# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
**2000 - 1175**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
**C 07 K 14/62**
**A 61 K 38/28**
**A 61 P 3/10**

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.10.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **24.10.1997 04.11.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/1218 1997/064170**

(33) Země priority: **DK US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.05.2001**
**(Věstník č. 5/2001)**

(86) PCT číslo: **PCT/DK98/00461**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/21888**

(71) Přihlašovatel:
NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK;

(72) Původce:
Havelund Svend, Bagsvaerd, DK;
Balschmidt Per, Espergaerde, DK;
Jonassen Ib, Valby, DK;
Hoeg-Jensen Thomas, Klampenborg, DK;

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

## Ve vodě rozpustné agregáty insulinových derivátů charakterizované větší velikostí než aldolasa, farmakologické preparáty, farmakologická směs

(57) Anotace:

Ve vodě rozpustné agregáty derivátů lidského insulinu, které mají prodlouženou délku působení. Prodloužení působení rozpustných insulinových derivátů, kde mechanismus je založen na částečné nebo úplné tvorbě rozpustných agregátových forem derivátů, vyznačujících se větší velikostí než aldolasa (M. hmotn.=158 kDa) v definovaném gelovém systému. Použití pro výrobu léčiva k léčení diabetes mellitus.

CZ 2000 - 1175 A3

12.05.00
PV 2000-1175



Ve vodě rozpustné agregáty insulinových derivátů charakterizované větší velikostí než aldolasa, farmakologické preparáty, farmakologická směs ~~a způsob léčby~~.

## OBLAST TECHNIKY

Prezentovaný vynález se týká prodlouženého působení ve vodě rozpustných agregátů derivátů lidského insulinu, derivátů lidského insulinu schopných tvořit takové agregáty, farmaceutických prostředků je obsahujících a používaných k léčbě cukrovky.

## DOSAVADNÍ STAV TECHNIKY

Cukrovka je obecný termín pro poruchy u osob se zvýšeným vylučováním moči jako při diabetes mellitus a diabetes insipidus. Diabetes mellitus je metabolická porucha, při které je snížena nebo úplně ztracena schopnost utilizovat glukosu. Asi 2 % lidstva trpí cukrovkou.

Od objevení insulinu v roce 1920 vede stálý pokrok ke zlepšení léčby diabetes mellitus. K lepšímu zabránění extrémních glykemických hladin diabetici často praktikují mnohonásobnou injekční terapii, kdy je insulin podáván s každým jídlem. Mnoho diabetiků je léčeno několikrát denními insulinovými injekcemi v dietě zahrnující jedenkrát nebo dvakrát denní injekce zpomaleného insulinu k pokrytí bazální potřeby doplněné tabletovými injekcemi rychle působícího insulinu k pokrytí jídlem daných potřeb.

Zpomalené insulinové prostředky jsou dobře známy v technice. Jeden hlavní typ zpomalených insulinových prostředků obsahuje injektabilní vodnou suspenzi insulinových krystalů nebo amorfního insulinu. V těchto prostředcích jsou typicky využívanými insulinovými složkami protoaminový insulin, zinkový insulin a protaminový zinkový insulin.

Když je lidský nebo zvířecí insulin převeden do vysoce asociovaných forem např. za přítomnosti $Zn^{2+}$ iontů, je výsledkem vysrážení ve formě krystalů nebo amorfního produktu (Brange, Galenics of Insulin, pp. 20-27, Springer Verlag 1987). Tedy v pH 7 a použitím 6 $Zn^{2+}$/hexameru prasečího insulinu je ve výsledku insulin skoro úplně vysrážen z roztoku (Grant, Biochem J. 126, 433-440, 1972). Nejrozpustnější navrhované agregáty jsou složeny ze 4 hexametrických jednotek odpovídající molekulové hmotnosti asi 144 kDa. Blundell et al. (Diabetes 21 (Suppl. 2), 492-505, 1972) popisuje rozpustnou jednotku porcinového insulinu za přítomnosti $Zn^{2+}$ při pH 7 jako hexamer. Počáteční ultracentrifugační studie při pH 2 ukazují jako běžný druh insulinový dimer o M. hmtn. 12 kDa (Jeffrey, Nature 197, 1104-1105, 1963; Jeffrey, Biochemistry 5, 489-

498, 1966; Jeffrey, Biochemistry 5, 3820-3824, 1966). Fredericq, pracující při pH 8 a používající 0,4 až 0,8 % (hmotn.) $Zn^{2+}$ vzhledem k insulinu podává zprávu o molekulové hmotnosti 72 kDa odpovídající dodekamerické struktuře, a molekulové hmotnosti asi 200-300 kDa za použití 1% Zn (Arch. Biochem. Biophys. 65, 218-228, 1956). Obsáhlý přehled asociovaných stavů zvířecího insulinu je popsán v Blundell et al. (Adv. protein Chem. 26, 297-330, 1972).

S použitím insulinových suspenzí se spojují jisté nevýhody. Tudíž pro zajištění přesného dávkování musí být insulinové částice suspendovány homogenně opatrným mícháním před odebráním určitého objemu suspenze z ampulek nebo vytlačení ze zásobníku. Pro skladování insulinových suspenzí musí být také teplotní limit omezenější než pro insulinové roztoky , aby bylo zabráněno tvoření shluků nebo koagulaci.

Zatímco se dříve věřilo, že protaminy jsou neimunogenní, teď se ukázalo, že protaminy mohou být imunogenní u lidí a že jejich použití pro medicinální účely může vést ke tvorbě protilátek (Sanuel et al., Studies on the immunogenicity of protamines in humans and experimental animals by means of a micro-complement fixation test, Clin. Exp. Immunol. 33, pp. 252-260 (1978)).

Také bylo objeveno, že protaminový-insulinový komplex je sám o sobě imunogenní (Kortz et al., Circulating IgG antibody to protamine in patients treated with protamine-insulins. Diabetologica 25, pp. 322-324 (1983)). Proto se tedy musí někteří pacienti vyvarovat užívání insulinových prostředků s prodlouženým působením obsahující protaminy.

Jiný typ insulinových prostředků s prodlouženým působením jsou roztoky mající hodnotu pH níže než je fyziologická hodnota pH, ze které bude insulin vysrážen se zvýšením hodnoty pH, při injektování roztoku. Nevýhoda je, že pevné insulinové částice působí jako lokání dráždidlo způsobující zánět tkáně v místě injekce.

WO 91/12817 (Novo Nordisk A/S) objevuje rozpustné insulinové prostředky s prodlouženým působením obsahující insulinové komplexy kobaltu (III). Prodloužení působení těchto komplexů je pouze přechodná a biologická dosažitelnost je redukována.

