^{\alpha B29}$ -*t*-Boc inzulínu z príkladu 1 sa rozpustil v 4 ml DMSO obsahujúceho 95 μl trietylamínu. Do roztoku inzulínu sa pridalo 169 mg (0,032 mmol) mPEG-SPA-5000 (mPEG-sukcínimidyl propionátu, mPEG-O-CH₂CH₂C(O)O-sukcínimidu, molekulová hmotnosť 5000). Po inkubácii cez noc (29 hodín) pri izbovej teplote sa výsledný derivát mPEG-inzulínu zriedil deionizovanou vodou na 100 ml, dialyzoval sa 4 hodiny proti deionizovanej vode a potom sa lyofilizoval. Lyofilizovaný produkt sa potom opäť rozpustil v 4 ml bezvodého TFA a udržiaval sa 1,5 hodiny v N₂ atmosfére pri 0 °C, aby sa odstránili Boc ochranné skupiny. mPEG-inzulín zbavený ochranných skupín sa zriedil deionizovanou vodou na 50 ml a dialyzoval sa cez noc proti 0,1 % NH₄HCO₃ a deionizovanej vode. Výsledkom lyofilizácie produktu je biely prášok. Výťažok bol 117,6 mg (41,6 %, molekulová hmotnosť približne 11311,6 podľa MALDI).

Percento monokonjugovaného inzulínu na základe hmotnostných spektrálnych údajov bolo približne 90 %, čo potvrdilo miestne špecifickú povahu tohto syntetického prístupu. Ďalšia charakterizácia je poskytnutá v príklade 5. Inzulínový obsah výsledného produktu bol 51,3 %. Pre jednoduchosť sa $N^{\alpha B1}$ -metoxypoly(etylénglykol)5K-propiónamido-inzulín alebo mPEG5K-PheB1-inzulín sa tu uvádza ako „5K PEG inzulín“.

Príklad 3

Syntéza konjugátu mPEG-2K-SPA-inzulínu

Na prípravu nie cielene (t.j. náhodným spôsobom) pegylovaného inzulínu s použitím lineárneho polyetylén glykolu s molekulovou hmotnosťou približne 2000 daltonov sa použil nasledujúci spôsob. 0,1012 g inzulínu (molekulová hmotnosť 5826 Da, 0,01737 mmol) sa rozpustilo v 0,5 ml bezvodého DMSO a pôsobilo sa naň s 50 μ l trietylamínu (0,3587 mmol, 20-násobný mólový nadbytok). Do vyššie uvedenej reakčnej zmesi sa pridalo 52 mg m-SPA-2000 (mPEG-sukcínimidylpropionát, Shearwater Corporation, molekulová hmotnosť približne 2000 Da, 0,02605 mmol, 1,5-násobný mólový nadbytok). Zmes sa miešala približne 17 hodín pri izbovej teplote v dusíkovej atmosfére. Reakčná zmes sa potom rozpustila v 0,1 % TFA do celkového objemu 5,5 ml a vyčistila sa s HPLC s reverznou fázou s použitím kolóny C-18 a acetonitrilu/0,1 % TFA ako eluentu). HPLC s reverznou fázou ukázala zmes mono- (naviazaný jeden PEG) a di-pegylovaného (naviazané dva PEGy) produktu; prípravok sa tu uvádza ako „2K PEG inzulín“. Výťažok: 68 mg. Obsah inzulínu podľa RP-HPLC 50,5 mg.

Príklad 4

Syntéza konjugátu mPEG-750 Da-SPA-inzulínu

Miestne špecifickým spôsobom sa pripravil prípravok zložený prevažne z inzulínu pegylovaného na mieste B1 s použitím reprezentatívneho modifikátora polyetylén glykolu, t.j. lineárneho 750 daltonového polyetylén glykolu, ktorý má na jednom konci sukcínimidylpropionát vhodný na kovalentné naviazanie na inzulín.

4A. Syntéza Di-N^{A1},N^{B29}-*t*-Boc inzulínu

Di-chránený inzulín sa pripravil nasledovným spôsobom. 602 mg ľudského inzulínu (0,103 mmol) sa rozpustilo v 3,0 ml bezvodého dimetylsulfoxidu (DMSO), ktorý obsahoval 166 μ l trietylamínu. Do inzulínového roztoku sa pridalo 50 μ l di-*tert*-butyldikarbonátu (0,215 mmol). Po 60 minútach pri izbovej teplote sa reakčný roztok vylial do 240 ml acetónu a potom sa pridali 3 kvapky 6M HCl, aby sa začalo vložkovanie. Precipitát sa vyzoloval filtráciou a vysušil sa vo vákuu. Reakčný produkt sa vyčistil preparatívnou HPLC s použitím kolóny Waters 25 \times 100 mm C18 (priemerná veľkosť častíc 15 μ m; veľkosť pórov 100 Å). Ako eluenty sa použili zmesi

acetonitrilu a 0,1 % TFA v deionizovanej vode rýchlosťou 3,0 ml/min. Produkt sa vyzoloval, destiloval sa, aby sa odstránil acetonitril a potom sa lyofilizoval. Výťažok bol 164,8 mg (26,7 %, molekulová hmotnosť približne 6000 podľa MALDI).

4B. Syntéza konjugátu mPEG-750 Da-SPA-PheB1-inzulínu

63,4 mg (približne 0,01056 mmol nanovo vyčisteného di-N^{A1},N^{B29}-*t*-boc-inzulínu z príkladu 4 sa rozpustilo v 0,5 ml DMSO, ktorý obsahoval 200 µl trietyl-amínu. Do roztoku inzulínu sa pridalo 33 mg (0,03173 mmol, molekulová hmotnosť mSPA750 je približne 1040 Da) mPEG-SPA-750 (mPEG-sukcínimidyl-propionátu, mPEG-O-CH₂CH₂C(O)O-sukcínimidu, molekulová hmotnosť PEG 750). Po inkubácii cez noc (29 hodín) pri izbovej teplote sa do reakčnej zmesi pridalo 300 µl TFA a výsledný derivát mPEG-inzulínu sa vyzrážal v 100 ml etyléteru a vysušil sa vo vákuu. Výťažok bol približne 28,5 mg s obsahom inzulínu 21,3 mg podľa HPLC s reverznou fázou (33,6 %, molekulová hmotnosť približne 6639,3 Da podľa MALDI). Kvôli jednoduchosti sa tu prípravok uvádza ako „750 PEG inzulín“.

S týmto materiálom sa uskutočnili dve rôzne syntézy, pričom oba spôsoby použili vyššie uvedený spôsob syntézy s jednou výnimkou: jedna syntéza sa uskutočnila v mólovom pomere mPEG-SPA-750 k inzulínu 7:1, kým druhý spôsob syntézy sa uskutočnil v mólovom pomere mPEG-SPA-750 k inzulínu 3:1. Prípravky produktu, ktoré sú výsledkom týchto dvoch syntéz, sa tu uvádzajú ako „750-1 PEG inzulín“ (mólový pomer PEG k inzulínu bol 7:1) a „750-2 PEG inzulín“ (mólový pomer PEG k inzulínu bol 3:1).

Príklad 5

Charakterizácia príkladných prípravkov PEG-inzulínu

Pegylované prípravky obsahujúce inzulínový konjugát podľa opisu vyššie boli ďalej charakterizované rôznymi analytickými spôsobmi.

Hmotnostná spektrometria sa použila na poskytnutie odhadu relatívnych množstiev mono-, di- a trikonjugovaného inzulínu (uvádzaného tiež ako PEG inzulínový monomér, dimér a trimér) prítomný vo všetkých prípravkoch založených na relatívnych vrcholových oblastiach. Výsledky sú uvedené nižšie v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Relatívne množstvá mono-, di- a trikonjugovaného inzulínu podľa hmotnostnej spektrometrie

Prípravok PEG-inzulínu	% monokonjugátu	% dikonjugátu	% trikonjugátu
5K PEG inzulín	91	4	nebolo určené
750-1 PEG inzulín	46	39	15
750-2 PEG inzulín	60	32	8
2K PEG inzulín	51	45	nebolo určené

S prípravkami obsahujúcimi 750-1, 750-2 a 2K PEG-inzulín sa urobila size exclusion chromatografia (SEC) opísaná vyššie s použitím dvoch Shodex SEC kolón (číslo časti KW-802.5) zostavených do série v systéme Waters 2690 HPLC. Mobilná fáza pozostávala z 22 % ľadovej kyseliny octovej a 33 % acetonitrilu (objemových) vo vode. Údaje z chromatografie sa použili ako alternatívny prístup na stanovenie relatívneho množstva mono-, di- a trikonjugovaného inzulínu vo všetkých prípravkoch. výsledky sú uvedené nižšie v tabuľke 2. Porovnanie údajov v tabuľke 1 a 2 ukazuje, že oba rôzne spôsoby poskytujú výsledky, ktoré sú ohľadne relatívnych množstiev jednotlivých typov konjugátov prítomných v prípravkoch do značnej miery zhodné.

Tabuľka 2

Relatívne množstvá mono-, di- a trikonjugovaného inzulínu podľa HP-SEC

Typ inzulínu	% monokonjugátu	% dikonjugátu	% trikonjugátu	% iné
PEG 750-1	48	47	5	0
PEG 750-2	66	26	7	2
PEG 2000	40	51	nebolo určené	9

Uskutočnili sa ďalšie štúdie, aby sa určilo rozdelenie rôznych polohových konjugátov v každom z troch príkladných prípravkov, t.j. rozsah substitúcie na každom z troch možných miest naviazania, A-1Gly, B-1Phe alebo B-29 Lys. Na

redukciu disulfidových väzieb vo vzorkách inzulínu sa použil ditiotreitól (DTT, Sigma), čím sa kovalentné väzby medzi reťazcami inzulínu A a B prerušili.

Na uskutočnenie redukčných reakcií sa vzorky PEG-inzulínu rozpustili v 8M močovine obsahujúcej 0,4M hydrouhličitanu amónneho približne v koncentrácii 0,2 mg/ml ekvivalentnej hmotnosti inzulínu pre každú konjugovanú zlúčeninu. DTT sa rozpustil vo vode (7 mg/ml), čím sa získal vodný roztok DTT. Jeden diel DTT sa potom pridal do 5 dielov každého z inzulínových roztokov, a redukčná reakcia sa uskutočnila pri 50 °C počas 15 minút. Zredukované 750 PEG inzulínové prípravky sa jódacetamidom (Sigma) alkylovali. Šesť dielov roztokov PEG-inzulínu pred urobením chromatografie a enzýmovým natrávením reagovalo s 1 dielom 100 mM jódacetamidu. Reakčné produkty sa potom analyzovali pomocou HPLC. Percento konjugácie buď reťazca A alebo B inzulínu sa stanovilo podľa množstva reťazca A alebo B inzulínu, ktoré boli eluované neskôr ako kontrola (a prisudzované konjugácii s polyetylén glykolom). Tieto neskoro eluujúce vrcholy preto chýbali v očakávanom retenčnom čase pre kontrolu. Na poskytnutie indikácie percenta konjugácie polyetylén glykolu na reťazec A alebo B inzulínu sa použili relatívne vrcholové oblasti.

Na ďalšie preskúmanie relatívneho množstva PEG naviazaného na B-29 Lys proti B1-Phe sa redukované a alkylované reťazce A a B inzulínu 750-1 a 750-2 prípravkov obsahujúcich PEG-inzulín z DTT redukcií opísaných vyššie sa ďalej natrávili enzýmom sekvenačného stupňa, endoproteinázou Glu-C (Sigma). Pripravil sa roztok obsahujúci enzým v koncentrácii 0,125 µg/µl vo vodnom roztoku hydrouhličitanu amónneho. Pre pridaním roztoku enzýmu koncentrácia v každom z redukovaných reakčných zmesí bola 0,05 µg/µl v 8M močovine obsahujúcej 0,4M hydrouhličitanu amónneho. Jeden diel enzýmového roztoku sa potom pridal do 40 dielov inzulínového roztoku. Natrávením endoproteinázou Glu-C sa získajú inzulínové peptidové fragmenty A1-A4, A5-A17, A18-A21, B1-B13, B14-B21, a B22-B30.

Fragmenty z enzýmových natrávení oboch reťazcov A aj B prípravkov obsahujúcich 750-1 a 750-2 PEG-inzulín boli analyzované prostredníctvom HPLC, aby sa pre všetky tieto prípravky stanovilo celkové rozdelenie miest PEG naviazaní na inzulín. Percento vrcholu chýbajúceho v porovnaní s kontrolou poskytlo odhad

množstva fragmentu konjugovaného s PEG, pretože ten fragment bol na chromatograme eluovaný inde.

