

69.938/SZE

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Oldhatatlan inzulin készítmények *ezek előállítására*

Kivonat

A találmány acilezett proteinként acilezett inzulint, acilezett inzulin-analógot vagy acilezett proinzulint tartalmazó oldhatatlan készítményekre és ezek előállítására vonatkozik. A készítmények alkalmazhatóak parenterálisan vagy más adagolási módon, nyújtott hatású vércukorszint szabályozóként. A találmány részletesebben olyan készítményekre vonatkozik, amelyek az acilezett protein cink-komplexét, protamint és fenolos konzerválószeret tartalmaznak és a kapott mikrokristályok a neutrális protamin Hagedorn (NPH) inzulin kristályformához hasonlóak. [Nem várt módon a találmány szerinti acilezett protein készítmények azonban terápiásan jobb szubkután hatóanyag felszabadulási farmakokinetiával rendelkeznek, a glükodinamikai profil egyenletesebb és nyújtottabb, mint a jelenleg beszerezhető NPH inzulin készítmények esetében. Ugyanakkor ezek a kristályok megtartják az NPH kristályok egyes előnyös tulajdonságait, könnyen reszuszpendálhatók és elegyíthetők oldható inzulinokkal.]

Bor *22*
BOROS ISTVÁN

69.938/SZE

Oldhatatlan inzulin-készítmények KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY
és eljárás ezek előállítására

Jelen bejelentés elsőbbségi jogot formál az US 60/063104 számú USA-beli szabadalmi bejelentésre, melynek bejelentési napja: 1997. október 24. és az US 60/088930 számú USA-beli szabadalmi bejelentésre, melynek bejelentési napja: 1998. június 11.

A találmány humán orvostudományi tárgyú, részletesebben diabétesz és hiperglikémia megbetegedések gyógyszerészeti kezelésére vonatkozik.

Az inzulin terápia célja már hosszú ideje az, hogy az egészséges személyek inzulin elválasztási mechanizmusát utánozza. A napi fiziológiás inzulin szükséglet ingadozik és két fázisra különíthető el: (a) az abszorptív fázis, amely az inzulin löketszerű felszabadulását követeli meg az étkezéssel összefüggő rohamszerű vércukorszint emelkedés ellensúlyozására, és (b) a poszt-abszorptív fázis, amelyben a máj glükóz teljesítményének szabályozása alatt álló inzulin nyújtott felszabadulására van szükség, az optimális éhezési vércukorszint fenntartásához.

Ennek megfelelően a diabéteszes betegek hatékony kezelése általában kétféle exogén inzulin képzési mód kombinációját foglalja magában: a gyors hatású étkezési időben adott inzulin, melyet bolusz injekciókkal biztosítanak és a hosszan tartó hatású ún. alap inzulin, amelyet az étkezések közötti vércukorszintek korrigálására adagolnak injekció formájában egyszer vagy kétszer naponta. Az ideális alap inzulinnak hosszú idejű és egyenletes hatással kellene rendelkeznie, mely kontrollálni képes a vércukorszintet legalább 12 órán keresztül, előnyösen 24 vagy még több órán keresztül, a hipoglikémia jelentős veszélye nélkül. Fentiek

kívül az ideális alap inzulin elegyíthető kell legyen az oldható étkezési időben adott inzulinnal és nem okozhat irritációt vagy egyéb reakciót az alkalmazás helyén. Végezetül az alap inzulin készítményeknek olyan szuszpenziós formáknak kellene lenniük, melyeket az alkalmazás előtt a beteg könnyedén és egyformán tud reszuszpendálni.

A szakirodalomból közismert a nyújtott hatású inzulin készítmények előállítására oly módon, hogy normál inzulin mikrokristályos szuszpenzióvá történő formázásával szubkután injekciókat készítenek. Forgalomban lévő alap inzulin készítmények például az NPH (Neutral Protein Hagedorn) inzulin, a protamin-cink-inzulin (PZI), és az Ultralente (UL). Az NPH inzulin a legszélesebb körben használt inzulin készítmény, a világ inzulin felhasználásának 50-70 százalékát teszi ki. A kereskedelmi forgalomban beszerezhető NPH inzulin készítmények humán, sertés, és marha inzulint vagy ezek keverékét tartalmazzák. Monomer inzulin-analógot, LysB298, ProB29-humán inzulin-analógot tartalmazó NPH-szerű gyógyszerkészítmények szintén ismertek a szakirodalomban [NPL-ként rövidítve található: De Felippis, M. R., US 5,461,031 sz. USA-beli szabadalmi leírás (1995.10.24.); De Filippis, M. R., 5,650,486 sz. USA-beli szabadalmi leírás (1997.07.22.) és De Filippis, M. R., 5,747,642 sz. USA-beli szabadalmi leírás (1998.05.05.)]