Rozpustné insulinové deriváty obsahující lipofilní substituenty připojené k ε-aminoskupině lysinových reziduí ve všech pozicích od B26 do B30, což bylo popsáno např. v WO 95/07931 (Novo Nordisk A/S), WO 96/00107 (Novo Nordisk A/S) a WO 97/31022 (Novo Nordisk A/S). Takové deriváty mají prodloužené působení po podkožní injekci ve srovnání s rozpustným lidským insulinem, a toto prodloužené působení bylo vysvětleno jako vratné navázání na albumin v kůži, v krvi a v povrchových tkáních (Markussen, Diabetologia 39, 281-288, 1996; Kurzhals, Biochem J. 312, 725-731, 1995; Kurzhals, J. Pharm Sciences 85, 304-308, 1996; and Whittingham, Biochemistry 36, 2826-2831, 1997).

Avšak teď byl objeven nový mechanismus prodlužování působení některých rozpustných insulinových derivátů. Nový mechanismus je založen na částečné nebo úplné formaci agregátových forem derivátů vyznačujících se větším rozměrem než aldolasa (M.hmotn.=158kDa) v definovaném gelovém filtračním systému.

## PODSTATA VYNÁLEZU

Exprese "insulinových derivátů" zde používané (a příbuzné exprese) se týkají lidského insulinu nebo jeho analogů, ve kterých je nejméně jeden organický substituent vázán k jedné nebo více aminokyselinám.

"Analogem lidského insulinu", jak je zde použito, (a příbuzné exprese) se myslí lidský insulin, ve kterém byla jedna nebo více aminokyselin deletována nebo nahrazena jinými aminokyselinami zahrnujícími nekódované aminokyseliny, nebo lidský insulin obsahující přídatné aminokyseliny, to jest více než 51 aminokyselin.

Prezentovaný vynález je založen na objevu nové agregátové a rozpustné formy insulinových derivátů. Nové rozpustné agregátové formy insulinových derivátů disociují pomalu po podkožní injekci, což je vhodné pro insulinové preparáty s prodlouženým působením a jejichž výhodou je, že preparát neobsahuje sraženiny. Výhodami rozpustných preparátů před suspenzemi je vysoká přesnost dávkování bez míchání ampulek nebo zásobníků, dávka pro tenčí jehlu způsobující menší bolest při injekci, lehčí náplň ampulek nebo zásobníků a vyvarování se kuliček v zásobníku používaných pro rozpuštění sraženin za nepřítomnosti vzduchu.

Prezentovaný vynález se specielně týká ve vodě rozpustných agregátů insulinových derivátů charakterizovaných větší velikostí než aldolasa, lépe větší než ferritin, jak bylo určeno gelovým filtračním systémem jak je zde specifikováno.

Agregáty podle vynálezu mají zejména jasný objem odpovídající $K_{av}$ hodnotě menší než 0,32, lépe menší než 0,2; jak bylo určeno gelovou filtrací za použití Sephacryl S-300 HR gel nebo $K_{av}$ hodnotě menší než 0,5; lépe menší než 0,4; jak bylo určeno gelovou filtrací za použití Superose 6HR gel.

Agregáty jsou lépe rozpustné při pH v rozmezí 6,8 až 8,5.

Nové agregátové formy mohou být pozorovány pro insulinové deriváty mezi podmínkami, kde je existence hexamerů známá pro většinu insulinů. V preferované podstatě jsou agregátové formy tvořeny hexametrickými jednotkami, nejméně 4, lépe 5 až 50, ještě lépe 5 až 200. Všechny hexametrické jednotky agregátových forem tohoto vynálezu mohou mít všechny známé $R_6$, $R_3T_3$ nebo $T_6$ struktury (Karsholm, Biochemistry 28, 4427-4435, 1989).

U substancí jako $Zn^{2+}$ a sloučenin fenolu známých stabilizací hexamerických jednotek byla také nalezena schopnost stabilizace nových agregátových forem některých insulinových derivátů.

Stavebními bloky formujícími agregáty mohou být hexamerické jednotky známé z X-paprskového krystalografického určení struktur insulinu (Blundell, Diabetes 21 (Suppl.2), 492-505, 1972). Ionty jako $Zn^{2+}$ známé jako stabilizátory hexamerických jednotek jako 2 nebo 4 $Zn^{2+}$/hexamer komplexy (Blundell, Diabetes 21 (Suppl. 2), 492-505,1972), jsou nepostradatelné pro formaci agregátů pro některé deriváty jako $Lys^{B29}$ ($N^{\varepsilon}$ ω-karboxyheptadekanoyl) des(B30) lidského insulinu. Obr.2 ukazuje gelovou filtraci $Lys^{B29}$ ($N^{\varepsilon}$ ω-karboxyheptadekanoyl) des(B30) lidského insulinu v systému zde popisujícím preparáty obsahující 0, 2 a 3 $Zn^{2+}$/hexamer. V nepřítomnosti $Zn^{2+}$ nejsou agregáty tvořeny, eluční pozice určují přítomnost monomeru nebo dimeru. Agregáty podle vynálezu obsahují nejméně 2 ionty zinku, lépe 2 až 5, zvláště 2 nebo 3 ionty zinku na 6 molekul insulinových derivátů. Avšak agregáty obsahují příznivě nejméně 3 molekuly fenolových sloučenin na 6 molekul insulinového derivátu. V centrální dutině 2 $Zn^{2+}$/hexamerové struktury poskytuje 6 reziduí $Glu^{B13}$ vazebná místa pro nejvíce 3 $Ca^{2+}$ ionty (Sudmeier et al., Science 212, 560-562, 1981). Přídavek $Ca^{2+}$iontů stabilizuje hexamery a může být přidán do farmaceutických formulací za podmínek, že jsou deriváty insulinu odstraněny z roztoku.

Poločas agregátů tohoto vynálezu po podkožní injekci u lidí je stejný nebo delší než u preparátu lidského insulinu NPH:

V zvláště preferované podstatě prezentovaného vynálezu jsou agregáty složeny z insulinových derivátů, které se váží na albumin, který je nižší než $Lys^{B29}$($N^{\varepsilon}$tetradekanoyl)des(B30) lidského insulinu.

Preferované primární struktury insulinových derivátů využité v prezentovaném vynálezu jsou ty, ve kterých jsou:

a) rezidua B24-B30 B-řetězce insulinových derivátů v sekvenci Phe-X-X-X-X-X-X, kde každé X nezávisle reprezentuje všechny kódující aminokyseliny nebo delece;
b) rezidua B25-B30 B-řetězce insulinového derivátu je sekvence Phe-X-X-X-X-X, kde každé X nezávisle reprezentuje všechny kódující aminokyseliny nebo delece;
c) rezidua B26-B30 B-řetězce insulinového derivátu je sekvence Tyr-X-X-X-X, kde každé X nezávisle reprezentuje všechny kódující aminokyseliny nebo delece;
d) rezidua B27-B30 B-řetězce insulinového derivátu je sekvence Thr-X-X-X, kde každé X nezávisle reprezentuje všechny kódující aminokyseliny nebo delece;
e) rezidua B28-B30 B-řetězce insulinového derivátu je sekvence Pro-X-X, kde každé X nezávisle reprezentuje všechny kódující aminokyseliny nebo delece; nebo

f) rezidua B29-B30 B-řetězce insulinového derivátu je sekvence Lys-X, kde každé X nezávisle reprezentuje všechny kódující aminokyseliny nebo delece;

a zajišťují, že insulinové deriváty vykazují sílu nejméně 5 % jak je například stanoveno zkouškou volnými tukovými buňkami nebo afinitou k insulinovému receptoru.