Tabuľka 3A

Rozdelenie miest naviazania PEG u jednotlivých príkladných prípravkov PEG a inzulínu

Typ inzulínu	% konjugovaných A1 miest	% konjugovaných B-1 miest	% konjugovaných B-29 miest
PEG 750-1	30	95	21
PEG 750-2	11	95	15
PEG 2000	63	85*	

* nie sú údaje z natrávenia, iba znížené recovery

Čísla v tabuľke 3A sú založené na možnosti, že každé miesto je na 100 % konjugované. Napríklad každý monokonjugát má 3 možné konfigurácie (mono-A1, mono-B1, mono-B-29) a každý dikonjugát má 3 konfigurácie (di-A1, B-1; di-A-1, B-29; a di-B-1, B-29). Údaje v tabuľke 3A ukazujú, že napríklad pre PEG-750-1 zo všetkých možných konjugátov prítomných v prípravku v 95% konjugátov PEG-inzulínu je polyetylén glykol kovalentne naviazaný na miesto B-1.

Tabuľka 3B

Rôzne možné konjugáty

Typy	Monokonjugát			Dikonjugát			Trikonjugát	HMWP
Konjugát č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Miesto konjugácie	A-1	B-1	B-29	(A-1+B-29)	(A-1+B-29)	(B-1+B-29)	(A-1+B-1+B-29)	Konjugované inzulínové diméry

Príklad 6

Porovnanie rýchlosti enzymatického natrávenia 750-2 PEG inzulínu a nemodifikovaného inzulínu

Rýchlosť enzymatického natrávenia 750-2 PEG inzulínu chymotrypsínom sa porovnal s enzymatickým natrávením inzulínu.

Pripravila sa inzulínová kontrola a prípravok s PEG 750-2 inzulínom v koncentrácii 1 mg/ml vo fosfátmi tlenenom fyziologickom roztoku, pH 7,8. Chymotrypsín sa pripravil v koncentrácii 1 mg/ml v 1 mM roztoku HCl. Jeden diel roztoku enzýmu sa pridal do 20 dielov roztoku inzulínu. Približne každú hodinu sa odoberali malé alikvoty zmiešaného roztoku.

Vyvinul sa spôsob RP-HPLC (s reverznou fázou) s použitím C-18 kolóny, kde mobilná fáza obsahovala chloristan sodný, kyselinu fosforečnú a acetonitril. Na eluovanie jednotlivých pegylovaných inzulínov v skupine mierne rozlíšených vrcholov monitorovaných pri 214 nm sa použil acetonitrilový gradient. Skupina vrcholov bola integrovaná manuálne ako jeden vrchol a označil sa ako PEG inzulín. S pokračujúcim trávením sa nanášal úbytok intaktného PEG inzulínu a inzulín (obrázok 1). Určil sa ich biologický polčas v prítomnosti chymotrypsínu.

Čas potrebný na enzymatické natrávenie polovice koncentrácie hlavnej zložky prípravku obsahujúceho 750-2 PEG inzulín bol päťkrát dlhší ako v prípade nemodifikovaného inzulínu. To znamená, že natrávenie polovice koncentrácie ilustratívneho pegylovaného inzulínu chymotrypsínom trvalo päťkrát dlhšie ako v prípade normálneho inzulínu. Tieto výsledky ukazujú potenciál konjugátov obsahujúcich PEG inzulín na predĺžený rezidenčný čas v alveolách v dôsledku zvýšenej rezistencie voči proteolytickej degradácii v porovnaní s nemodifikovaným inzulínom.

Príklad 7

Vyhodnotenie koncentrácií sérovej glukózy a inzulínu po intravenóznom podaní 5K PEG inzulínu u potkanov (P-2001-015)

Táto štúdia sa uskutočnila na stanovenie toho, či aktivita inzulínu v prípravku obsahujúcom 5K PEG inzulín ostala zachovaná po chemickej modifikácii s príkladným 5K polyetylén glykolovým reťazcom, a na preskúmanie kriviek dávky a odpovede glukózy týchto prípravkov po intravenóznom podaní.

Kanylované samce potkanov kmeňa Sprague Dawley (325 až 350 gramové) (jugulárna/femorálna žila [JVC/FVC]) s prístupom všitým pod kožu na šiji dodala firma Hilltop Lab Animals Inc. (P.O. Box 183, Scottdale, PA 15683). Jugulárne kanyly sa naplnili roztokom (luminárnym plnivom) polyvinylpyrolidónu (PVP, molekulová hmotnosť 40000) s farmaceutickou čistotou, fyziologického roztoku a heparínu (sodná soľ) na udržanie priechodnosti. Uzáver kanyly z nylónových vlákien sa odstránil a nahradil sa tupou kanylou typu Monoject 23G×1 (VWR číslo 53498-484) v deň uskutočnenia štúdie. Testovací systém zahŕňal 1 potkanieho samca náhodne vybraného do placebo skupiny, 2 potkaních samcov náhodne vybraných do nepegylovanej skupiny a 4 potkaních samcov náhodne vybraných do skupiny s PEG-inzulínom. Zdroj pegylovaného inzulínu v tomto štúdiu bol 5K PEG inzulín z príkladu 2. Dávky boli podávané intravenózne.

Počet/pohlavie zvierat

1. deň: 1 samec/skupina pre placebo, skupina 1

2 samce/skupina pre skupinu 2; 4 samce/skupina pre skupiny 3 až 5

Zvieratá sa pred začatím štúdie nechali hladovať 12 až 18 hodín. Ľudský inzulín (Diosynth) sa pred použitím skladoval pri -20 °C. 5K PEG inzulín (príklad 2) sa pred použitím skladoval pri -20 °C. Na podanie sa pripravili dva rôzne roztoky:

Roztoky pre intravenózne podávanie:

Nepegylovaný ľudský inzulín (1,0 mg/ml zásobného roztoku): 1,0 ml PBS sa pridalo do 1,0 mg inzulínového prášku.

5K PEG inzulín: (1,0 mg/ml ľudského inzulínu - koncentrácia vychádza z inzulínu, nie z konjugátu): 6,0 ml PBS sa pridalo do 11,7 mg prášku 5K PEG inzulínu.

Zvieratá sa anestetizovali vdychovaním izofluránu. Intravenózne dávky (300 µl/zviera) sa podávali cez FVC a katéter sa potom podviazal, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii s krvným riečišťom. Všetky vzorky krvi sa odoberali cez JVC. Fosfátmi tmený fyziologický roztok (PBS) sa podával zvieratám skupiny 1 vo forme 300 µl intravenózne dávky. Nepegylovaný ľudský inzulín sa podával zvieratám skupiny 2 vo forme intravenózne dávky 20 µg/zviera. Pegylovaný prípravok ľudského inzulínu sa podávala zvieratám skupiny 3 vo forme intravenózne dávky 20

$\mu\text{g/zviera}$, zvieratám skupiny 4 vo forme intravenózneho dávky $40 \mu\text{g/zviera}$, a zvieratám skupiny 5 vo forme intravenózneho dávky $30 \mu\text{g/zviera}$. Vzorky krvi (približne $500 \mu\text{l}$) sa odoberali z JVC pred dávkou (2 až 0,25 hodín pred podaním dávky), a 10, 15, 30, 60, 120 a 180 minút po podaní dávky. Malé množstvo krvi sa umiestnilo na prúžok na testovanie glukózy, aby sa určila hladina glukózy v krvi prostredníctvom glukózového monitoru typu Glucometer Elite (Bayer Corp., Elkart, IN). Zvyšok vzorky sa umiestnil do separačných skúmaviek na sérum a umiestnil sa do centrifúgy a krv sa oddelila. Sérum sa potom vylialo do ďalšej skúmavky a analyzovalo sa s použitím rádioimunoanalytického spôsobu (RIA). S pomocou programu Microsoft® Excel 2000 sa vypočítali priemery a smerodajné odchýlky (SD).

Tabuľka 4

Súhrn *in vivo* experimentov

V tabuľke sú skutočné podané dávky a skutočné počty zvierat použitých v jednotlivých skupinách. Štúdia sa uskutočnila počas jedného dňa.

Číslo skupiny	Prípravok	Spôsob podania	Celková denná dávka inzulínu ($\mu\text{g/zviera}$)	Počet zvierat/pohlavie
1	Placebo	intravenózne	0	1 samec
2	Nepegylovaný inzulín	intravenózne	20	2 samce
3	Pegylovaný inzulín	intravenózne	20	4 samce
4	Pegylovaný inzulín	intravenózne	40	4 samce
5	Pegylovaný inzulín	intravenózne	30	4 samce

Výsledky ukazujú, že prípravky s 5K PEG inzulínom majú biologickú aktivitu, t.j. molekula inzulínu ostáva po modifikácii polyetylén glykolom aktívna, ako to vidieť podľa schopnosti znižovať hladinu glukózy v krvi. Priemerné sérové koncentrácie inzulínu po intravenóznom podaní pegylovaného inzulínu boli závislé od dávky; takisto sa pozoroval aj dávkovo závislý pokles hladiny glukózy. Výsledky sú zhrnuté

na obrázku 2 a obrázku 3. Obrázok 2 ukazuje priemerné sérové koncentrácie inzulínu po intravenóznom podaní ilustratívnych prípravkov obsahujúcich pegylovaný v porovnaní s nepegylovaným inzulínom; obrázok 3 ukazuje krvné koncentrácie glukózy po intravenóznom podaní vyššie opísaných prípravkov.

Príklad 8

Podávanie 5K PEG inzulínu do pľúc (P-2001-017)

Príkladný pegylovaný inzulín, 5K PEG inzulín, sa podával potkanom vo forme intratracheálneho podávania, aby sa zistilo (i) či sa uchovala biologická aktivita po podaní do pľúc, a (ii) jeho dopad, ak vôbec nejaký je, na koncentrácie sérového inzulínu a krvnej glukózy, ak sa podajú priamo do pľúc.

Zásobné roztoky

Nepegylovaný inzulín: Na prípravu zásobného roztoku sa pridal 1 ml PBS do 1,0 mg inzulínového prášku. Zásobný roztok inzulínu (kontrola) sa pripravil v deň začatia štúdie.

5K PEG inzulín: Na prípravu 1 mg/ml (na základe inzulínu) zásobného roztoku sa 4,0 ml PBS sa pridal do 7,8 mg prášku 5K PEG inzulínu.

Dávkové roztoky

40 µg/zviera inzulínu: Do 2 hodín po podaní dávky sa do 4,33 ml PBS pridal 667 µl zásobného roztoku inzulínu.

150 µg/zviera inzulínu B-1: Do 2 hodín po podaní dávky sa do 2,5 ml PBS pridal 2,5 ml zásobného roztoku 5K PEG inzulínu.

Intratracheálna instilácia

Potkany boli ľahko anestetizované približne na 5 minút v anestetickvej komôrke z plexiskla s použitím inhalovaného 3,0 až 5,0%-ného Isofluranu (Abbott Laboratories) zmiešaného s kyslíkom. Podávanie sa uskutočnilo vsunutím ihly na podávanie (Popper & Sons Inc.; 18×3" W2-1/4 mm guľička, New Hyde Park, NY 11040) nasadenej do 1 ml injekčnej striekačky do úst potkana až dole do trachey až

po bod tesne nad hlavný hrebienok. Keď sa vsunula ihla do trachey, správna inzercia sa určovala cítením drsnosti chrupavčitých prstencov pod kožou hrdla s použitím guličky podávacej ihly. Týmto spôsobom sa dávky podávali do pľúc, a ihla sa potom odstránila.