Az NPH inzulin mikrokristályok kb. 5 mikron hosszú, 1 mikron széles és 1 mikron vastag – jellegzetes pálcaformájú morfológiával rendelkeznek. Az NPH inzulin mikrokristályok nyújtott hatása a szubkután injekció helyéről történő lassú abszorpciójának köszönhető.

A forgalomban lévő NPH inzulin készítmények használatával a kezelés nem biztosít ideálisan egyenletes farmakokinetikát, amely szükséges az optimális



vércukorszint fenntartásához az étkezések közötti hosszabb időtartamon keresztül.

Az NPH inzulinnal végzett kezelés ezért nem kívánt mértékben nagy vér-inzulinszintet képes eredményezni, amely életveszélyes hipoglikémiát okozhat.

Azon túl, hogy az NPH inzulin nem rendelkezik ideálisan egyenletes farmakokinetikai profillal, terápiás hatásának időtartama szintén nem optimális. A NPH terápiának egyik fő problémája (a „down” jelenség) a hiperglikémia, amely azért alakul ki, mert az éjszaka folyamán, míg a beteg alszik, elvész a hatékony glükóz-kontroll. A glikémiás szabályozás ezen hiányosságai a cukorbetegség súlyos, hosszú ideig fennálló komplikációihoz vezetnek és számos kellemetlenséget, továbbá az élet minőség csökkenését okozzák a betegnek.

A protamin-cink-inzulin (PZI) az NPH-hoz hasonló készítmény, de nagyobb mennyiségben tartalmaz protamint és cinket, mint az NPH. A PZI készítmények közepes hatású precipitátum vagy hosszú hatású kristályos anyag formájában készülhetnek. A PZI azonban nem egy ideális alap inzulin készítmény, mert nem elegyíthető az étkezési időben adott oldható inzulinnal, és a magas protamin és cink tartalom irritációt vagy egyéb reakciót válthat ki az alkalmazás helyén.

A humán inzulin ultralente egy mikrokristályos inzulin készítmény, melynek cinktartalma magasabb, mint az NPH-é és a mikrokristályok nem tartalmazznak sem protamint sem pedig fenolos konzerválószeret. A humán inzulin ultralente készítmények nem megfelelően egyenletes hatásúak, mérsékelt hatóidejűek és az inzulinnal nem képeznek stabil keveréket. Ráadásul nehéz őket reszuszpendálni.

Az ismert inzulin szuszpenziók észlelt hiányosságait már megpróbálták kiküszöbölni. Zsírsavval acilezett inzulinok vércukorszintre gyakorolt alap ellenőrző képességét tanulmányozták [Havelund és munkatársai, WO 95/07931 sz. PCT közrebocsátási irat, (1995.03.23.)] a vegyületek nyújtott hatását a molekulákon lévő



zsírsavrészek szérumban való kötődése eredményezte. A zsírsavlánc hossza ezeken a molekulákon befolyásolta a szérumban albumin zsírsavkötő-képességét. A zsírsav-acilezett inzulinban a zsírsavlánc hossza jellemzően hosszabb, mint 10 szénatom és 14 és 16 szénatomos zsírsavlánc hosszúság az optimális a szérumban albuminhoz való kötődés és a nyújtott hatástartam szempontjából.

Más NPH inzulintól eltérően – melyek nem oldhatóak – a fent említett zsírsav-acilezett inzulinok oldódnak az inzulin szokásos terápiás koncentrációinál. E készítmények hatástartama azonban nem eléggé hosszú ill. nem elég egyenletes, ideális alapkontrollt nem tesz lehetővé, és kevésbé hatásos az inzulinnál, minek következtében a szerből, nagyobb mennyiségeket szükséges adagolni [Radziuk J. és munkatársai, Diabetológia 41:116-120, 489-490 (1998)].

Whittingham J. L. és munkatársai [Biochemistry 36: 2826-2831 (1997)] kristályos B29-N^a-tetradekanoil-desz-(B30)-humán-inzulin-analóg cinkkel és fenollal alkotott hexamer komplexét szerkezeti tanulmányok céljából röntgen-kristallográfiásan vizsgálták. A hexamert R6-os konformációjának találták, és bizonyos tulajdonságokban különbözött a humán inzulin hexamerétől. Whittingham J. L. és munkatársai nem számolnak be az előállított kristály gyógyszerészeti vagy gyógyszerhatástani tulajdonságairól, és nem is utalnak arra, hogy ez a kristály a diabétesz ill. a hiperglikémia kezelésében előnyös tulajdonságokkal rendelkezne. Nem volt előre megjósolható Whittingham J. L. és munkatársai munkájából az, hogy protamint tartalmazó NPH típusú kristályok előállíthatóak inzulin-származékokkal illetve inzulin-származék-analógokkal és hogy az így kapott kristályoknak milyen farmakokinetikájuk van, valamint milyen farmakodinamikai tulajdonságokkal rendelkeznek.