Substituenty v lysinových zbytcích insulinového derivátu agregovaného podle vynálezu jsou zejména lipofilní skupiny obsahující od 6 do 40 uhlíkových atomů. Více preferovány jsou substituenty, které mají acylové skupiny obsahující od 6 do 40, lépe 12 až 36 uhlíkových atomů. Nejvíce preferovanými substituenty ve formě acylových skupin jsou: $CH_3$-$(CH_2)_n$-CO-, (COOH)-$(CH_2)_n$-CO-, ($NH_2$-CO)-$(CH_2)_n$-CO-, HO-$(CH_2)_n$-CO-, kde $4 \leq n \leq 38$.

V jiném preferovaném předmětu tohoto vynálezu je lipofilní substituent 5-α lithocholová kyselina nebo 5-β lithocholová kyselina.

V jiném preferovaném předmětu tohoto vynálezu jsou lipofilními substituenty 5-α nebo 5-β isomery cholové kyseliny, hyocholové kyseliny, deoxycholové kyseliny, chenodeoxycholové kyseliny, ursodeoxycholové kyseliny, hyodeoxycholové kyseliny nebo cholanikové kyseliny.

V jiném preferovaném předmětu je lipofilní substituent fusidová kyselina a deriváty fusidové kyseliny nebo glycyrrhetinové kyseliny.

V už jiném preferovaném předmětu je lipofilní substituent spojen s lysinovým zbytkem používajícím aminokyselinové spojení. Podle tohoto předmětu je lipofilní substituent vhodně spojen s lysinovým zbytkem přes γ nebo α-glutamyl, nebo přes β nebo α-aspartyl, nebo přes α-amido-γ-glutamyl nebo přes α-amido-β-aspartyl.

Prezentovaný vynález kromě toho poskytuje nové insulinové deriváty schopné formovat agregáty. Tyto insulinové deriváty mohou být poskytovány ve formě agregátů ve farmaceutických preparátech nebo mohou být alternativně poskytnuty v neagregátových formách ve farmaceutických preparátech, v takovém případě se agregátové formy tvoří po podkožní injekci zmíněných preparátů.

Stejně tak jde prezentovanému vynálezu o to, aby farmaceutické preparáty zahrnovaly agregáty insulinových derivátů nebo neagregátové insulinové deriváty, které formují agregáty po podkožní injekci.

Farmaceutické preparáty podle prezentovaného vynálezu zahrnují agregáty, zejména velké frakce, v kterých mají agregáty (nejlépe více ne 75 %) větší velikost než aldolasa jak je určeno gelovou filtrací za použití média preparátu jako eluentu.

V jiném předmětu je poskytován farmaceutický preparát zahrnující oba, agregátový a rychle působící insulinový analog, druhý preferovaný lidský insulin nebo insulinový analog $Asp^{B28}$

lidského insulinu, $Lys^{B28}Pro^{B29}$ lidského insulinu nebo des(B30) lidského insulinu. Takové preparáty budou poskytovat rychlí začátek působení a stejně tak prodloužený akční profil.

V tomto případě zahrnují farmaceutické preparáty zejména agregátový insulin a rychle působící insulin v molárním poměru 90:10 až 10:90.

Pomalá disociace agregátových forem může být také zpomalen *in vivo* přídavkem fyziologicky akceptovatelného činidla, které zvýší viskozitu farmaceutického preparátu. Farmaceutický preparát podle vynálezu může také zahrnovat činidlo, které zvýší viskozitu, nejlépe polyethylenglykol, polypropylenglykol, jejich kopolymery, dextrany a polyaktidy.

Farmaceutické preparáty také zahrnují pufrovací látky takové jako Tris, fosfát, glycin, glycylglycin (nebo jiné povrchově aktivní látky) pufry, isotonická činidla jako NaCl, glycerol, manitol a laktosa, fenol a *m*-kresol jako přísady. Společně to jsou pomocné látky farmaceutických preparátů, chlorid sodný se používá jako isotonické činidlo, fenol jako konzervační látka, zvláště důležitá pro podporu agregátů v přípravě a tím efektivně prodlouženému času rozkladu v místě působení. Farmaceutické preparáty podle vynálezu zahrnují zejména $Na^+$ ionty v koncentraci 10 až 150 mM.

Nejpreferovanější farmaceutické preparáty jsou preparáty obsahující 0,1 až 2 mM insulinového derivátu podle presentovaného vynálezu; 0,3 až 0,9 % Zn (hmtn. % vzhledem k insulinovému derivátu) a fenolytické sloučeniny jako je fenol nebo *m*-kresol nebo jejich směs v celkové koncentraci 5 až 50 mM a $Na^+$ ionty v koncentraci 10 mM až 150 mM.

Prezentovaný vynález se také týká metod léčby diabetes mellitus poskytující osobám, kteří potřebují takovou léčbu, efektivní množství ve vodě rozpustných agregátů insulinových derivátů podle vynálezu nebo efektivní množství insulinového derivátu podle vynálezu schopného formovat ve vodě rozpustné agregáty po podkožní injekci.

Insulinové deriváty tohoto vynálezu mohou být připraveny obecnými metodami popsanými v WO 95/07931 (Novo Nordisk A/S), WO 96/00107 (Novo Nordisk A/S), WO 97/31022 (Novo Nordisk A/S), PCT aplikace č. DK97/00296 (Novo Nordisk A/S), EP 511 600 (Kurakay Co. Ltd.) a EP 712 862 (Eli Lilly). Deriváty v tabulce 2 byly připraveny selektivní acylací ε-aminoskupiny Lys $^{B29}$ des(B30) lidského insulinu pomocí ligandů aktivovaných ve formě příslušných esterů N-hydroxysukcinamidu. Konjugované estery mohou být připraveny použitím konvenční peptidové chemie (obr.4).