V tejto štúdii sa použilo štrnásť (N = 7/skupina) predtým hladujúcich potkaních samcov (Hilltop Lab Animals, Scottsdale, PA (vážiach 300 až 350 g) s nasadenými jugulárnymi katétami (JVC). Skupine 1 sa podal nepegylovaný ľudský inzulín vo forme 40 µg/300 µl intratracheálnej dávky. Prípravok pegylovaného ľudského inzulínu sa podal skupine 2 vo forme 150 µg/300 µl intratracheálnej dávky. Vzorky krvi (približne 500 µl) sa odoberali pred dávkou (2 až 0,25 hodín pred podaním dávky), a 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 a 720 minút po podaní dávky. Malé množstvo krvi sa umiestnilo na prúžok na testovanie glukózy, aby sa určila hladina glukózy v krvi prostredníctvom glukózového monitoru typu Glucometer Elite (Bayer Corp., Elkart, IN). Zvyšok vzorky sa umiestnil do separačných skúmaviek na sérum a umiestnil sa do centrifúgy a krv sa oddelila. Sérum sa potom vylialo do ďalšej skúmavky a analyzovalo sa s použitím rádioimunoanalytického spôsobu. S pomocou programu Microsoft® Excel 2000 sa vypočítali priemery a smerodajné odchýlky (SD). Zvieratá 2-3 sa zo štúdie vypustilo kvôli zrazenému katétu.

Tabuľka 5

Súhrn *in vivo* experimentov u potkanov

V tabuľke sú skutočné podané dávky a skutočné počty zvierat použitých v jednotlivých skupinách.

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Spôsob podania	Počet zvierat/ pohlavie	Celková denná dávka inzulínu (µg/zviera)	Počet dní podávania
1	Inzulín	intratracheálny	7 samcov	40	1
2	5K PEG inzulín	intratracheálny	7 samcov	150	1

Tabuľka 6

Dávkové hladiny *in vivo*

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Celková denná dávka inzulínu ($\mu\text{g}/\text{zvier}$ a)	Dávkový objem (μl)	Koncentrácia dávkového roztoku ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	Inzulín	40	300	133,33
2	5K PEG inzulín	150	300	500

Priemerné sérové koncentrácie a priemerné koncentrácie inzulínu a 5K PEG inzulínu v krvi po intratracheálnom podaní sa vniesli do grafu a sú na obrázku 4 a 5. Výsledky ukazujú, že prípravky s pegylovaným inzulínom podľa vynálezu majú po podaní a počas pobytu v pľúcach biologickú aktivitu. Farmakokinetické údaje ďalej ukazujú, že pegylovaný inzulín nielen prechádza cez pľúca do krvného obehu, ale prechádza aj so zachovaním aktivity, ako sa dokázalo merateľnými hladinami sérového inzulínu, ktoré zodpovedali neendogénnemu inzulínu. V dôsledku krvných hladín inzulínu pozorovaných do 1 hodiny po intratracheálnom podaní sa zdá, že pegylovaný inzulín nie je v podstate zadržovaný v pľúcach a prechádza cez ne do krvného obehu už krátko po podaní. Výsledky ďalej ukazujú, že pegylovaný inzulín, ak sa podá do pľúc, je účinný pri znižovaní krvnej glukózy. Avšak v tomto príklade sa zdá, že pegylovaný inzulín je menej účinný ako nepegylovaný inzulín s dávkami podávanými na zníženie krvnej glukózy. Farmakokinetické aj farmakodynamické krivky intratracheálne podávaného pegylovaného inzulínu sa podobajú trochu na nepegylovaný inzulín, hoci na základe profilov na obrázku 4 sa zdá, že PEG inzulín pôsobí dlhšie ako nepegylovaný inzulín. Ďalšia optimalizácia dávkového množstva a osobitné modifikátory polyetylén glykolu môže odborník v danej oblasti techniky ľahko dosiahnuť podľa návodu prezentovaného podľa vynálezu, a v závislosti na požiadavkách dávkovania, plánovanej populácie pacientov, liečeného stavu, a podobne, osobitne chemicky modifikovaného inzulínového produktu.

Príklad 9

Podávanie 750-1 PEG inzulínu do pľúc (P-2201-025)

Reprezentatívny pegylovaný inzulín, 750-1-PEG inzulín, sa intratracheálne podával potkanom. Štúdiá sa uskutočnila čiastočne na preskúmanie účinkov prípravku s obsahom inzulínu kovalentne naviazaného na jeden alebo viaceré reťazce polyetyénglykolu, ktorých približná molekulová hmotnosť je 1000 daltonov alebo menej, ak sa podávajú do pľúc.

In vivo štúdiá s použitím potkanov sa uskutočnila v podstate podľa opisu v príklade 8 vyššie. Presný dávkový režim a podávané dávky sú zhrnuté v tabuľkách nižšie.

Tabuľka 7

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Spôsob podania	Počet zvierat/ pohlavie	Celková denná dávka inzulínu ($\mu\text{g}/\text{zvier}$ a)	Počet dávkových dní
1	Inzulín	intratracheálne	2 samce	80	1
2	750-1 PEG inzulín	intratracheálne	4 samce	100	1
3	750-1 PEG inzulín	intratracheálne	4 samce	300	1
4	750-1 PEG inzulín	intratracheálne	4 samce	500	1

Tabuľka 8

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Celková denná dávka inzulínu ($\mu\text{g}/\text{zvier}$ a)	Objem dávky (μl)	Koncentrácia dávkového roztoku ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	Inzulín	80	300	266,67
2	750-1 PEG inzulín	100	300	333,33
3	750-1 PEG inzulín	300	300	1000,00
4	750-1 PEG inzulín	500	300	1666,67

Sérový inzulín a krvné koncentrácie glukózy u inzulínu a 750-1 PEG inzulínu po intratracheálnom podaní u potkanov sú na obrázku 6 a 7. Podľa priemerných koncentrácií inzulínu v sére na obrázku 6 vidieť, že natívny alebo nepegylovaný inzulín dosiahol maximálnu sérovú koncentráciu približne po 15 minútach, kým prípravky s pegylovaným inzulínom dosiahli maximálnu koncentráciu v sére po 6 hodinách (100 $\mu\text{g}/\text{zvier}$) a 8 hodinách (300 $\mu\text{g}/\text{zvier}$), čo poukazuje na dlhodobý účinok týchto prípravkov po podaní do pľúc inhaláciou. Podľa obrázku 6 sa koncentrácia nemodifikovaného inzulínu vrátila na základnú hladinu približne 6 hodín po podaní, kým hladiny inzulínu v prípade pegylovaného inzulínu po 6 hodinách boli výrazne nad základnou hladinou (hodnoty boli 3- až 7-krát vyššie ako bola hodnota základnej hladiny). Okrem toho intratracheálne podanie pegylovaného inzulínu viedlo k udržaniu hladiny systémového inzulínu, ktorá sa nevrátila na základnú hladinu dokonca ani po 12 hodinách po podaní. V skutočnosti hladiny inzulínu v prípade pegylovaného inzulínu boli viac ako trikrát vyššie ako základná hladina (t.j. hodnota nemodifikovaného inzulínu) po 8 aj po 12 hodinách. Tieto výsledky sú graficky znázornené na obrázku 6.

Ak sa inzulín 750-1 PEG podával do pľúc, viedlo to k zvýšeným systémovým hladinám inzulínu v porovnaní s nemodifikovaným inzulínom. Okrem toho systémové hladiny inzulínu v prípade skupiny pegylovaného inzulínu boli ešte stále výrazne nad hodnotou základnej hladiny dokonca aj po 12 hodinách. To znamená, že zvýšené hladiny inzulínu sa udržiavali v prípade skupiny pegylovaného inzulínu aspoň dvakrát tak dlho ako v prípade nemodifikovaného inzulínu. Tieto údaje ďalej ukazujú, že pegylovaný inzulín prechádza do pľúc, je biologicky aktívny a poskytuje predĺžené systémové hladiny inzulínu v porovnaní s nemodifikovaným inzulínom.

Graf ukazujúci krvné koncentrácie glukózy po intratracheálnom podaní nepegylovaného inzulínu v porovnaní so 750-1 pegylovaným inzulínom je na obrázku 7. Hladiny glukózy v krvi následne dobre korelovali s hladinami inzulínu v sére v skupine pegylovaného inzulínu. (To znamená, že zvýšené hladiny inzulínu v sére boli v súlade so zodpovedajúcim potlačením/znížením glukózy v krvi). Na obrázku 7 vidieť, že prípravky obsahujúce pegylovaný inzulín podľa vynálezu, ak sa podali ústne do pľúc, mali skôr rýchly začiatok účinku, ktorý bol porovnateľný s natívnym inzulínom, ako oneskorený začiatok účinku typický pre mnohé prípravky

s oneskoreným účinkom. To znamená, že potlačenie glukózy sa pozoruje krátko po podaní. Okrem toho, kým natívny alebo nepegylovaný inzulín dosiahne maximálne zníženie hladiny glukózy približne o 2 hodiny, čas na dosiahnutie maximálneho zníženia glukózy v prípade pegylovaného inzulínu sa predĺžil aspoň na 4 hodiny, 6 hodín a 8 hodín pre dávky 500 µg, 100 µg a 300 µg. To znamená, že čas potrebný na dosiahnutie maximálneho zníženia hladiny glukózy v krvi v prípade pegylovaného inzulínu po podaní do pľúc sa predĺžil 2- až 4-krát v porovnaní s nepegylovaným inzulínom. Celkove, potlačenie glukózy 750-1 PEG inzulínom sa výrazne zvýšil počas 12 hodín v porovnaní s nemodifikovaným inzulínom. Po 8 hodinách sa hladiny glukózy v podstate vrátili na normálnu úroveň ako u nemodifikovaného inzulínu, kým hladiny glukózy v skupine PEG inzulínu boli 1,3- až 3-krát nižšie ako v prípade nemodifikovaného inzulínu. Hladiny glukózy v prípade skupiny pegylovaného inzulínu sa nevrátili na základnú hladinu dokonca ani po 12 hodinách, čo svedčilo o predĺženom potlačení glukózy v prípade chemicky odvodených prípravkov obsahujúcich inzulín podľa vynálezu.

Príklad 10

Podávanie 750-1 PEG inzulínu do pľúc (P-2002-001)

V štúdiu podobnej príkladu 9 vyššie sa 750-1 PEG inzulín podával potkanom intratracheálne v dávkach, ktoré boli nižšie ako dávky použité v príklade 9.

Intratracheálna *in vivo* štúdia sa uskutočnila v podstate podľa opisu príkladu 8 vyššie. Presný dávkový režim a podané dávky sú zhrnuté nižšie v tabuľkách.

Tabuľka 9

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Spôsob podania	Počet zvierat/ pohlavie	Celková denná dávka inzulínu (µg/zviera)	Počet dávkových dní
1	Inzulín	intratracheálne	5 samcov	80	1
2	750-1 PEG inzulín	intratracheálne	5 samcov	80	1

3	750-1 PEG inzulín	intratracheálne	5 samcov	160	1
---	----------------------	-----------------	----------	-----	---

Tabuľka 10

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Celková denná dávka inzulínu ($\mu\text{g}/\text{zvier}$ a)	Objem dávky (μl)	Koncentrácia dávkového roztoku ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	Inzulín	80	300	266,7
2	750PEG inzulín-1	80	300	266,7
3	750PEG inzulín-1	160	300	533,3

Sérový inzulín a krvné koncentrácie glukózy u inzulínu a 750-1 PEG inzulínu po intratracheálnom podaní u potkanov sú na obrázku 8 a 9. Podľa priemerných koncentrácií inzulínu v sére na obrázku 6 vidieť, že natívny alebo nepegylovaný inzulín dosiahol maximálnu sérovú koncentráciu približne po 15 minútach, kým prípravky s pegylovaným inzulínom dosiahli maximálnu koncentráciu v sére po 2 hodinách (80 $\mu\text{g}/\text{zvier}$ a) a 6 hodinách (160 $\mu\text{g}/\text{zvier}$ a). To znamená, že čas na dosiahnutie maximálnych sérových hladín inzulínu v prípade PEG-modifikovaného inzulínu sa predĺžil 8- až 24-krát v porovnaní s nepegylovaným inzulínom po podaní do systémového obehu prostredníctvom pľúc. Podľa obrázku 8 sa nemodifikovaný inzulín vrátil na úroveň základnej hladiny približne 12 hodín po podaní, kým hladiny inzulínu v prípade skupiny PEG-inzulínu boli 2,5 až 3,5-krát nad hodnotou základnej hladiny v rovnakom čase po 12 hodinách. Hladiny inzulínu v prípade skupiny pegylovaného inzulínu sa nevrátili na základnú úroveň približne 25 hodín po podaní, čiže skupine pegylovaného inzulínu trvalo dvakrát tak dlho vrátiť sa na základnú hladinu ako nemodifikovanému inzulínu. Systémové hladiny inzulínu sa udržali v prípade skupiny pegylovaného inzulínu približne dvakrát tak dlho (25 hodín proti 12 hodinám) ako v prípade nemodifikovaného inzulínu. Počas približne 6 hodín hladiny inzulínu pre obe skupiny pegylovaného inzulínu zhruba zodpovedali podávaným dávkam (to znamená, že koncentrácie inzulínu u skupiny zvierat so 160 μg boli približne dvakrát nad hodnotou skupiny 80 $\mu\text{g}/\text{zvier}$ a).