Így továbbra is szükség van olyan inzulin készítmények megalkotására, amelyek egyenletesebb és hosszabb idejű hatással bírnak, mint az NPH inzulin, elegyíthetőek az oldható, evésidőben adott inzulinokkal, könnyen reszuszpendálhatók, és nem okoznak irritációt vagy egyéb reakciót az alkalmazás helyén.

Nem várt módon azt tapasztaltuk, hogy ha az inzulint kevésbé oldhatóvá tesszük egy vagy több reakcióképes mellékcsoporthoz az átalakításával, az átalakított inzulin protaminnal együtt NPH-hoz hasonló kristályokká alakítható. Ha a protein-származékot kicsapjuk vagy kristályosítjuk, az inzulin-származék oldhatóságának mértéke - összehasonlítva a nem protein-származék tartalmú szilárd készítmények oldhatóságával - jelentősen lecsökkent. Rájöttünk ezen kívül arra is, hogy a protein-származék kristályok egyenletesebb és hosszabb idejű hatást biztosítanak, mint a nem-protein-származékot tartalmazó kristályok. Meglepő módon azt találtuk, hogy az egyenletesebb és hosszabb idejű hatásbeli előnyök megfigyelhetők minden protein-származékot tartalmazó amorf precipitátum esetében is.

Jelen találmány tárgya, tágabb aspektusból nézve, protein-származékot tartalmazó oldhatatlan gyógyszerkészítményekre vonatkozik, melyben a protein-származékok lehetnek inzulin-származékok, inzulin analóg-származékok és proinzulin-származékok, ahol a származékok kevésbé oldhatóak, mint a nem inzulin-származék, inzulin-analóg vagy proinzulin. Az oldhatatlan készítmények tartalmaznak még komplexképzőt, hexamer-stabilizáló vegyületet és egy kétvegyértékű fém kationt is. Ezen kívül egy készítményen belül elegyíthetőek oldható proteinnel és oldható protein-származékkal. A találmány szerinti oldhatatlan készítmények amorf precipitátum formájúak vagy még előnyösebben mikrokristályok.

Jelen találmány tárgya közelebbről olyan zsírsav-acilezett proteineket tartalmazó mikrokristályos készítményekre vonatkozik, amelyek diabétesz és

hiperglikémia kezelésére alkalmasak. Ezek a mikrokristályok tartalmaznak egy zsírsav-acilezett proteint, mely lehet zsírsav-acilezett inzulin, zsírsav-acilezett inzulin-analóg és zsírsav-acilezett proinzulin, tartalmaz továbbá protamint, egy fenolos konzerválószer és cinket. Az ilyen mikrokristályok egyenletesebb és hosszabb hatásúak, mint az NPH inzulin és elegyíthetők oldható proteinekkel és oldható protein-származékokkal.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy vizes szuszpenziós készítmény, mely tartalmazza az oldhatatlan készítményt és egy vizes oldószert. Az ilyen szuszpenziós készítmények fakultatívan tartalmazhatnak egy oldható proteint, mint pl. humán inzulin, vagy egy oldható humán inzulin-analógot, mint pl. monomer inzulin-analóg, azért hogy a vér glükóz szint kotrollálva legyen azonnal az étkezést követően. A zsírsav-acilezett inzulinokat tartalmazó mikrokristályos készítmények jobb farmakodinamikával rendelkeznek, mint a humán inzulin NPH. Jelen találmány különbözik a korábbi zsírsav-acilezett inzulin technológiáktól, a találmány szerinti készítmények hatástartamának meghosszabbodása nem szükségszerűen az albumin-kötődésre épül, bár az albumin kötődés tovább nyújthatja a találmány szerinti készítménye némelyikének hatását.

A találmányhoz tartozik továbbá egy eljárás oldhatatlan készítmények előállítására, és egy diabétesz és hiperglikémia kezelésére szolgáló eljárás, amelyben a betegeknek a vércukorszint szabályozásához elegendő mennyiségben adagolunk egy oldhatatlan készítményt tartalmazó gyógyszerformát.

A találmány részét képezik az amorf precipitátumok is, amelyek - tágabb aspektusból nézve - tartalmaznak derivatizált proteint, mely lehet inzulin-származék, inzulin analóg-származék és proinzulin-származék, ahol a protein-származék

kevésbé oldható, mint a nem protein-származék, ezen kívül tartalmaznak még protamint, egy fenolos konzerválószer, és cinket.