Některé deriváty jsou uvedené ve výše zmíněných patentových aplikacích a jsou popsány v publikacích Markussen, Diabetologia 39, 281-288, 1996; Kurzhals, Biochem. J. 312, 725-731, 1995; Kurzhals, J Pharm. Sciences 85, 304-308, 1996; a Whittingham, Biochemistry 36, 2826-2831, 1997, jak je prodlouženo působení následkem albuminového vazebného mechanismu, a

tvoří skupinu schopnou tvořit vysokomolekulární rozpustné agregáty v souladu s prezentovaným vynálezem. $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholyl-γ-Glu) des(B30) lidského insulinu z WO 95/07931 a $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ ω-karboxyheptadekanoyl-) des (B30) lidského insulinu z WO 97/31022 jsou příklady insulinových derivátů schopných tvorby vysokomolekulárních rozpustných agregátů v neutrálním pH. Zde je selektivita mezi lipofilními substituenty v jejich schopností indukovat tvorbu agregátů. Dva isomery $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholyl-γ-Glu) des(B30) lidského insulinu a $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholyl-α-Glu) des(B30) lidského insulinu jsou pouze prvními formami agregátů použitých ve vyjádření v tabulce 1.

## PŘEHLED OBRÁZKŮ NA VÝKRESECH

Obr.1. Kalibrační křivka Kav hodnoty proti molekulové hmotnosti v gelovém filtračním systému používajícím kolonu Sephacryl S-300 HR ve vodném neutrálním eluentu obsahujícím 125 mM chlorid sodný a 20 mM fosforečnan sodný pH 7,4. Je pozorována počáteční lineární závislost mezi Kav a logaritmem molekulové hmotnosti. Standardy jsou uvedeny v tabulce 1.

Obr.2. Gelová filtrace $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ ω-karboxyheptadekanoyl-) des (B30) lidského insulinu má 0,2 a 3 $Zn^{2+}$/hexamer používající kolonu Sephacryl S-300 HR ve vodném neutrálním eluentu obsahujícím 125 mM chlorid sodný a 20 mM fosforečnan sodný pH 7,4 ukazující důležitost $Zn^{2+}$ pro tvorbu agregátů pro tyto deriváty. Kolona 28 x 1 cm je eluována rychlostí 15 ml/h. Insulinové deriváty byly injektovány (200μl) jak standardní preparáty obsahující 600 μM derivátu; 0,2 nebo 3 $Zn^{2+}$/6 molekul insulinu, 20 mM NaCl, 16 mM fenol, 16 mM *m*-kresol, 7 mM fosforečnan sodný při pH 7,5.

Obr.3. Gelová filtrace $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ ω-karboxyheptadekanoyl-) des (B30) lidského insulinu majícího 3 $Zn^{2+}$/hexamer používající kolonu Sephacryl S-300 HR ve vodném neutrálním eluentu obsahujícím 5 mM sodium fosfátový pufr pH 7,5; 10 mM chlorid sodný, 16 mM fenol, 16 mM *m*-kresol a 1,6% (hmotn./obj.) glycerol. Ve srovnání s obr. 2 objasňuje důležitost koncentrace chloridu sodného pro tvorbu agregátů tohoto derivátu.

Obr.4. Schéma syntézy konjugovaných ligandů.

## PŘÍKLADY PROVEDENÍ VYNÁLEZU

Agregátové formy jsou demonstrované gelovou filtrací používající gel s limitem do 1 500 kDa pro globulární proteiny a do 400 kDa pro lineární dextrany. Vodný neutrální pH sytém je použit v gelové filtraci a insulinové deriváty v agregátové formě jsou aplikovány do kolony ve formě

farmaceutických preparátů v koncentraci 600 nmol insulinu/ml. Agregátové formy insulinových derivátů jsou eluovány před aldolasou, která má molekulovou hmotnost 158 kDa.

Gelový filtrační experiment používají podmínky popsané v této sekci je řízen fyzikálně chemickými metodami k odhalení potencionálních agregátových forem insulinových derivátů. Rozklad po podkožní injekci v prasatech ukazuje kombinaci albuminové vazby a polymeračních vlastností insulinového derivátu vedle různých biologických faktorů.

Tvorba vysokomolekulárních rozpustných agregátů je demonstrována gelovou filtrací používající kolonu Sephacryl S-300 HR ve vodném neutrálním eluentu obsahujícím 125 mM chlorid sodný a 20 mM fosforečnan sodný pH 7,4. Tento pufrovací systém byl vybrán k napodobení iontové síly a pH tkání, aby byl schopen detekovat deriváty agregované podmínkách podobných těm po podkožním vpravení. Evidentně v jiném pufrovacím systému mající nižší koncentraci chloridu sodného nebo nižší nebo vyšší pH hodnotu nemusí se deriváty vyskytovat v agregované formě. Avšak, když má být posouzen aktuální stav agregátů ve farmaceutických preparátech je médium preparátů, zejména $Zn^{2+}$, který váže insulin, použito jako eluent pro gelovou filtraci.

Kolona 28 x 1 cm je eluována rychlostí 15 ml/h. Insulinové deriváty byly injektovány (200µl) jako standardní přípravky obsahující 600 µM derivátu, 200 nebo 300 µM $Zn^{2+}$, 20 mM NaCl (nebo různě), 16 mM fenol, 16 mM *m*-kresol, 7 mM fosfátový pufr pH 7,5.

Omezený limit Sephacryl S-300 HR je určen výrobcem Pharmacia, jako molekulová hmotnost 1 500 kDa pro globulární proteiny a 400 kDa pro lineární dextrany. V praxi eluce rozpustných látek rozdílné velikosti je charakterizováno dostupným objemem jak $K_{AV}$ hodnotami:

$$K_{AV}=(V_E-V_0)/(V_T-V_0)$$

kde $V_E$ je eluční objem, $V_0$ je nultý objem, např. luční objem modrého dexranu, $V_T$ je celkový objem. $K_{AV}$ hodnota je nezávislá na rozměru kolony. V tomto systému je aldolasa (M.hmotn.158 kDa) eluována při $K_{AV}$ asi 0,32, albumin (M.hmotn. 67 kDa) při $K_{AV}$ asi 0,38; a monomerická forma insulinu (M.hmotn. 6 kDa) s $K_{AV}$ asi 0,71. Kalibrace kolony používá sérii standardů molekulové hmotnosti vyskytujících se v lineární závislosti mezi $K_{AV}$ a logaritmem molekulové hmotnosti obr.1.