Graf priemerných koncentrácií glukózy v krvi po intratracheálnom podaní nepegylovaného inzulínu v porovnaní so 750-1 pegylovaným inzulínom je na obrázku 9. Na rozdiel od nemodifikovaného inzulínu sa 25 hodín po podaní potlačenie glukózy v oboch skupinách s pegylovaným inzulínom ešte nevrátilo na základnú hladinu. Podobne ako výsledky z príkladu 9 celkové profily pegylovaného inzulínu ukazujú predĺžené potlačenie glukózy trvajúce dlhšie ako 25 hodín. Po 8 hodinách sa hladiny glukózy v prípade nemodifikovaného inzulínu vrátili takmer na normálnu hodnotu, kým hladiny glukózy v prípade skupín s PEG inzulínom boli približne 1,5-krát nižšie ako v prípade nemodifikovaného inzulínu. Tieto výsledky ďalej ukazujú, že modifikujúci inzulín s jednou alebo s viacerými polyetylénovými časťami vedie cez pľúca k dobrej biologickej dostupnosti, predĺženým systémovým hladinám inzulínu a k predĺženému potlačeniu glukózy.

Príklad 11

Podávanie 750-2 PEG inzulínu do pľúc (P-2002-003)

Reprezentatívny prípravok obsahujúci pegylovaný inzulín, 750-2-PEG inzulín, sa podával intratracheálne potkanom. Táto štúdia bola vykonaná kvôli ďalšiemu preskúmaniu účinku rôznych dávok pegylovaného v porovnaní s nepegylovaným inzulínom po podaní priamo do pľúc. Zvieratám sa podávalo 80 µg pegylovanej a nepegylovanej formy inzulínu na jedno zviera. *In vivo* štúdia s potkanmi sa uskutočnila v podstate podľa opisu v príklade 8 vyššie. Presný dávkový režim a podané dávky sú zhrnuté v tabuľkách nižšie.

Tabuľka 11

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Spôsob podania	Počet zvierat/ pohlavie	Celková denná dávka inzulínu (µg/zviera)	Počet dávkových dní
1	Inzulín	intratracheálne	7 samcov	80	1
2	750PEG-2 inzulín	intratracheálne	7 samcov	80	1

Tabuľka 12

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Celková denná dávka inzulínu ($\mu\text{g}/\text{zvieria}$)	Objem dávky (μl)	Koncentrácia dávkového roztoku ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	Inzulín	80	300	266,7
2	750PEG-2 inzulín	80	300	266,7

Graf priemerných koncentrácií inzulínu po intratracheálnej instilácii nepegylovaného a 750-1 PEG inzulínu v dávke $80 \mu\text{g}/\text{zvieria}$ je na obrázku 10. Graf priemerných koncentrácií glukózy v krvi po intratracheálnej instilácii nepegylovaného a 750-1 PEG inzulínu v dávke $80 \mu\text{g}/\text{zvieria}$ je na obrázku 11. Získali sa výsledky podobné výsledkom v príklade 9 a 10.

Nižšie je tabuľka farmakokinetických parametrov z príkladu 10 a 11. Biologická dostupnosť je absolútna biologická dostupnosť (t.j. v porovnaní s intravenózne podávaným inzulínom).

Tabuľka 13

Priemerná sérová farmakokinetika inzulínu

Príklad	Typ inzulínu	Spôsob podania	Dávka $\mu\text{g}/\text{zvieria}$	C_{Max} $\mu\text{U}/\text{ml}$	T_{Max} min	AUC $\mu\text{U} \cdot \text{min}/\text{ml}$	Absolútna biologická dostupnosť
9 (P-2001-25)	Inzulín	intratracheálne	80	56	15	12878	
9	750-1 PEG	intratracheálne	100	64	368	27954	
9	750-1 PEG	intratracheálne	300	160	188	50691	
9	750-1 PEG	intratracheálne	500	3474	184	255881	
10 (P-2002-001)	Inzulín	intratracheálne	80	132	15	28167	
10	750-1 PEG	intratracheálne	80	56	210	36818	
10	750-1 PEG	intratracheálne	160	117	78	60713	
IV P-2002-	Inzulín	intravenózne	20	3057	5	44388	

002							
IV	750-2 PEG	intravenózne	20	2638	7	63190	
IV	750-2 PEG	intravenózne	30	3510	5	62746	
11 (P-2002-003)	Inzulín	intratracheálne	80	89	24	22203	12,5
11	750-2 PEG	intratracheálne	80	164	73	57639	32** 32***

* hodnota ležiaca mimo očakávaný rozsah nebola zo súboru údajov odstránená

** v pomere k intravenózne dávke 20 µg/zviera. Hodnota s hodnotou ležiacou mimo rozsah bola 22 %.

*** v pomere k intravenózne dávke 30 µg/zviera. Hodnota s hodnotou ležiacou mimo rozsah bola nezmenená.

Absolútna biologická dostupnosť sa vypočítala nasledovným spôsobom:

$$\frac{(AUC) \quad (Dávka_{IV \text{ ins}})}{(AUC_{IV \text{ ins}}) \quad (Dávka)}$$

Príklad 12

Podávanie 2K PEG inzulínu do pľúc (P-2002-010)

Ďalší príkladný prípravok obsahujúci pegylovaný inzulín, 2K PEG inzulín, sa podával potkanom intratracheálne. 2K PEG inzulín použitý v tejto štúdii sa pripravil podľa opisu v príklade 3. Zvieratá dostávali dávku 80 µg nepegylovaného inzulínu na jedno zviera. Zvieratá dostávali 300 µg, 600 µg, 900 µg a 1200 µg inzulínu 2K PEG na jedno zviera. *In vivo* štúdiá s potkanmi sa uskutočnila v podstate podľa opisu v príklade 8 vyššie. Presný dávkový režim a podávané dávky sú zhrnuté v tabuľkách nižšie.

Tabuľka 14

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Spôsob podania	Počet zvierat/ pohlavie	Celková denná dávka inzulínu ($\mu\text{g}/\text{zvier}$ a)	Počet dávkových dní
1	Inzulín	intratracheálne	3	80	1
2	PEG2K-1 inzulín	intratracheálne	3	600	1
3	PEG2K-1 inzulín	intratracheálne	3	80	1
4	PEG2K-1 inzulín	intratracheálne	3	160	1
5	PEG2K-1 inzulín	intratracheálne	3	300	1
6	PEG2K-1 inzulín	intratracheálne	3	900	1
7	PEG2K-1 inzulín	intratracheálne	3	1200	1

Tabuľka 15

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Celková denná dávka inzulínu ($\mu\text{g}/\text{zvier}$ a)	Objem dávky (μl)	Koncentrácia dávkového roztoku ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	Inzulín	80	300	0,267
2	PEG2K-1 inzulín	600	300	2,0
3	PEG2K-1 inzulín	80	300	0,267
4	PEG2K-1 inzulín	160	300	0,533
5	PEG2K-1 inzulín	300	300	1,0
6	PEG2K-1 inzulín	900	300	3,0
7	PEG2K-1 inzulín	1200	300	4,0

Graf priemerných koncentrácií glukózy v krvi po intratracheálnom podaní je na obrázku 12. U prípravkov obsahujúcich pegylovaný inzulín, ak sa podávali do pľúc, sa pozorovala dobrá dávková závislosť (t.j. vyššie dávky 2K PEG inzulínu viedli k väčšiemu poklesu koncentrácie glukózy v krvi). Hoci sa zdá, že čas na krivke, kedy sa dosiahlo najvyššie potlačenie glukózy, je približne 3 hodiny ako pre pegylované, tak aj pre nepegylované prípravky, profily pegylovaného aj nepegylovaného inzulínu sa výrazne líšia ohľadne trvania potlačenia glukózy. Osobitne, pre časy dlhšie ako 6 hodín a tri vyššie dávky 2K pegylovaného inzulínu (600 µg, 900 µg a 1200 µg/ zviera) boli hladiny glukózy potlačené výrazne pod hladinou nepegylovaného inzulínu. Tieto výsledky ďalej ukazujú, že podávaním pegylovaného inzulínu do pľúc možno dosiahnuť predĺžený systémový účinok.

Príklad 13

Vyhodnotenie koncentrácií glukózy a inzulínu v sére po intravenóznom podaní 2K PEG inzulínu potkanom (P-2002-009)

Táto štúdia sa uskutočnila, aby sa ďalej preskúmala aktivita inzulínu v príkladnom prípravku obsahujúcom 2K PEG inzulín, a aby sa určila intravenózna (i. v.) dávka pegylovaného ľudského inzulínu (PEG2K-1), ktorá je schopná znížiť hladinu glukózy v krvi na koncentráciu približne 30 až 40 mg/dl.

Použil sa protokol podobný protokolu, ktorý bol opísaný v príklade 7, s použitím prípravkov, skupín zvierat a dávok uvedených v tabuľkách nižšie.

Tabuľka 16

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Spôsob podania	Počet zvierat/ pohlavie	Celková denná dávka inzulínu (µg/zviera)	Počet dávkových dní
1	Inzulín	intravenózne	2 samce	20	1
2	PEG2K-1 inzulín	intravenózne	2 samce	20	1

3	PEG2K-1 inzulín	intravenózne	2 samce	30	1
4	PEG2K-1 inzulín	intravenózne	2 samce	40	1
5	PEG2K-1 inzulín	intravenózne	2 samce	80	1
6	PEG2K-1 inzulín	intravenózne	2 samce	160	1

Tabuľka 17

Číslo skupiny	Typ inzulínu	Celková denná dávka inzulínu ($\mu\text{g}/\text{zvier}$ a)	Objem dávky (μl)	Koncentrácia dávkového roztoku ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	Inzulín	20	300	67
2	PEG2K-1 inzulín	20	300	67
3	PEG2K-1 inzulín	30	300	100
4	PEG2K-1 inzulín	40	300	133
5	PEG2K-1 inzulín	80	300	267
6	PEG2K-1 inzulín	160	300	533

Graf priemerných koncentrácií inzulínu v sére po intravenóznom podaní nepegylovaného 2K PEG inzulínu v dávke 20 $\mu\text{g}/\text{zvier}$ a (nepegylovaný inzulín) a 20, 30 a 40 $\mu\text{g}/\text{zvier}$ a (2K PEG inzulín) je na obrázku 13. Graf priemerných koncentrácií glukózy v krvi po intravenóznom podaní nepegylovaného a 2K PEG inzulínu v dávkach opísaných vyššie je na obrázku 14.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Prípravok inzulínu na pľúcne podávanie, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje konjugát inzulínu kovalentne naviazaný na jeden alebo viaceré molekuly umelo pripraveného hydrofilného polyméru.

2. Prípravok inzulínu podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že konjugát je bez lipofilnej časti.

3. Prípravok inzulínu podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že umelo pripravený hydrofilný polymér je polyalkylénglykol.

4. Prípravok inzulínu podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že umelo pripravený hydrofilný polymér je polyetylénglykol.

5. Prípravok inzulínu podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že umelo pripravený hydrofilný polymér je polyetylénglykol.

6. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že má absolútnu pľúcnu biologickú dostupnosť, ktorá je vyššia ako je absolútna biologická dostupnosť natívneho inzulínu.

7. Prípravok podľa nároku 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že má absolútnu pľúcnu biologickú dostupnosť, ktorá je aspoň dvakrát tak vysoká ako je absolútna pľúcna biologická dostupnosť natívneho inzulínu.

8. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že má absolútnu pľúcnu biologickú dostupnosť, ktorá je vyššia ako 15 %.

9. Prípravok podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že má absolútnu pľúcnu biologickú dostupnosť, ktorá je vyššia ako 30 %.

10. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že po podaní do pľúc sa vyznačuje hodnotou T_{max} , ktorá je aspoň trikrát vyššia ako je T_{max} natívneho inzulínu.

11. Prípravok podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že po podaní do pľúc sa vyznačuje hodnotou T_{max} , ktorá je aspoň päťkrát vyššia ako je T_{max} natívneho inzulínu.

12. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol má uzavretý koniec.