Az 1. ábra a sertés NPH inzulin (- - -) és a találmány szerinti B29-Nå-oktanoil-humán- inzulin mikrokristályok (——) oldhatóságának mértékét hasonlítja össze.

Az „oldhatatlan készítmény” kifejezés mikrokristályos vagy amorf precipitátum állapotú anyagot jelent. A mikrokristályok vagy az amorf precipitátum jelenléte szabad szemmel vagy mikroszkópos vizsgálattal megállapítható. Az oldhatóság függ az oldószerrel, és a konkrét készítmény lehet oldhatatlan az egyik oldószerben és oldható egy másikban.

A „mikrokristály” kifejezés alatt olyan szilárd forma értendő, amely az anyagot elsősorban kristályos állapotban tartalmazza, amelyben sajátos kristályok teszik ki a kristályos készítmény túlnyomórészét, melyeknek leghosszabb mérete jellegzetesen az 1 -100 mikronos intervallumon belül van. A „mikrokristályos” kifejezés a mikrokristály állapotára vonatkozik.

Az „amorf precipitátum” kifejezés, olyan oldhatatlan anyagot jelent, amely nem kristályos formában van jelen. Szakember különbséget tud tenni a kristályok és az amorf precipitátum között. A találmány szerinti amorf precipitátum önmagában rendelkezik előnyös farmakológiai tulajdonságokkal és a találmány szerinti kristályok készítésében intermediereként is szerepelhet.

A „protein-származék” kifejezés alatt az alábbi csoportba tartozó proteinek értendők: inzulin-származék, derivatív inzulin-analóg és proinzulin-származék, amelyeknél egy funkciós csoport átalakítása révén a kapott protein-származék kevésbé oldható vizes oldószerben, mint a nem-derivált formája. Ilyen protein-származékokra számos példa ismert a szakirodalomban és szakember számára

közismert a proteinek és a protein-származékok oldhatóságának meghatározása. Inzulin-származék és inzulin-analógok például a benzoil-, p-tolil-szulfonamid-karbonil-, és indolil-származékai az inzulinnak és az inzulin-analógoknak [Havelund S. és munkatársai, WO 95/07931, publikálva 1995.03.23.] ; alkiloxi-karbonil-inzulin-származékok [Geiger R. és munkatársai, 3,684,791sz. USA-beli szabadalmi leírás(1972.08.15.) Brandenburg D. és munkatársai 3,907,763sz. USA-beli szabadalmi leírás (1975.09.23.)] ariloxi-karbonil-inzulin-származékok [Brandenberg D. és munkatársai 3,907,763sz. USA-beli szabadalmi leírás (1975.09.23.)] alkil-karbamil-származékok Smyth D.G.: 3,864,325sz. USA-beli szabadalmi leírás (1976.04.13.)] [karbamil-, o-acetil-inzulin-származékok [Smyth D.G.: 3,864,325sz. USA-beli szabadalmi leírás (1975.02.04.)] keresztkötésű-, alkil-dikarbonil-származékok [Brandenberg, D. és munkatársai, 3,907,763sz. USA-beli szabadalmi leírás (1975.09.23.)] N-karbamil-, O-acetilezett-inzulin-származékok [Smyth D.G.: 3,868,356sz. USA-beli szabadalmi leírás (1975.02.25.)] különféle O-alkil-észterek [Markussen, J., 4,343,898sz. USA-beli szabadalmi leírás (1982.08.10.), Morihara K. és munkatársai 4,400,465sz USA-beli szabadalmi leírás (1983.08.23.), Morihara K. és munkatársai 4,401,757sz USA-beli szabadalmi leírás (1983.08.30.), Markussen, J., 4,489,159sz. USA-beli szabadalmi leírás (1984.12.18.), Obermier R. és munkatársai 4,601,852 USA-beli szabadalmi leírás (1986.07.22.) és Andersen F. H. és munkatársai 4,601,979sz. USA-beli szabadalmi leírás (1986.07.22.) egyéb különféle inzulin-származékok [Lindsay D. G. és munkatársai, 3,869,437sz. USA-beli szabadalmi leírás (1975.03.04.)] és a zsírsav-acilezett-proteinek, melyeket már itt leírtunk.