Tabulka 1. $K_{AV}$ hodnota, albumin vazebné konstanty a poločas rozkladu asociovaných insulinových derivátů větších než aldolasa (M.hmotn. 158 kDa), neasociované insulinové deriváty menší než aldolasa a standardy používané jako markery molekulové velikosti. Albumin vazebné konstanty a poločas rozkladu v prasatech byly normalizovány na použití $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$

tetradekanoyl-) des (B30) lidského insulinu jako referentní sloučeny. Rozklad $T_{50\%}$ pro NPH insulin v prasatech byl měřen 10,5 hodiny (Markussen et al. 1996).

| Sloučeniny | $K_{AV}$ | Albumin vazebná $K_{ass}$ $(mol/l)^{-1}$ | Rozklad $T_{50\%}$, (h) |
|---|---|---|---|
| **Asociované deriváty lidského insulinu tvořící agregáty větší než aldolasa**** | | | |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholyl-γ-Glu-) des (B30) | 0,04* | $0,3x10^5$ | 22,8 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ ω-karboxyheptadekanoyl) des(B30) | 0,05 | $25x10^5$ | 18,7 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ ω-karboxynonadekanoyl) des(B30) | 0,04 | $36x10^5$ | 21,9 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ cholesteryloxykarbonyl) | 0,00 | | |
| **Neasociované deriváty lidského insulinu tvořící agregáty menší než aldolasa**** | | | |
| Lidský insulin*** | 0,61 | 0 | (2) |
| Lidský insulin (bez zinku) | 0,72 | | |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholyl) (bez zinku) | 0,74 | | |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ dekanoyl) *** | 0,67 | $0,06x10^5$ | 5,1 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ tetradekanoyl) des(B30) | 0,51 | $1,0x10^5$ | 14,3 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholyl-α-Glu-) des(B30) | 0,53 | $0,3x10^5$ | 11,8 |
| **Standardy**** | | | |
| B9Asp, B27Glu lidský insulin (monometrický, M. hmotn 6 kDa) | 0,71 | 0 | (1) |
| Ribonukleasa (M.hmotn. 13,7 kDa) | 0,63 | | |
| Albumin (M.hmotn. 67 kDa) | 0,38 | | |
| Aldolasa (M.hmotn. 158 kDa) | 0,32 | | |
| Katalasa (M.hmotn. 232 kDa) | 0,30 | | |
| Ferritin (M.hmotn. 440 kDa) | 0,19 | | |
| Thyroglobulin (M.hmotn. 669 kDa) | 0,08 | | |

*75 % derivátů je eluováno v hlavním píku a 25 % v pozici monomeru nebo dimeru.

**Aplikováno 200 μl vzorku jako farmaceutického preparátu obsahujícího 600 μM derivátu, 200 μM $Zn^{2+}$, 0 až 20 mM chloridu sodného, 7 mM fosforečnan sodný, 16 mM fenol, 16 mM *m*-kresol, 1,6% glycerol a pH 7,5.

***Stejně jako **, ale 300 μl $Zn^{2+}$.

****Standardy aplikovány rozpuštěné ve vodě.

Příklady insulinových derivátů schopných tvořit rozpustné vysokomolekulární agregáty a majících prodloužené působení založeném na zejména na těchto vlastnostech jsou $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholyl-γ-Glu-) des (B30) lidského insulinu v tab.1. Zejména poměr mezi poločasem rozpadu a albumin vazebnou konstantou je vysoký pro tuto třídu sloučenin. Příklady insulinových derivátů neschopných tvořit rozpustné vysokomolekulární agregáty, ale majích prodloužené působení založené na albumin vazebných vlastnostech jsou $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholyl-γ-Glu-) des (B30) lidského insulinu a $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ -tetradekanoyl-) des (B30) lidského insulinu, tab.1. Zejména poměr mezi poločasem rozkladu a albumin vazebnou konstantou je pro tuto třídu sloučenin nízký.

V WO 97/31022 a farmaceutické přípravě $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ ω-karboxyheptadekanoyl) des(B30) lidského insulinu byl formulován obsah 600 nmol/ml derivátu, 5 mM sodium fosfátového pufru pH 7,5; 10 mM chlorid sodný, 16 mM fenol, 16 mM *m*-kresol, 2 až 3 $Zn^{2+}$/hexamer a 1,6 % (hmotn./obj.) glycerolu. Ke stabilizaci stupně agregace v této formulaci byla gelová filtrace provedena použitím stejné kolony, jak je popsáno výše, ale s použitím média preparátu jako eluentu. $Zn^{2+}$ jsou většinou insulin vazné a proto nejsou brány za základní složku média. Zatímco eluent obsahuje fenolové látky, koncentrace derivátu ve frakcích je monitorována HPLC, obr.3. $K_{AV}$ hodnota okolo 0,45 ukazuje, že hexamerické nebo dodekamerické jednotky v preparátech převažují, např nevysokomolekulární agregáty insulinových derivátů byly prezentovány v publikovaných formulacích.

K měření způsobilosti insulinových derivátů tvořících rozpustné vysokomolekulární agregáty byly vyvinuta alternativní metoda vhodná pro HPLC vybavení. Rozměry kolony, injekční objem a průtoková rychlost koresponduje s první metodou, kde teplota vzrostla na 37 °C a fosfátový pufr byl vyměněn trishydroxymethylaminomethan hydrochloridem a přidán chlorid sodný. Agregátové formy insulinu jsou eluovány před aldolasovými standardy gelové filtrace jako v první metodě.

$K_{AV}$ hodnoty jsou ukázány pro dvě hladiny zinku v tabulce 2. Srovnání s referencí, $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ tetradecanoyl-) des(B30) insulinu, časově dlouhé čerpání z podkožní zásoby je v souladu s tendencí insulinového derivátu tvořit velké agregáty.

Tabulka 2. Agregáty insulinových derivátů měřené metodou gelové filtrace 2.

| Sloučeniny | $K_{AV}$ (Superose 6HR)[2)] | | Albumin. vazba | Rozklad u prasat [1)] |
|---|---|---|---|---|
| | $2Zn^{2+}/6$ ins | $3Zn^{2+}/6$ ins | $K_{ass}$ ($10^5 M^{-1}$) | $T_{50\%}$(h) |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholoyl-γ-Glu-) des (B30) HI | 0,00 | -0,01 | 0,33 | 22,8 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ deoxycholoyl-γ-Glu-) des (B30) HI | 0,20 | 0,07 | 0,03 | 13,9 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholoyl-α-amido-γ-Glu-) des (B30) HI | -0,02 | 0,00 | 0,23 | >34 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholoyl-β-Asp-) des (B30) HI | 0,18 | 0,11 | n.d. | n.d. |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholoyl-β-Ala-) des (B30) HI | 0,00 | 0,13 | n.d. | n.d. |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholoyl-γ-aminobutanoyl-) des (B30) HI | 0,06 | 0,00 | n.d. | n.d. |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ lithocholoyl -) des (B30) HI | -0,01 | 0,23 | 0,38 | >34 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ dehydrolithocholoyl) des (B30) HI | 0,05 | 0,03 | 0,26 | >34 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ cholanoyl) des (B30) HI | 0,40 | 0,17 | 0,48 | 20,1 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$ hexadekanoyl-α-amido-γ-Glu-) des (B30) HI | 0,38 | 0,41 | 0,56 | 15,3 |
| $Asp^{A21}Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$tetradekanoyl-)des (B30) HI | 0,55 | 0,46 | 0,97 | 16,4 |
| $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$tetradekanoyl-)des (B30) HI | 0,58 | 0,56 | 1,00 | 14,3 |
| Lidský insulin, (HI) | 0,64 | 0,64 | - | 2 |
| **Standardy** | | | | |
| $Asp^{B9}Glu^{B27}$ HI (monomer, M.hmotn. 6 kDa | 0,73 | | | |
| Ribonukleasa (M.hmotn. 13,7 kDa) | 0,72 | | | |
| Ovalbumin (M.hmotn. 43 kDa) | 0,58 | | | |
| Aldolasa (M.hmotn. 158 kDa) | 0,50 | | | |
| Ferritin (M.hmotn. 440 kDa) | 0,40 | | | |
| Thyroglobulin (M.hmotn. 669 kDa) | 0,28 | | | |