13. Prípravok podľa nároku 12, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol má koniec ukončený alkoxyskupinou.

14. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol sa volí zo skupiny zahrnujúcej lineárny polyetylénglykol, rozvetvený polyetylénglykol, vidlicovo vetvený polyetylénglykol a činkovito rozvetvený polyetylénglykol.

15. Prípravok podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol zahŕňa biologicky degradovateľnú väzbu.

16. Prípravok podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol zahŕňa veľký počet podjednotiek (OCH_2CH_2), ktoré sa volia zo skupiny, v ktorej je približne 2 až 300 podjednotiek, približne 4 až 200 podjednotiek, a približne 10 až 100 podjednotiek.

17. Prípravok podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol má nominálnu priemernú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 10000 daltonov.

18. Prípravok podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol je lineárny.

19. Prípravok podľa nároku 17, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol má nominálnu priemernú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 5000 daltonov.

20. Prípravok podľa nároku 17, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol má nominálnu priemernú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 2000 daltonov.

21. Prípravok podľa nároku 17, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol má nominálnu priemernú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 1000 daltonov.

22. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že inzulín je natívny inzulín.

23. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že čistota uvedeného konjugátu je vyššia ako 90 %.

24. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že inzulín je kovalentne naviazaný na polyetylén-glykol v jednom alebo viacerých amino miestach.

25. Prípravok podľa nároku 24, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že aspoň 75 % B-1Phe miest na inzulíne je kovalentne naviazaných na polyetylén-glykol.

26. Prípravok podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že aspoň 90 % B-1Phe miest na inzulíne je kovalentne naviazaných na polyetylén-glykol.

27. Prípravok podľa nároku 24, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje zmes monomérených a dimérených konjugátov inzulínu.

28. Prípravok podľa nároku 27, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje trimér konjugátu inzulínu.

29. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že inzulín je kovalentne naviazaný na polyetylén glykol prostredníctvom časti, ktorá je umiestnená na konci uvedeného polyetylén glykolu.

30. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén glykol pred naviazaním na inzulín má aktivovanú väzbovú časť na jednom konci, ktorý je vhodný na kovalentnú väzbu s inzulínom.

31. Prípravok podľa nároku 30, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že aktivovaná väzbová časť je vhodná na väzbu s reaktívnymi aminoskupinami inzulínu.

32. Prípravok podľa nároku 31, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že aktivovaná väzbová časť zahŕňa reaktívnu funkčnú skupinu, ktorá sa volí zo skupiny, v ktorej sú aktívne estery *N*-hydroxysukcínimidu, aktívne karbonáty, aldehydy a acetály.

33. Prípravok podľa nároku 29, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že inzulín je kovalentne naviazaný na polyetylén glykol prostredníctvom amidovej väzby.

34. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je vo forme aerosólu.

35. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je v tekutej alebo suchej forme.

36. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje farmaceuticky prijateľný excipient.

37. Prípravok podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je v sušenej forme, pričom sušenie sa uskutočnilo rozprašovaním.

38. Spôsob podávania inzulínu cicavcovi, ktorý takéto podanie potrebuje, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa:

- aerosolizáciu inzulínového prípravku uvedeného v nároku 4, a
- podanie uvedeného aerosolizovaného inzulínového prípravku inhaláciou na uloženie v pľúcach a absorpciu z pľúc uvedeného subjektu.

39. Spôsob poskytovania v podstate neimunogénneho inzulínového prípravku na podávanie do pľúc subjektu, ktorý takýto prípravok potrebuje, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa:

- kovalentné naviazanie inzulínu na jednu alebo viaceré molekuly umelo pripraveného hydrofilného polyméru na poskytnutie prípravku, ktorý zahŕňa konjugát inzulínu a hydrofilného polyméru, a
- podávanie takéhoto prípravku do pľúc subjektu, ktorý takýto prípravok potrebuje, inhaláciou, pričom výsledkom uvedeného podávania je prechod uvedeného inzulínu cez pľúca a jeho vstup do krvného obehu.

40. Spôsob podľa nároku 39, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že umelo pripravený hydrofilný polymér je polyalkylénglykol.

41. Spôsob na poskytnutie inzulínového prípravku s predĺženým účinkom na podávanie do pľúc subjektu, ktorý takéto podávanie potrebuje, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa:

- kovalentné naviazanie inzulínu na jednu alebo viaceré molekuly umelo pripraveného hydrofilného polyméru na poskytnutie prípravku zahŕňajúceho konjugát inzulínu a hydrofilného polyméru,
- podávanie uvedeného prípravku do pľúc subjektu, ktorý takýto prípravok potrebuje, pričom výsledkom uvedeného podávania (i) uvedený inzulín prechádza cez pľúca a vstupuje do krvného obehu, a (ii) zvýšené hladiny inzulínu v krvi sa udržia aspoň 8 hodín po podaní.

42. Spôsob podľa nároku 41, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že umelo pripravený hydrofilný polymér je polyalkylénglykol.

43. Spôsob podľa nároku 42, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že umelo pripravený hydrofilný polymér je polyetylénglykol.

44. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zvýšené hladiny inzulínu sa udržujú aspoň 10 hodín po podaní.

45. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zvýšené hladiny inzulínu sa udržujú aspoň 12 hodín po podaní.

46. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že výsledkom uvedeného podávania je to, že sa hladiny glukózy v uvedenom subjekte potláčajú aspoň na 10 hodín po podaní.

47. Spôsob podľa nároku 46, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ďalším výsledkom uvedeného podávania je to, že sa hladiny glukózy v uvedenom subjekte potláčajú aspoň na 12 hodín po podaní.

48. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené podávanie zahŕňa podávanie uvedeného prípravku vo forme aerosólu.

49. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ďalej zahŕňajúci aerosolizáciu uvedeného prípravku pred podaním.

50. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené naviazanie zahŕňa kovalentné naviazanie inzulínu na polyetylénglykol miestne špecifickým spôsobom.

51. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že naviazanie zahŕňa kovalentné naviazanie inzulínu na polyetylénglykol náhodným spôsobom.

52. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že konjugát po podaní do pľúc sa ďalej vyznačuje absolútnou pľúcnou biologickou dostupnosťou, ktorá je vyššia ako absolútna pľúcna biologická dostupnosť natívneho inzulínu.

53. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že naviazanie zahŕňa kovalentné naviazanie inzulínu na jednu alebo viaceré molekuly polyetylén-glykolu s uzavretým koncom.

54. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že naviazanie zahŕňa kovalentné naviazanie inzulínu na jednu alebo viaceré molekuly polyetylén-glykolu, ktorý sa volí zo skupiny zahrnujúcej lineárny, rozvetvený, vidlicovito vetvený a činkovito vetvený polyetylénglykol.

55. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že konjugát je bez lipofilnej časti.

56. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že prípravok je bez lipofilnej zložky.

57. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že naviazanie zahŕňa kovalentné naviazanie na jednu alebo viaceré molekuly polyetylénglykolu zahŕňajúce biologicky degradovateľnú väzbu.

58. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol obsahuje veľký počet (OCH_2CH_2) podjednotiek, ktoré sa volia zo skupiny, v ktorej je okolo 2 až 300 podjednotiek, okolo 4 až 200 podjednotiek, a okolo 10 až 100 podjednotiek.

59. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol má nominálnu priemernú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 10000 daltonov.

60. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol má nominálnu priemernú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 5000 daltonov.

61. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol má nominálnu priemernú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 2000 daltonov.

62. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol má nominálnu priemernú molekulovú hmotnosť približne 200 až približne 1000 daltonov.

63. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že naviazanie zahŕňa naviazanie polyetylénglykolu na inzulín v jednom alebo viacerých z jeho reaktívnych amino miest.

64. Spôsob podľa nároku 63, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén-glykol je naviazaný na inzulín v jednom alebo viacerých reaktívnych amino miestach prostredníctvom väzby, ktorá sa volí zo skupiny zahrnujúcej amid, uretán a metylénamino.

65. Spôsob podľa nároku 63, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že naviazanie zahŕňa reakciu polyetylénglykolu s terminálnou reaktívnou skupinou volenou zo skupiny zahrnujúcej aktívne estery *N*-hydroxysukcínimidu, aktívne karbonáty, aldehydy a acetály s jedným alebo viacerými reaktívnymi amino miestami na inzulíne.

66. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že výsledkom naviazania je prípravok, v ktorom aspoň približne 75 % B-1Phe miest na inzulíne je kovalentne naviazaných na polyetylénglykol.

67. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že výsledkom naviazania je prípravok, v ktorom aspoň približne 90 % B-1Phe miest na inzulíne je kovalentne naviazaných na polyetylén glykol.

68. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že výsledkom naviazania je prípravok zahŕňajúci zmes monomérnych a dimérnych konjugátov inzulínu.

69. Spôsob podľa nároku 68, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že výsledkom naviazania je prípravok ďalej zahŕňajúci trimérny konjugát inzulínu.

70. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že polyetylén glykol zahŕňa na jednom konci aktivovanú väzbovú časť, ktorá je vhodná na kovalentné naviazanie na inzulín.

71. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že aktivovaná väzbová časť zahŕňa reaktívnu funkčnú skupinu volenú zo skupiny zahrnujúcej aktívne estery *N*-hydroxysukcínimidu, aktívne karbonáty, aldehydy a acetály.

72. Spôsob podľa nároku 70, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že dĺžka väzbovej časti je približne 2 až približne 20 atómov.

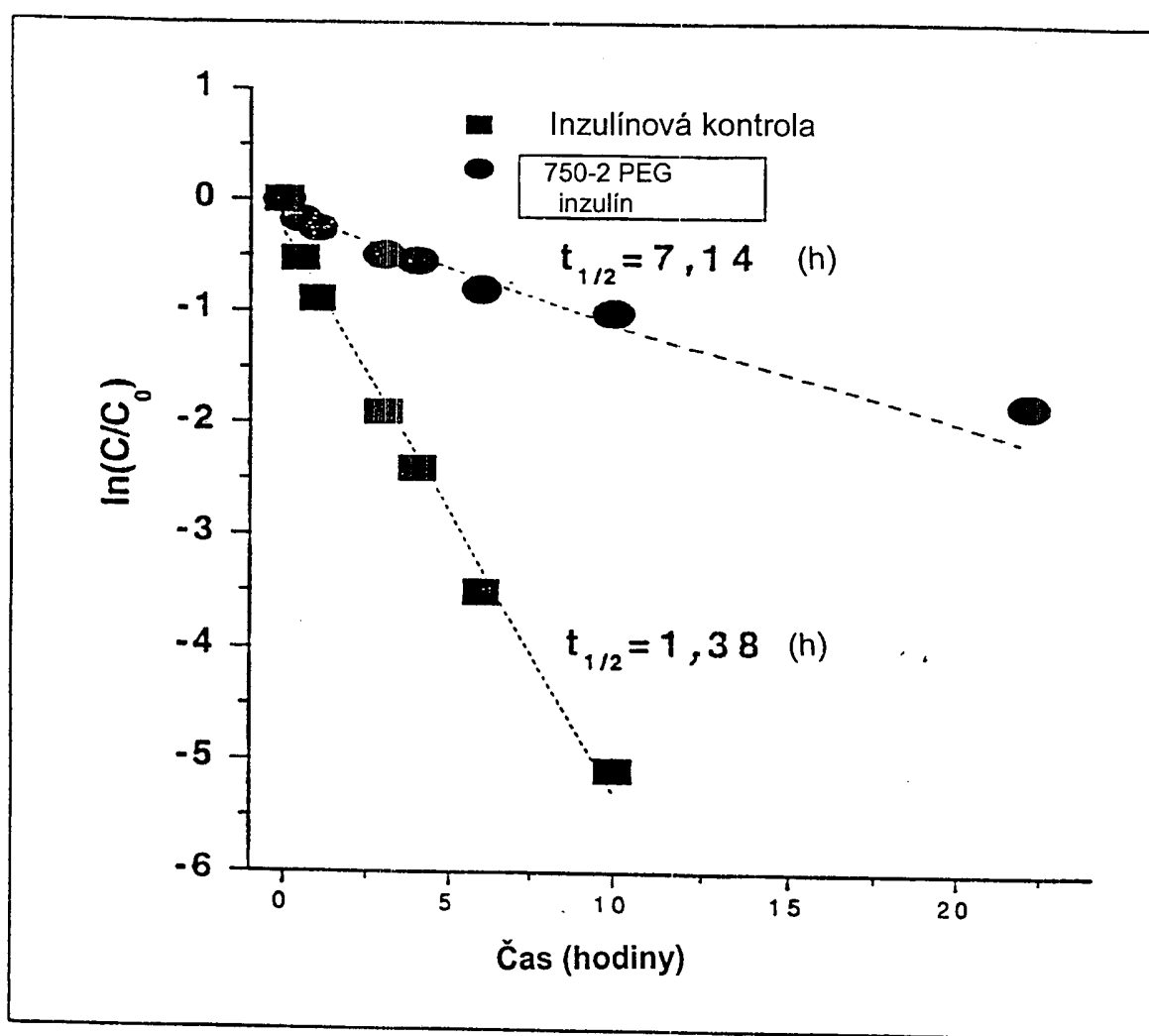
73. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že podávanie zahŕňa podávanie prípravku prostredníctvom inhalátora na suché prášky.

74. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že podávanie zahŕňa podávanie prípravku prostredníctvom inhalátora na presne určené dávky.

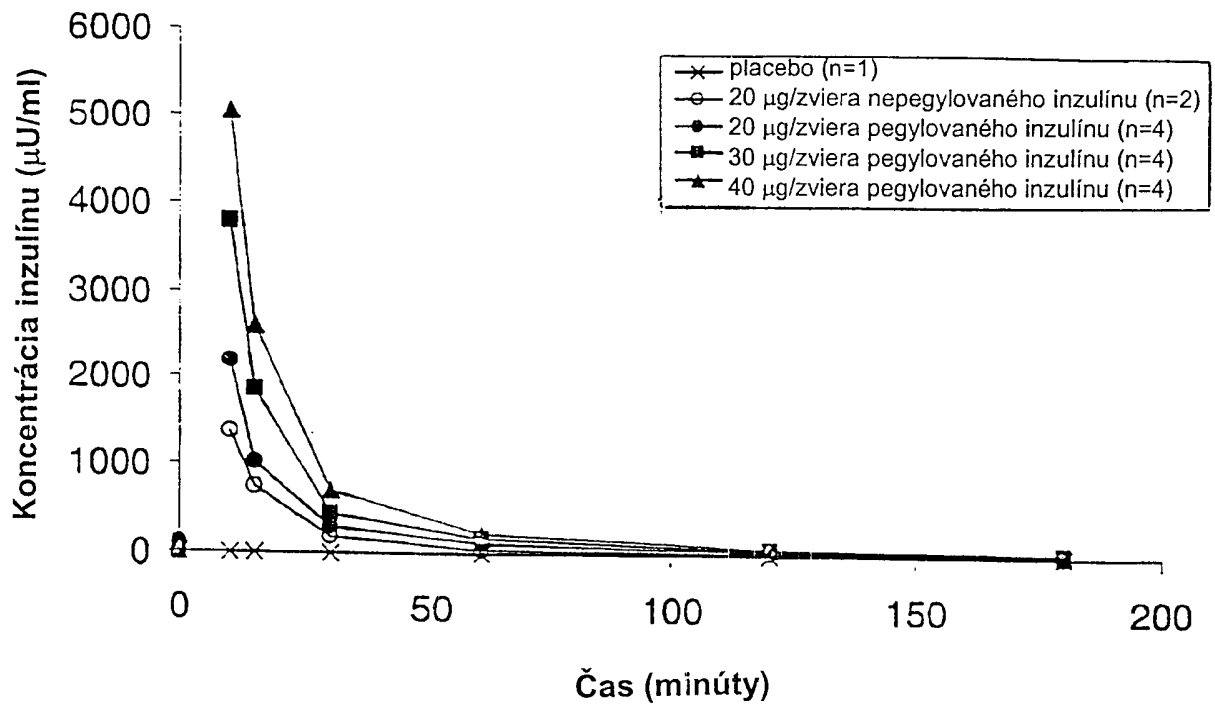
75. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že podávanie zahŕňa podávanie prípravku prostredníctvom nebulizátora.

76. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že prípravok zahŕňa farmaceuticky prijateľný excipient.

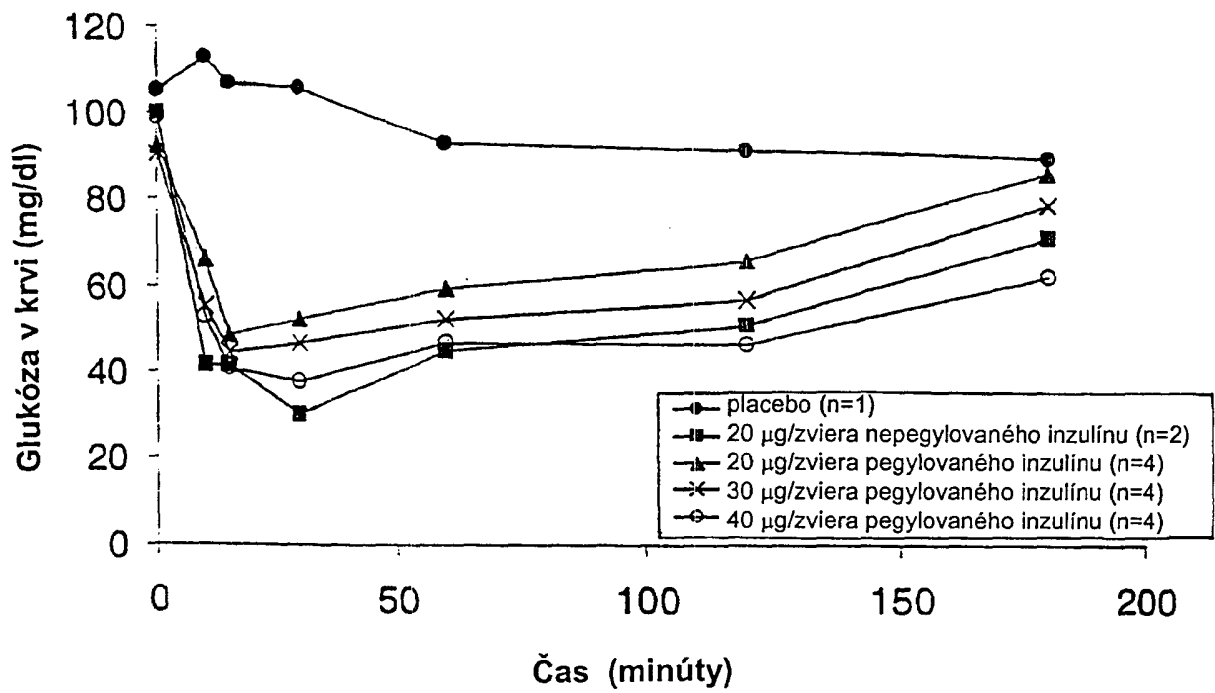
77. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že výsledkom podávania prípravku obsahujúceho uvedený konjugát sú sérové hladiny inzulínu aspoň 2-krát vyššie ako sú základné hladiny dosiahnuté do 1 hodiny po podaní.