Az „acilezett protein” kifejezés alatt jelen esetben olyan inzulint, inzulin-analógokat és proinzulint értünk, amelyek szerves savval vannak acilezve, és így

hozzákapcsoljuk egy amidkötésen keresztül a protein amino-csoportját a szerves sav-vegyület acil-csoportjához. Az amino-csoport általában a protein N-terminális-aminosavának α -amino-csoportja lehet, vagy a protein egy lizin-maradékának ϵ -amino-csoportja. Az acilezett protein lehet három amino-csoportnál egyszer vagy többször acilezett, ami előfordul inzulinban és a legtöbb inzulin-analógokban. A mono-acilezett proteinek egy amino-csoportnál vannak acilezve. A di-acilezett proteinek két amino-csoportnál acilezettek. A tri-acilezett proteinek három amino-csoportnál vannak acilezve. A szerves sav-vegyület lehet pl. egy zsírsav, aromás sav vagy más egyéb szerves vegyület, amelynek karboxil-csoportja van, mely amidkötést alakít ki a protein amino-csoportjával és az így keletkezett protein-származék vízdíszhatósága kisebb, mint a nem-protein-származéké.

A „zsírsav-acilezett protein” kifejezés olyan acilezett proteinek jelöl, amelyek inzulin, inzulin-analógok, és proinzulinok zsírsavval történő acilezésével keletkeznek, oly módon hogy egy amidkötésen keresztül a zsírsav acil-csoportja a protein amino-csoportjához kapcsolódik. Az amino-csoport általában a protein N-terminális aminosavjának α -amino-csoportja vagy lizin-maradékának ϵ -amino-csoportja. A zsírsav-acilezett protein lehet három amino-csoportnál egyszer vagy többször acilezett, ami előfordul inzulinban és a legtöbb inzulin-analógokban. A mono-acilezett proteinek egy amino-csoportnál vannak acilezve. A di-acilezett proteinek két amino-csoportnál acilezettek. A tri-acilezett proteinek három amino-csoportnál vannak acilezve. Zsírsav-acilezett inzulint ismertetnek az 1-254,699 sz. japán szabadalmibejelentésben. Ld. még Hashimoto M. és munkatársai Pharmaceutical Research, 6: 171-176 (1989), és Lindsay D.G., és munkatársai, Biochemical J. 121: 737-745 (1971). Zsírsav-acilezett inzulinokat és zsírsav-acilezett inzulin-analógokat, valamint ezek előállítására szolgáló eljárásokat ismertetnek Baker J.C. és

munkatársai a 08/342,931sz. USA-beli szabadalmi bejelentésben (1994.11.17.) megfelelője az 5,693,609 sz USA-beli szabadalmi leírás (1997.12.02.), Havelund S. és munkatársai, WO 95/07931 sz. PCT közrebecsátási irat (publikálva: 1995.03.23.) és a megfelelő 5,750,497 sz. USA-beli szabadalmi leírás (1998.05.12.) és Johanssen I. és munkatársai, WO 96/29342 sz- PCT közrebecsátási irat (publikálva:1996.09.26.).Ezekre az irodalmi adatokra referenciaként hivatkozunk a zsírsav-acilezett inzulinok és a zsírsav-acilezett inzulin-analógok leírásánál valamint ezek előállításánál.

A „ zsírsav-acilezett protein” fogalomba beletartoznak a zsírsav-acilezett proteinek gyógyszerészetileg elfogadható sói és komplexei is. A „zsírsav-acilezett protein” definícióba szintén benne foglaltatnak azok a zsírsav-acilezett protein tartalmú készítmények, amelyekben az acilezett protein molekulák csoportja homogén az acilezés helyét ill. helyeit illetően. Például az N^α-mono-acilezett-protein, B1-N^α-mono-acilezett-protein, A1- N^α-mono-acilezett-protein, A1-B1-N^α-di-acilezett-protein, N^α,A1-N^α,di-acilezett-protein, N^α,B1-N^α,di-acilezett-protein és az N^α,A1,B1-N^α,tri-acilezett-protein mind beletartoznak a találmány szerinti „zsírsav-acilezett-protein” fogalomkörbe. E fogalomkörbe tartoznak azok a készítmények is, amelyekben az acilezett protein molekulák tagjai különbözőképpen acilezettek. Végül pedig „zsírsav-acilezett protein” -nek tekintjük a mono-acilezett és di-acilezett proteinek keverékét, a mono-acilezett és tri-acilezett proteinek keverékét, a di-acilezett és tri-acilezett proteinek keverékét és a mono-acilezett, di-acilezett és tri-acilezett proteinek keverékét is.

A leírásban használt „inzulin” kifejezés humán inzulint jelent, amelynek aminosav szekvenciája és sajátos szerkezete jól ismert. A humán inzulint egy 21 aminosavból álló A-lánc és egy 30 aminosavból álló B-lánc alkotja, melyek

diszulfidos keresztkötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. A keresztkötésekkel megfelelő módon kapcsolt inzulin három diszulfid hidat tartalmaz: az egyik az A-lánc 7. és a B-lánc 7. helye között, a másik az A-lánc 20. és a B-lánc 19. helye között, és a harmadik az A-lánc 6. és 11. helye között.