[1)]Vztažena na $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$tetradekanoyl-) des (B30) lidského insulinu ($T_{50\%}$=14,3 h)

[2)]Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia Biotech) je eluována při 37°C chloridem sodným 140 mM, trishydroxymethylaminomethan 10 mM, azid sodný 0,02% a kyselina chlorovodíková do pH 7,4. Doba analýzy 90 min. (0,25 ml/min.) je následována promývací periodou 150 min. (0,5 ml/min.). Injekční objem je 200 µl.

12.05.00
PV 2000-1175



# PATENTOVÉ NÁROKY

1. Ve vodě rozpustné agregáty insulinových derivátů charakterizované větší velikostí než aldolasa, jak bylo stanoveno gelovým filtračním systémem a specifikováno výše.
2. Agregát podle nároku 1 charakterizovaný větší velikostí než ferritin, jak bylo stanoveno gelovým filtračním systémem a specifikováno výše.
3. Agregát podle nároku 1 mající definovaný objem odpovídající $K_{AV}$ hodnotě menší než 0,32; lépe 0,2; jak bylo stanoveno gelovou filtraci za použití Sephacryl S-300 HR gel.
4. Agregát podle nároku 1 mající definovaný objem odpovídající $K_{AV}$ hodnotě menší než 0,50; lépe menší než 0,40, jak bylo stanoveno gelovou filtrací používající Superose 6HR gel..
5. Agregát podle některého z nároků 1 až 4 charakterizovaný rozpustností při pH 6,8 až 8,5.
6. Agregát podle některého z nároků 1 až 5 složený v podstatě z hexamerických podjednotek insulinových derivátů.
7. Agregát podle nároku 6 složený nejméně ze 4, lépe z 5 až 50, ještě lépe z 5 až 200 spojených hexamerických podjednotek.
8. Agregát podle některého z nároku 1 až 7 obsahující nejméně 2 zinkové ionty, lépe 2 až 5 zinkových iontů, ještě lépe 2 až 3 zinkových iontů na 6 molekul insulinového derivátu.
9. Agregát podle některého z nároků 1 až 8 charakterizovaný nejméně 3 molekulami fenolové sloučeniny na 6 molekul insulinového derivátu.
10. Agregát podle některého z nároků 1 až 9 mající poločas rozkladu po podkožní injekci podané člověku stejně dlouhý nebo delší než u preparátu lidského insulinu NPH.
11. Agregát podle některého z nároků 1 až 10, ve kterém jsou insulinové deriváty vázané k albuminu a jsou nižší než $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$-tetradekanyl)des(B30) lidského insulinu
12. Agregát podle některého z nároků 1 až 11, ve kterém rezidua B24-B30 řetězce B insulinového derivátu je sekvence Phe-X-X-X-X-X, kde každé X nezávisle reprezentuje všechny aminokyseliny nebo delece a nejméně jedno X je $N^{\varepsilon}$-substituovaný lysinový zbytek.
13. Agregát podle některého z nároků 1 až 12, ve kterém rezidua B25-B30 řetězce B insulinového derivátu je sekvence Phe-X-X-X-X-X, kde každé X nezávisle reprezentuje všechny aminokyseliny nebo delece a nejméně jedno X je $N^{\varepsilon}$-substituovaný lysinový zbytek.
14. Agregát podle některého z nároků 1 až 13, ve kterém rezidua B26-B30 řetězce B insulinového derivátu je sekvence Tyr-X-X-X-X, kde každé X nezávisle reprezentuje všechny aminokyseliny nebo delece a nejméně jedno X je $N^{\varepsilon}$-substituovaný lysinový zbytek.

15. Agregát podle některého z nároků 1 až 14, ve kterém rezidua B27-B30 řetězce B insulinového derivátu je sekvence Thr-X-X-X, kde každé X nezávisle reprezentuje všechny aminokyseliny nebo delece a nejméně jedno X je $N^{\varepsilon}$-substituovaný lysinový zbytek.
16. Agregát podle některého z nároků 1 až 15, ve kterém rezidua B28-B30 řetězce B insulinového derivátu je sekvence Pro-X-X, kde každé X nezávisle reprezentuje všechny aminokyseliny nebo delece a nejméně jedno X je $N^{\varepsilon}$-substituovaný lysinový zbytek.
17. Agregát podle některého z nároků 1 až 16, ve kterém rezidua B29-B30 řetězce B insulinového derivátu je sekvence Lys-X, kde každé X reprezentuje všechny aminokyseliny nebo delece.
18. Agregát podle některého z nároků 12 až 17, ve kterém je substituentem na lysinovém zbytku lipofilní skupina obsahující 6 až 40 uhlíkových atomů.
19. Agregát podle nároku 18, ve kterém je substituentem acylová skupina mající 6 až 40, lépe 12 až 36 atomů uhlíku.
20. Agregát podle nároku 19, ve kterém je acylovou skupinou $CH_3$-$(CH_2)$n-CO-, kde $4 \leq n \leq 38$.
21. Agregát podle nároku 19, ve kterém je acylovou skupinou (COOH)-$(CH_2)$n-CO-, kde $4 \leq n \leq 38$.
22. Agregát podle nároku 19, ve kterém je acylovou skupinou $(NH_2$-CO)-$(CH_2)$n-CO-, kde $4 \leq n \leq 38$.
23. Agregát podle nároku 19, ve kterém je acylovou skupinou HO-$(CH_2)$n-CO-, kde $4 \leq n \leq 38$.
24. Agregát podle nároku 19, ve které je lipofilním substituentem 5-α lithocholová kyselina nebo 5-β lithocholová kyselina.
25. Agregát podle nároku 19, ve kterém jsou lipofilním substituentem 5-α nebo 5-β isomery cholové kyseliny, hyoholové kyseliny, deoxycholové kyseliny, aminodeoxycholové ursedeoxycholové kyseliny, hyodeoxycholové kyseliny a cholanikové kyseliny.
26. Agregát podle nároku 19, ve kterém je lipofilní substituent 5-α nebo 5-β isomer dehydrolithocholové kyseliny.
27. Agregát podle nároku 19, ve kterém je lipofilní substituent fusidová kyselina a její deriváty a glycerrhetinová kyselina.
28. Agregát podle nároku 19 až 27, ve kterém je acylová skupina navázána na lysinový zbytek používající aminokyselinu jako vazbu.
29. Agregát podle nároku 28, ve kterém je aminokyselinové spojení tvořeno α-glutamylovou nebo γ-glutamylovou vazba nebo β- nebo α-aspatylovou vazbou.