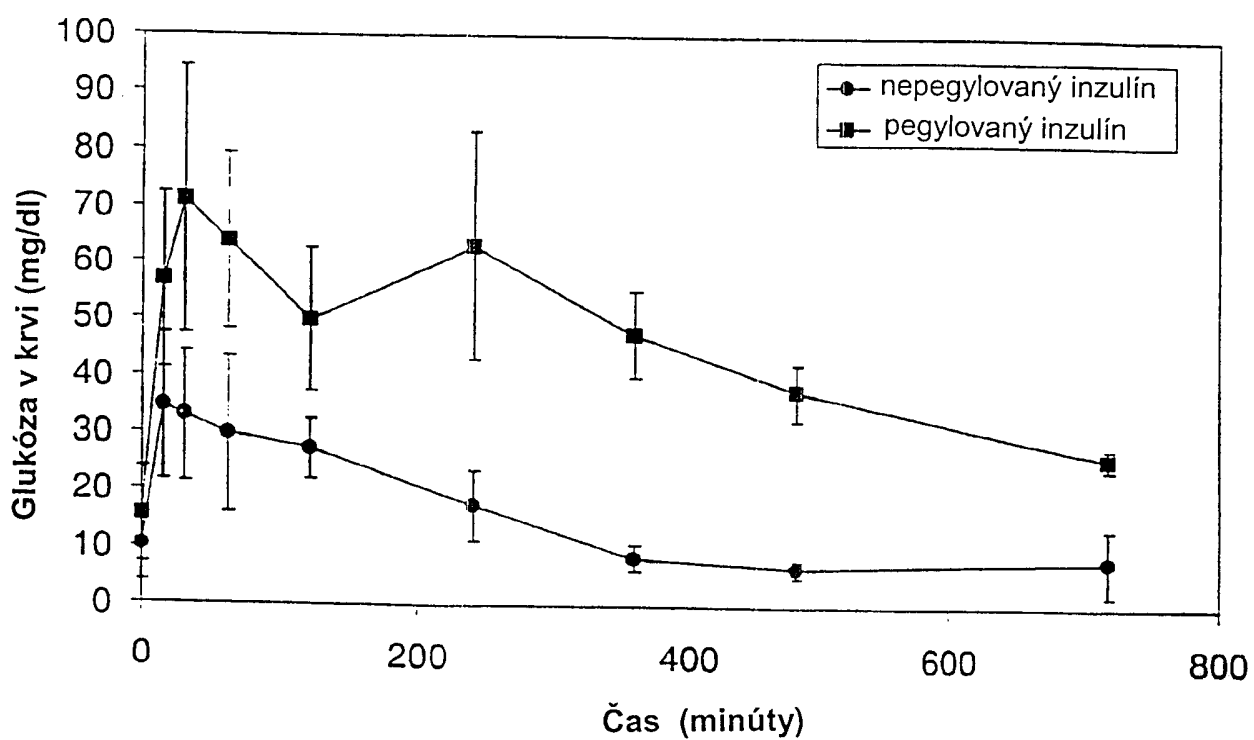
Obr. 1



Obr. 2

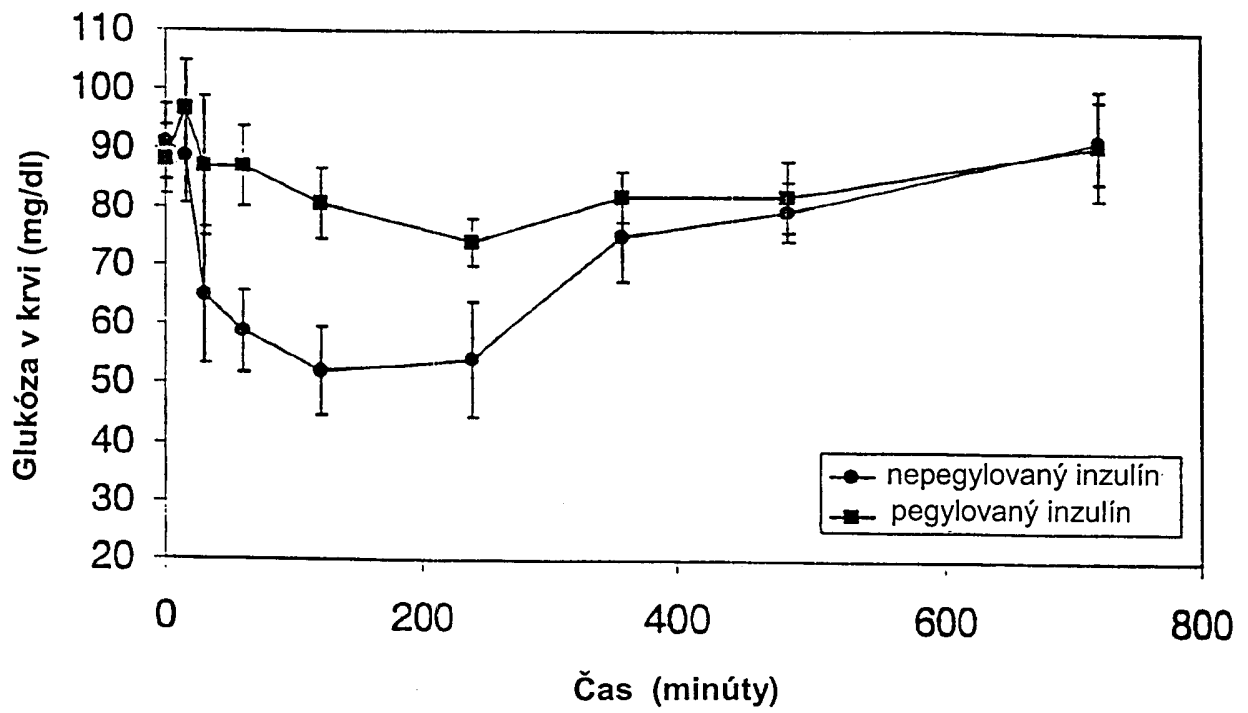


Obr. 3



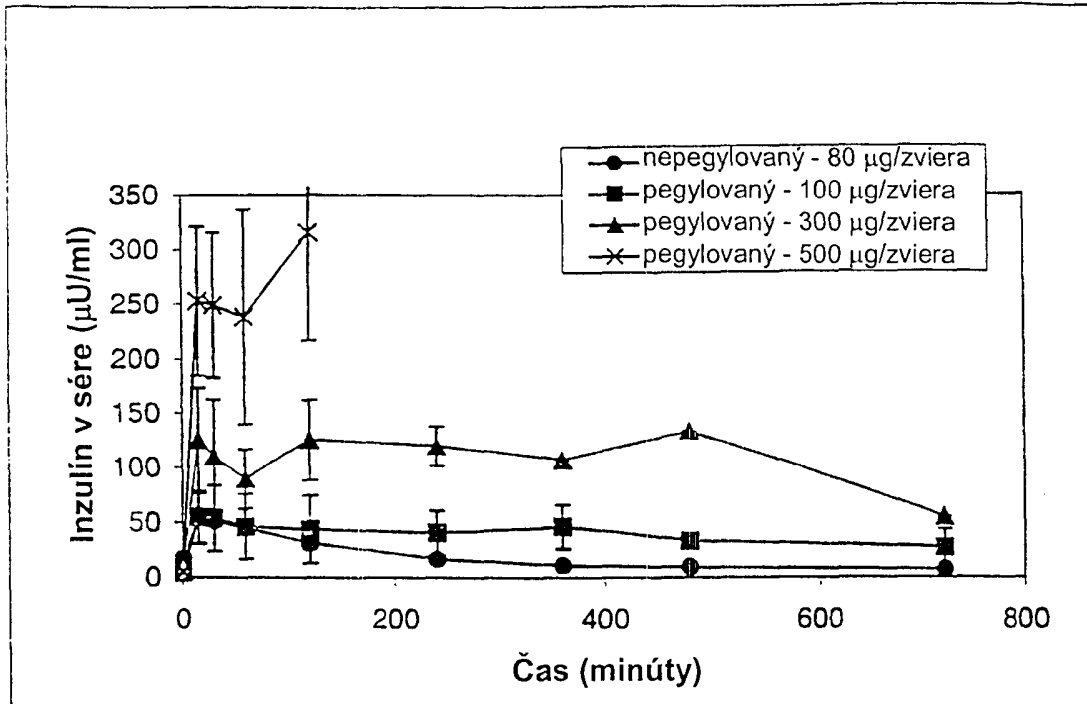
(● = 40 µg/zviera ; ■ = 150 µg/zviera)

Obr. 4

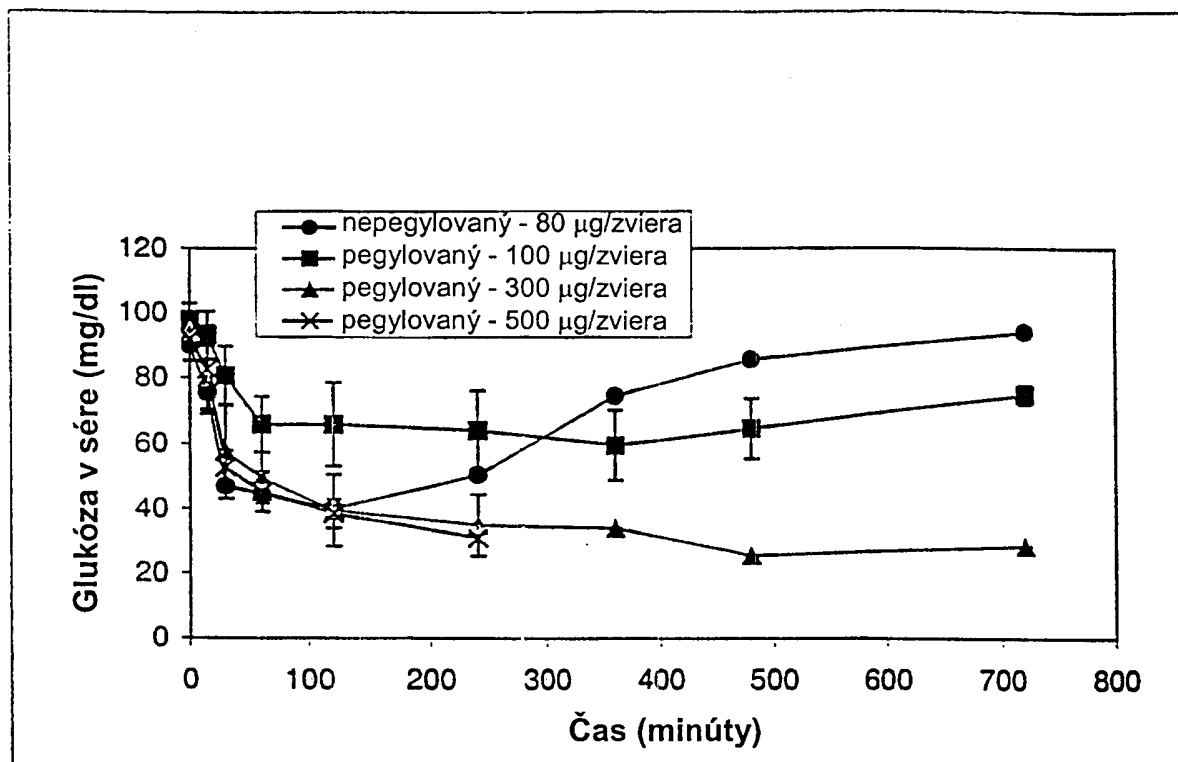


(● = 40 µg/zviera; ■ = 150 µg/zviera)

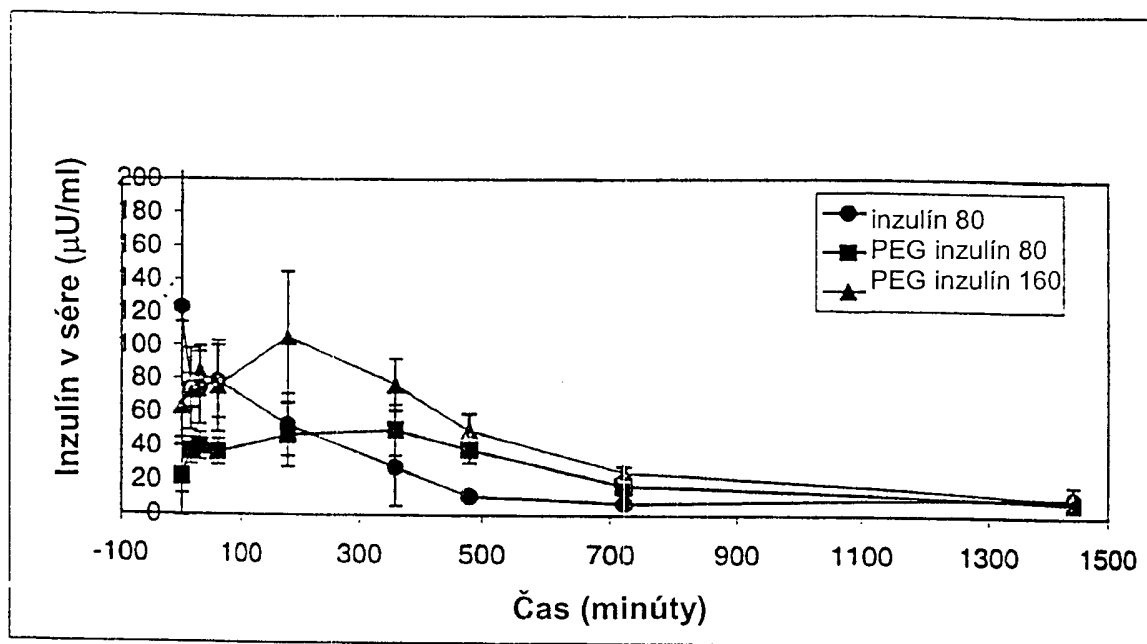
Obr. 5



Obr. 6

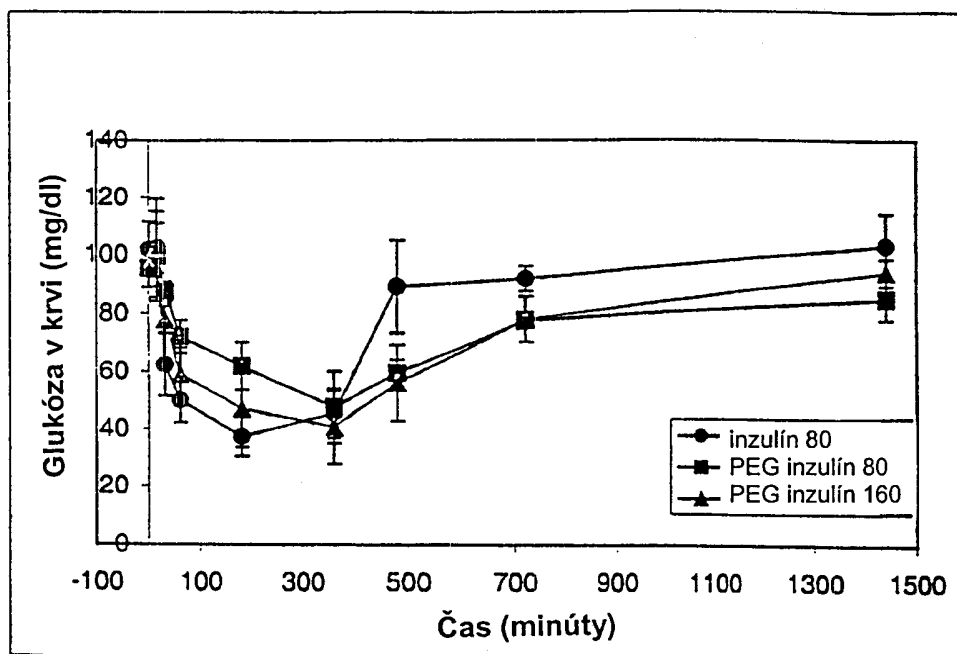


Obr. 7



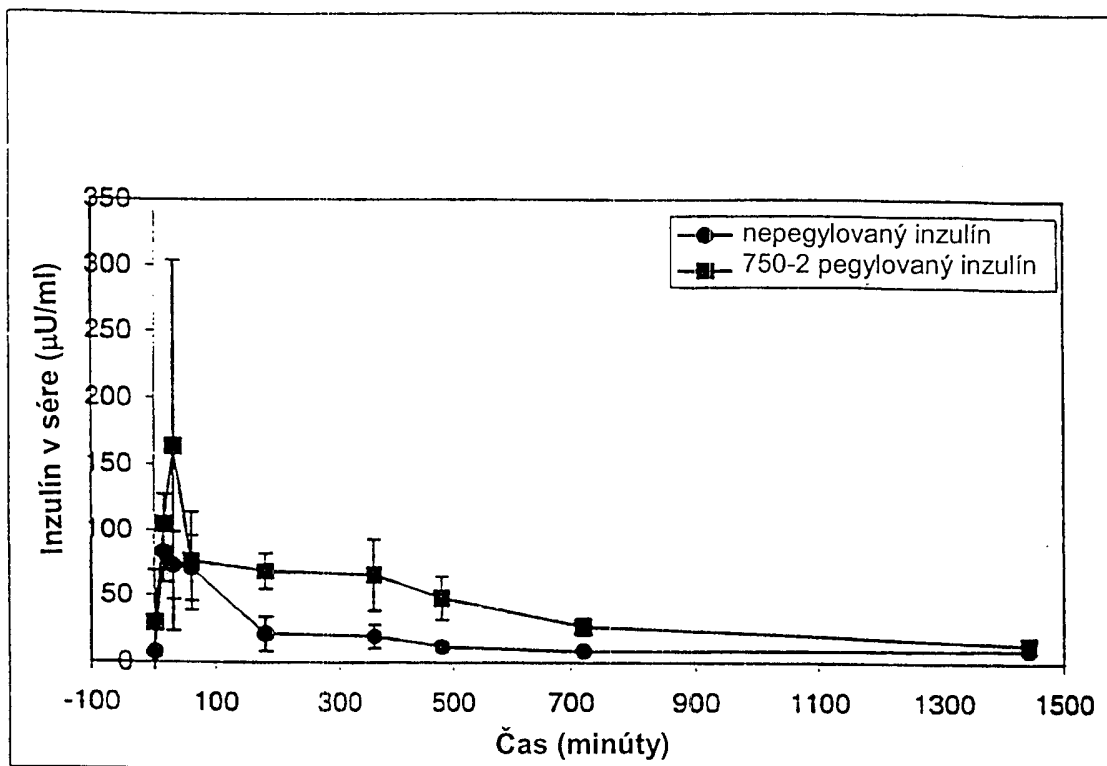
(● = 80 µg/zviera ; ■ = 80 µg/zviera ; ▲ = 160 µg/zviera)