Az „inzulin-analóg” kifejezés, olyan A és B-lánccal rendelkező proteinek jelenti, amelyekben az aminosavak sorrendje lényegében megegyezik a humán inzulin A és B-láncának aminosav sorrendjével, de abban különböznek attól, hogy az A vagy B láncban egy vagy több aminosav hiányzik, egy vagy több aminosav helyettesítve van és/vagy egy vagy több aminosavval több van, ami nem szünteti meg az inzulin-analógok inzulinszerű terápiás hatását.

Az „állati inzulinok” inzulin-analógok. Ilyen állati inzulin a nyúl-, sertés-, marha- és birka-inzulin. Az aminosav cserék különböztetik meg az állati inzulinokat a humán inzulintól. Ezek az aminosavbeli eltérések az alábbi táblázatban olvashatók:

	Aminosav pozíciók			
	A8	A9	A10	B30
Humán inzulin	Thr	Ser	Ile	Thr
Nyúl inzulin	Thr	Ser	Ile	Ser
Sertés inzulin	Thr	Ser	Ile	Ala
Marha inzulin	Ala	Ser	Val	Ala
Birka inzulin	Ala	Gly	Val	Ala

Az inzulin-analógok egy másik típusa a „monomer inzulin-analóg” a szakirodalomban jól ismert. A monomer inzulin-analógok struktúrája nagyon közel áll a humán inzulinéhoz, hatásuk a humán inzulin hatásához hasonló vagy azzal megegyező, de egy vagy több aminosavval kevesebb vagy többel rendelkeznek ill.



egy vagy több aminosav a láncokban ki van cserélve, ami hajlamosít a dimereken és a hexamereken belüli kötődések felhasadására, ami pedig a kevésbé aggregált alakokká történő szétválást teszi lehetővé. A monomer inzulin-analógok a humán inzulin gyors hatású analógjai, ilyeneket ismertetnek, pl. Chance R. E. és munkatársai az 5,514,646 sz. USA-beli szabadalmi leírásban (1996.05.07.), Brems D: N. és munkatársai a Protein Engineering, 5: 527-533 (1992) publikációban, Brange J. J. V. és munkatársai a 214,826 sz. EPO szabadalmi publikációban (1987.03.18.), Brange J. J. V. és munkatársai az 5,618,913 sz. USA-beli szabadalmi leírásban (1997.04.08.) és Brange J. J. V. és munkatársai a Current Opinion in Structural Biology 1: 934-940 (1990) publikációban. Monomer inzulin-analóg például olyan humán inzulin, amelyben a B28 pozíciónál lévő prolin Asp, Liz, Leu, Val vagy Ala valamelyikével van helyettesítve és a B29 pozícióban lévő lizin helyén vagy lizin vagy prolin van és szintén monomer inzulin-analógok az AlaB26-humán inzulin, desz(B28-B30)-humán inzulin és a desz(B27)-humán inzulin. A monomer inzulin-analógok alkalmazhatók származékként a jelenlegi kristályokban, vagy alkalmazhatók nem-derivált vegyületként a szuszpenziós készítmények folyékony fázisában, megfelelő keresztkötésekkel ellátva a humán inzulinval megegyező helyeken.

A találmányban alkalmazott inzulin-analógok egy másik csoportját alkotják azok, amelyeknek az izoelektromos pontja kb. 7,0 és kb. 8,0 közötti. Ezeket az analógokat „pI-változtatott” inzulin-analógoknak nevezik. Ilyen inzulin-analógok például az ArgB31,ArgB32-humán inzulin, GlyA21,ArgB31,ArgB32-humán inzulin, ArgA0,ArgB31,ArgB32-humán inzulin és az ArgA0,GlyA21,ArgB+1,ArgB32-humán inzulin.

Egy másik csoportja az inzulin-analógoknak, azokból az analógokból áll, melyekben egy vagy több aminosav hiányzik, ugyanakkor a molekula hatása jelentősen nem változik. Az inzulin-analógoknak ezt a csoportját „deléciós analógoknak” nevezik. A B28-B30 helyeken egy vagy több aminosav törlésével kapott inzulin-analógok ugyanúgy aktívak. Ilyen deléciós analógok pl. a desz(B30)-humán inzulin, deszPhe(B1)-humán inzulin, desz(B27)-humán inzulin, desz(B28-B30)-humán inzulin és a desz(B1-B3)-humán inzulin. A deléciós analógok alkalmazhatók származékként a találmány szerinti kristályokban, vagy alkalmazhatók nem-derivált vegyületként a szuszpenziós készítmények folyékony fázisában, megfelelő keresztkötésekkel ellátva a humán inzulinnal megegyező helyeken.