30. Agregát podle nároku 28, ve kterém je aminokyselinové spojení tvořeno γ-aminobutanoylovou vazbou, β-alanylovou vazbou, α-amido-γ-glutamylovou vazbou nebo α-amido-β-aspartylovou vazbou.
31. Nové insulinové deriváty schopné tvořit agregáty podle všech předchozích nároků.
32. Farmaceutické preparáty vyznačující se tím, že obsahují agregáty insulinových derivátů podle jednoho z nároků 1 až 30.
33. Farmaceutický preparát podle nároku 32 vyznačující se tím, že obsahuje agregáty podle nároků 1 až 30, kterých je většina, lépe více než 75 % větších než aldolasa, jak bylo určeno gelovou filtrací používající médium preparátu jako eluent.
34. Farmaceutická směs vyznačující se tím, že obsahují agregované insulinové deriváty a rychle působící insulinové analogy a tím druhým je nejlépe lidský insulin nebo $Asp^{B28}$ lidský insulin, $Lys^{B28}Pro^{B29}$ lidského insulinu nebo des(B30) lidského insulinu.
35. Farmaceutický preparát podle nároku 34 vyznačující se tím, že molární poměr agregovaného insulinu k rychle působícímu insulinu je 90:10 až 10:90.
36. Farmaceutická směs podle některého z nároků 32 až 35 vyznačující se tím, že obsahuje činidla, které zvyšují viskozitu, nejlépe polyethylenglykol, propylenglykol, jejich kopolymery, dextrany a polyaktidy.
37. Farmaceutická směs podle některého z nároků 32 až 36 vyznačující se tím, že obsahuje pufrovací látku, nejlépe TRIS, fosfátový nebo glycinový pufr.
38. Farmaceutický preparát podle některého z nároků 32 až 37 vyznačující se tím, že obsahující povrchově aktivní pufrovací látku, nejlépe glycylglycin.
39. Farmaceutický preparát podle některého z nároků 32 až 38 vyznačující se tím, že obsahuje izotonické činidlo, nejlépe NaCl, glycerol, manitol nebo laktosu.
40. Farmaceutický preparát podle některého z nároků 32 až 39 vyznačující se tím, že obsahuje $Na^+$ ionty v koncentraci 10 až 150 mM.
41. Farmaceutický preparát podle některého z nároků 32 až 40 vyznačující se tím, že obsahuje fenolové nebo *m*- kresolové přísady.
42. Farmaceutický preparát vyznačující se tím, že obsahuje 0,1-2 mM insulinového derivátu podle nároku 31; 0,3-0,9 % Zn (hmotn. % k insulinovému derivátu), a fenolové sloučeniny jako fenol nebo *m*-kresol nebo jejich směs v totální koncentraci 5 až 50 mM, a $Na^+$ ionty v koncentraci 10 mM až 150 mM.
43. Způsob léčení diabetes mellitus registrovaných osob s potřebou takové léčby vyznačující se tím, že používá v efektivním množství ve vodě rozpustných agregátů podle některého z nároků 1 až 30.

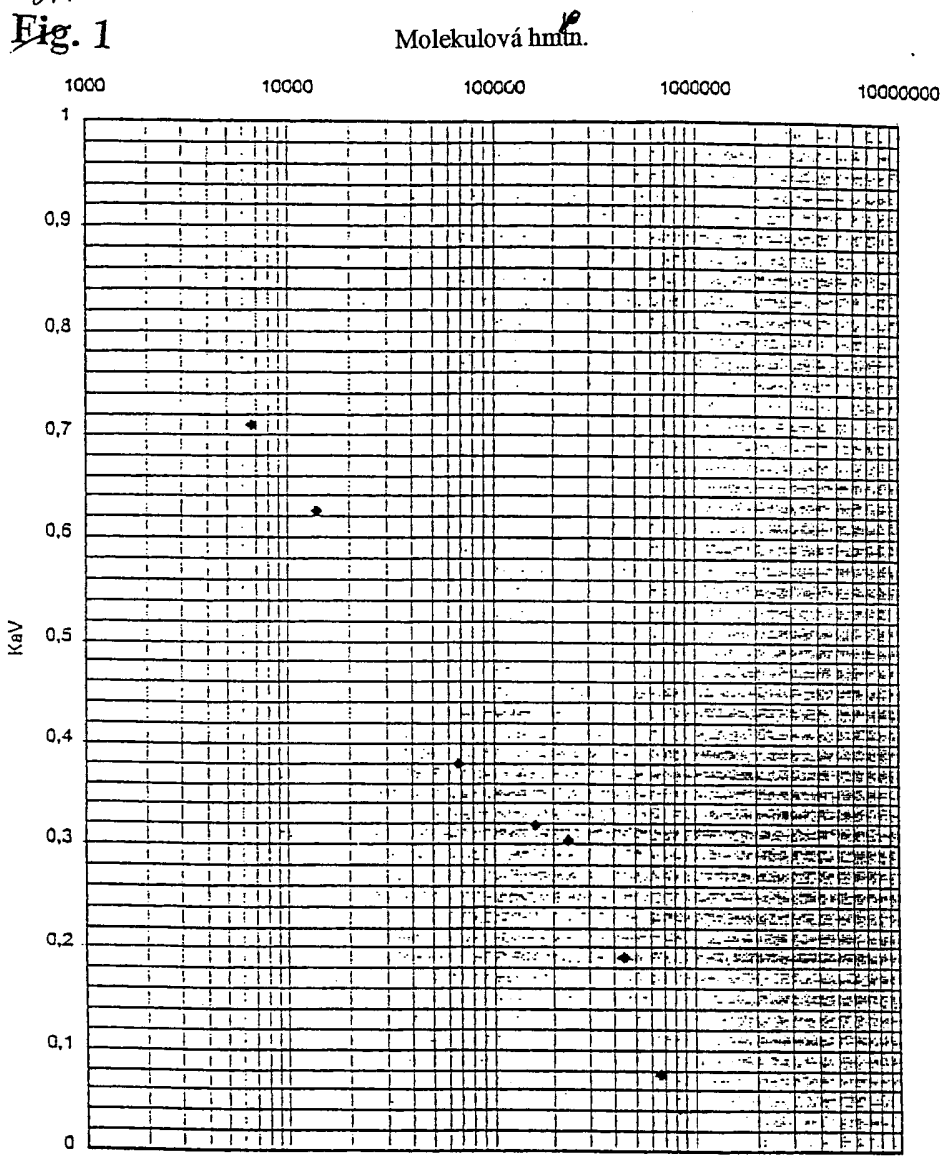
44. Způsob léčení diabetes mellitus, který poskytuje se osobám s potřebou takové léčby používající efektivním množství ve vodě rozpustných agregátů podle nároku 31 vyznačující se tím, že schopný formovat ve vodě rozpustné agregáty po podkožní injekci.