Obr. 8



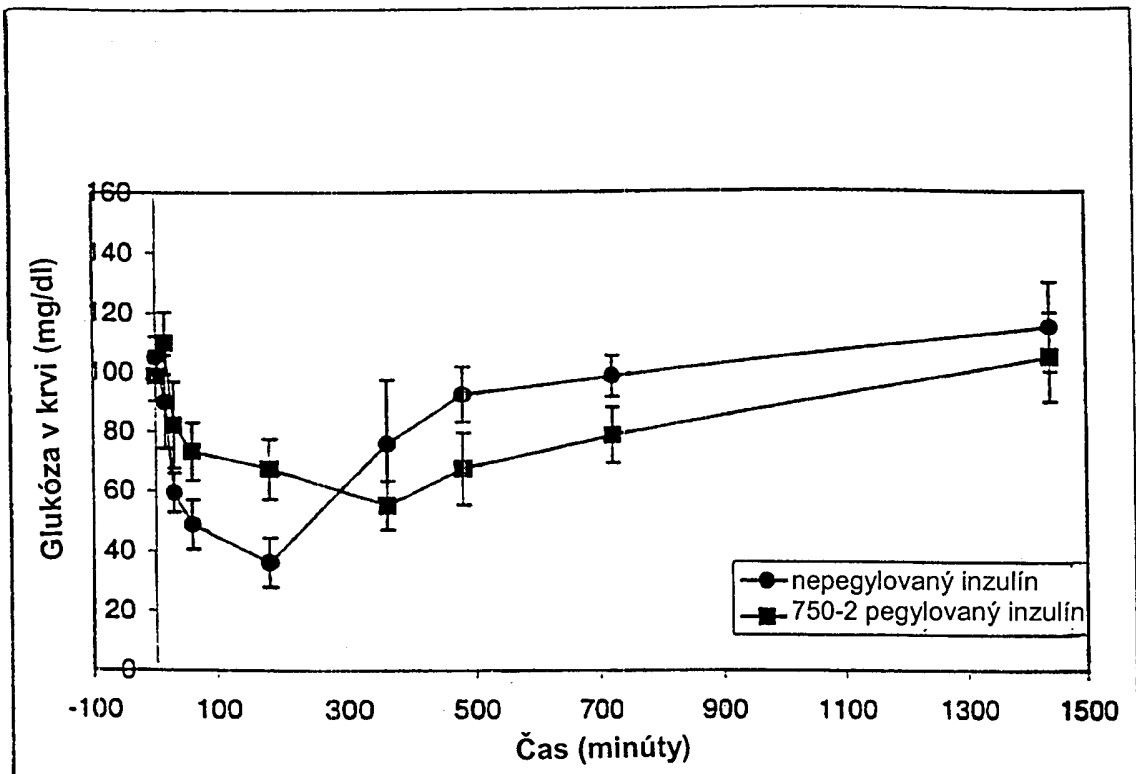
(● = 80 μ g/zviera ; ■ = 80 μ g/zviera ; ▲ = 160 μ g/zviera)

Obr. 9



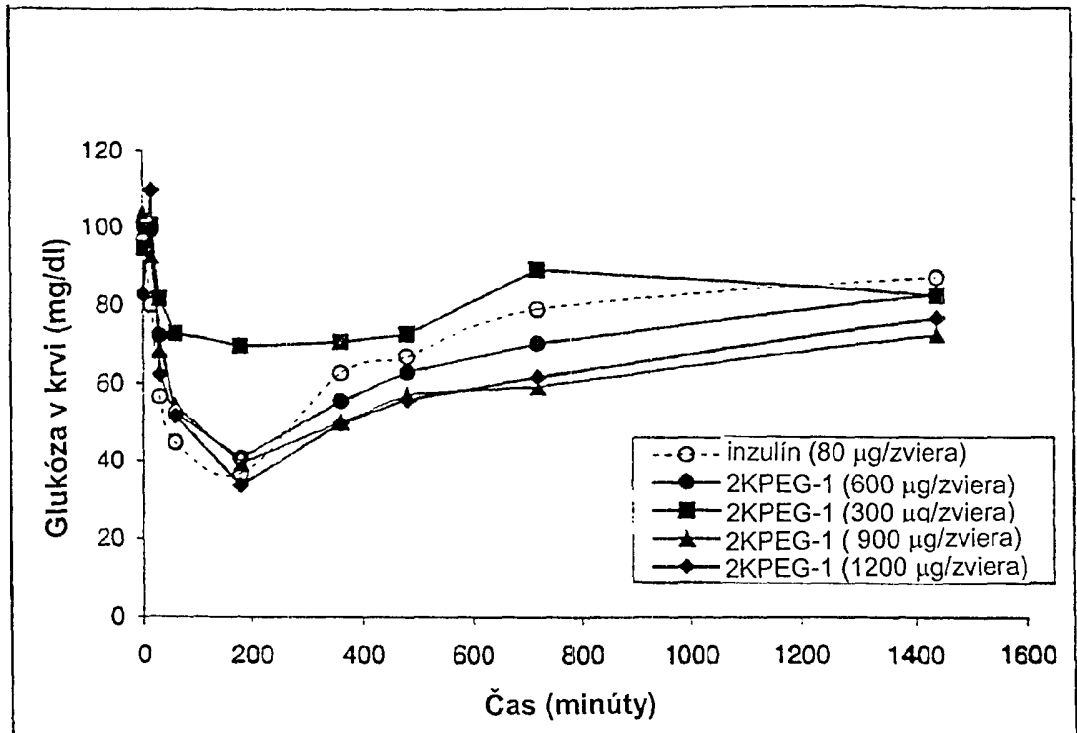
(● = 80 µg/zviera; ■ = 80 µg/zviera)

Obr. 10

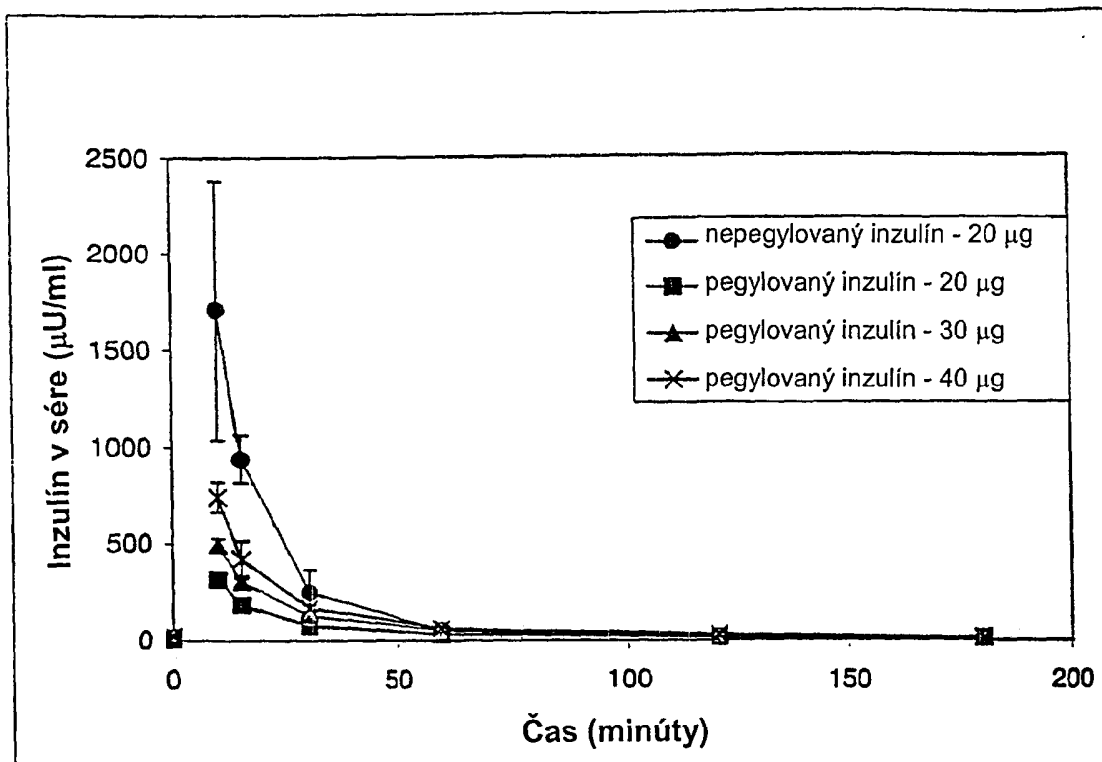


● = 80 µg/zviera ; ■ = 80 µg/zviera)

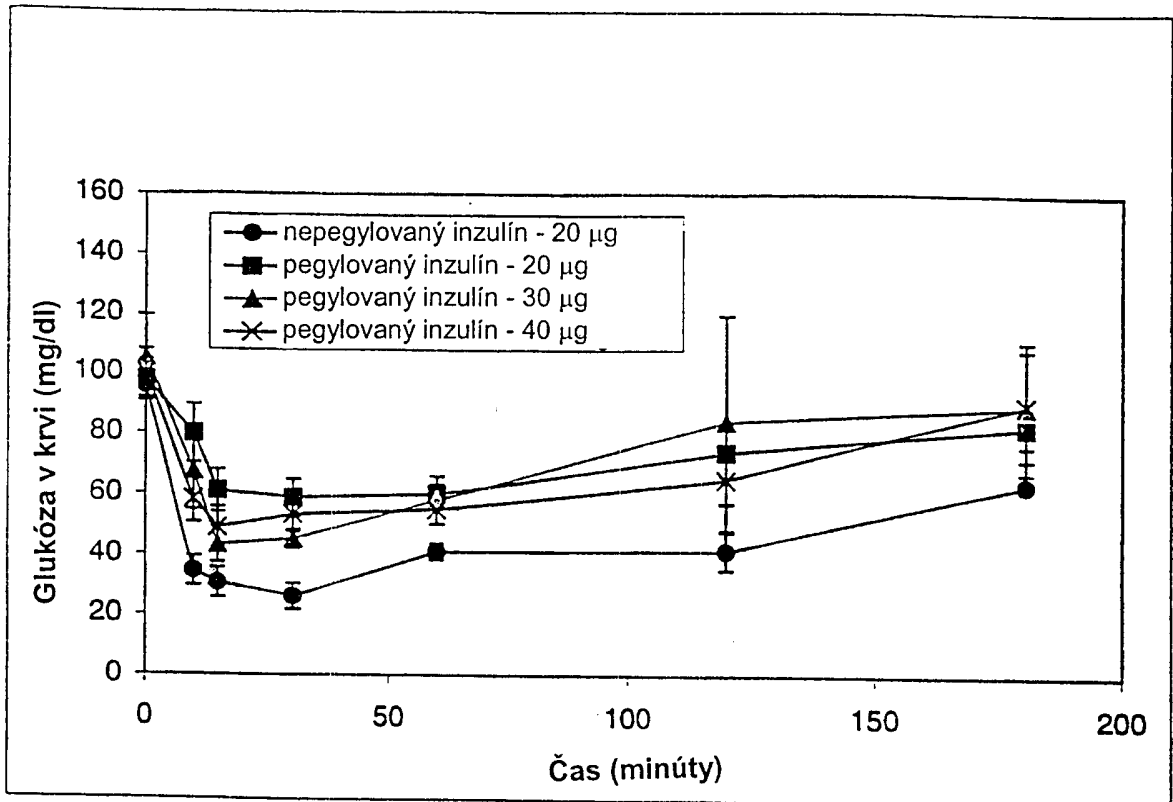
Obr. 11



Obr. 12



Obr. 13



Obr. 14