Az inzulin-analógok esetében előfordul, hogy egy vagy több aminosavat más aminosavakkal helyettesítenek a kémiai stabilitás növelése miatt. Például Asn és Gln helyettesíthető Gly, Ser, Thr, Asp vagy Glu aminosavakra. Az AsnA18, AsnA21 vagy AsnB3 vagy ezek valamilyen kombinációja helyettesíthető Gly, Asp, vagy Glu aminosavakra. A GlnA14, GlnA15 vagy mindkettő úgyszintén helyettesíthető akár Asp akár Glu aminosavakra. Leggyakoribb a helyettesítés az Asp a B21 helynél és az Asp a B3 helynél.

A „proinzulin” kifejezés egyláncú peptidet jelent, mely az inzulin prekursora. A proinzulin kémiai vagy előnyösebben enzimindukciós módszerrel inzulinná vagy inzulin-analóggá alakítható. A proinzulinban a diszulfidhidak a fent leírtaknak megfelelően helyezkednek el. A proinzulin inzulint vagy egy inzulin-analógot és egy összekötő peptidet tartalmaz, melyeket peptidkötés kapcsol össze. Az összekötő peptidet kb. 1- 35 aminosav alkotja. A peptidkötés ill. az összekötő peptid külön-külön az A és B lánc terminális aminosavjához egy vagy két á-amid-kötés útján kapcsolódik. Az összekötő peptidben előnyösen egyik aminosav sem cisztein. Az



összekötő peptidben a C-terminális aminosav előnyösen lizin vagy arginin.

A proinzulin $X-B-C-A-Y$ és $X-A-C-B-Y$ képletű lehet, amelyben X hidrogénatom vagy egy 1-kb.100 aminosavból álló peptid, amelynek C-terminális aminosava lizin vagy arginin, A az inzulin vagy egy inzulin-analóg A-lánca, C egy 1-kb.35 aminosavból álló peptid, melyben nincs cisztein és amelyben a C-terminális aminosav lizin vagy arginin, és B az inzulin vagy egy inzulin-analóg B-lánca.

A „gyógyszerészetileg elfogadható só” alatt a protein egy vagy több töltéssel rendelkező csoportja és egy vagy több gyógyszerészetileg elfogadható, nem-toxikus kation ill. anion között létrejött sót értünk. Ezek szerves vagy szervetlen sók, melyek közé tartoznak például a savakkal képezett sók, úgymint klorid, szulfát, szulfonát, tartarát, fumarát, bromid, glikolát, citrát, maleát, foszfát, szukcinát, acetát, nitrát, benzoát, aszkorbát, p-toluolszulfonát, benzolszulfonát, naftálszulfonát, propionát, karbonát, és még hasonlók, vagy például ammónium-, nátrium-, kálium-, kalcium-, vagy magnéziumsók.

Az „acilez” ige amidkötés kialakítását jelenti egy zsírsav és egy protein amino-csoportja között. Egy protein akkor „acilezett”, ha egy vagy több amino-csoportja egyesítve van egy amidkötésen keresztül egy zsírsav acil-csoportjával.

A „zsírsav” kifejezés egy 1-18 szénatomos telített vagy telítetlen, egyenes, vagy elágazó láncú zsírsavat jelent.

Az „C1-C18 atomos zsírsav” kifejezés egy 1-18 szénatomos telített, egyenes, vagy elágazó láncú zsírsavat jelent.

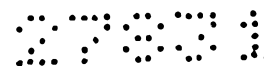
A „két vegyértékű fém kation” kifejezés, olyan iont vagy ionokat jelent, amelyek a protein molekulákkal komplexet képeznek. Az átmeneti fémek, az alkálifémek és az alkáli földfémek például olyan fémek, amelyek komplexet képeznek az inzulinnal. Különösen előnyös fém a cink. Egyéb inzulinnal komplexet

képező és gyógyszerészetileg elfogadható átmeneti fémek lehetnek még a réz, a kobalt és a vas.