12.06.00

PV 2000 - 1175

Obr.

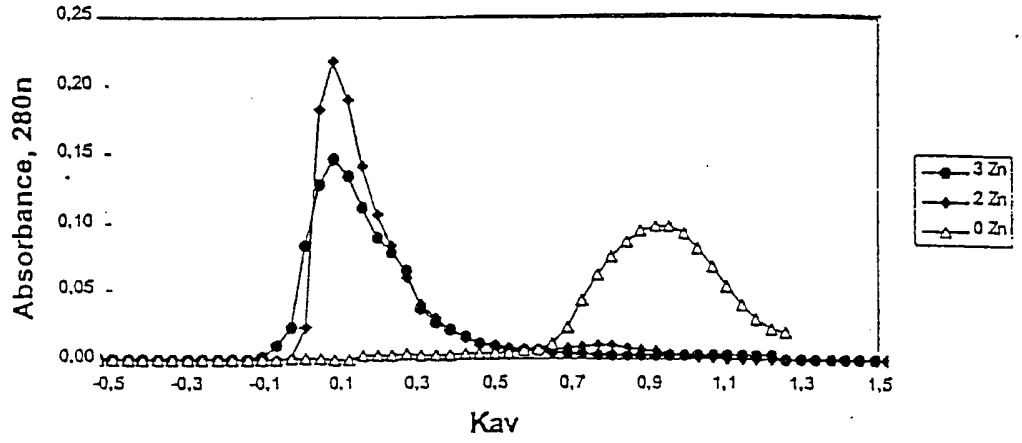
**Fig. 1**



12.05.00

06.

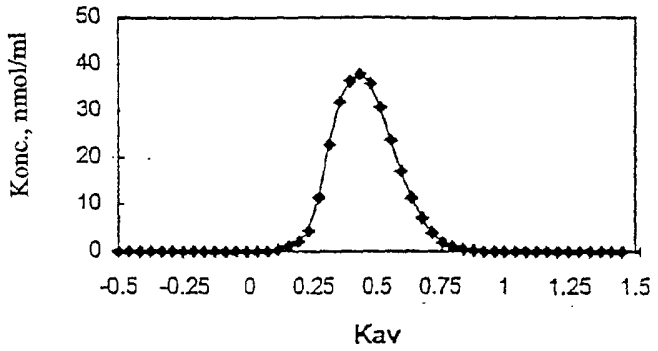
Fig. 2



12.05.00

Obr.

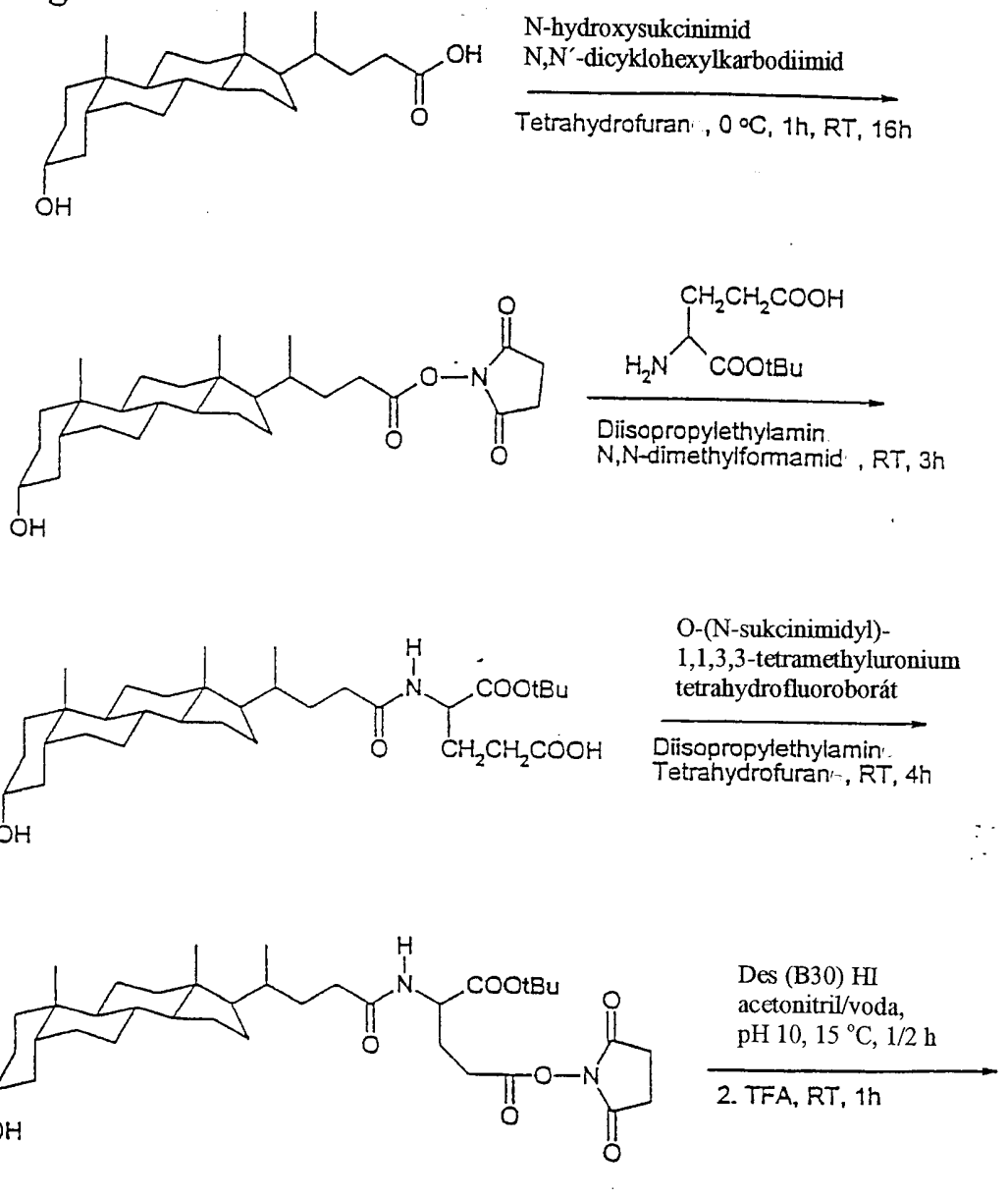
Fig. 3



12.05.00

Obr.

Fig. 4




LysB29(Nε-lithocholoyl-γ-Glu-) des(B30) HI