A „komplex” kifejezés két jelentéssel bír e találmány esetében. Először is egy olyan komplexet jelent, amelyben a protein egy vagy több atomja képez komplexet egy vagy több kétértékű fém kationnal. A protein atomjai elektron átadó ligandumként viselkednek. A proteinek az átmeneti fémekkel jellegzetesen egy hexamer komplexet képeznek. A második jelentés szerint a „komplex” kifejezés a komplexképző vegyület és a hexamerek közötti asszociációs formát jelenti. A „komplexképző vegyület” egy olyan több pozitív töltéssel rendelkező szerves molekula, melyek kötést ill. komplexet alakítanak ki hexamerekkel az oldhatatlan készítményekben. Jelen találmányban alkalmazható komplexképző vegyület például a protamin, szurfen, különböző globin-proteinek [Brange J., Galenics of Insulin, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1987)], és különböző ismert polikationos polimer vegyületek, melyek inzulinnal komplexet képeznek.

A „protamin” kifejezés hal spermiumból kapott erősen bázisos proteint jelent. A protaminban a proteinek átlagos molekulásúlya kb. 4.200 [Hoffmann J.A. és munkatársai, Protein Expression and Purification, 1:127-133 (1990)]. A „protamin” definíció egy viszonylag sómentes protein-készítményre is vonatkozhat, amelyet gyakran „protamin alap”-nak neveznek. A protamin természetesen protein-sókat tartalmazó készítményeket is jelent. Különböző sótartalmú készítmények vannak forgalomban.

Az inzulinnal foglalkozó szakemberek számára a protaminok közismertek és a jelenlegi NPH inzulin készítményekben is megtalálhatók. A tiszta protamin frakció jelen találmányban is felhasználható éppúgy, mint a protein keverékekben. A kereskedelembe beszerezhető protamin készítmények azonban a proteineket



illetően gyakorta nem homogének, mindazonáltal hatékonyak a találmány céljára.

Jelen találmányban egyaránt használhatóak az alap protamin készítmények, a protamin-sókat tartalmazó készítmények és ezek keverékei. Gyakran használt protamin-só a protamin-szulfát.

A „szuszpenzió” kifejezés egy folyékony és egy szilárd fázisú keveréket jelent, melyben a szilárd fázis oldhatatlan vagy nehezen oldódó, a kolloid mérettől nagyobb részecskékből áll. Az NPH mikrokristályok keveréke és egy vizes oldószer szuszpenziót képez. Szuszpenzió keletkezik az amorf precipitátum keverékéből és egy vizes oldószerből is. A „szuszpenziós készítmény” kifejezés olyan gyógyszerkészítményt jelent, amelyben a hatóanyag a szilárd fázisban van jelen, ez lehet pl. egy mikrokristályos anyag, egy amorf precipitátum vagy mindkettő, amelyek vizes oldatba vannak diszpergálva. A diszpergált szilárd anyag – amelyet egyenletesen, a keverék finom rázogatóásával szuszpendálunk - egy meglehetősen egységes szuszpenziót biztosít, amelyből a kellő dózis mennyiség elérhető. Forgalamban kapható inzulin szuszpenziós készítmények, pl. az NPH, a PZI és az Ultralente. A mikrokristályos szuszpenziós készítményben a szilárd anyag kis hányada lehet amorf állapotú. A mikrokristályos szuszpenziós készítményben a szilárd anyagnak előnyösen kevesebb, mint 10%-a legelőnyösebben kevesebb, mint 1%-a amorf állapotú. Hasonlóképpen, az amorf precipitátum tartalmú szuszpenzióban is a szilárd anyag kis hányada lehet mikrokristályos.

Az „NPH inzulin” kifejezés „Neutral Protamin Hagedorn” inzulin készítményt jelent. E kifejezés és az ilyen inzulin készítmények előállítására szolgáló eljárások az inzulin formulálásban jártas szakember számára kézenfekvőek.

A „vizes oldószer” kifejezés vizet tartalmazó folyékony oldószert jelent. A vizes oldószer rendszer állhat kizárólag vízből vagy víz és egy vagy több egymással

elegyíthető oldószer keverékéből és tartalmazhat oldott anyagot. A legtöbbet használt elegyíthető oldószerek a rövid láncú szerves alkoholok, mint pl. metanol, etanol, propanol, rövid láncú ketonok, mint pl. aceton, és poli-alkoholok, mint pl. glicerín.

Az „izotonizáló szer” egy olyan vegyület, amely fiziológiásan elviselhető és a készítmény tonicitását fiziológiásra állítja be, így a készítmény alkalmazásakor meggátolja a totál vízátáramlást a sejtmembránon keresztül. A glicerín az egyik leggyakrabban használt izotonizáló szer. Egyéb izotonizáló szerek közé tartoznak a sók pl. nátrium-klorid, és a monoszacharidok, pl. dextróz és laktóz.

A találmány szerinti készítmények tartalmaznak hexamer-stabilizáló vegyületet. A „hexamer-stabilizáló vegyület” egy nem-proteines, kis molekulásúlyú vegyület, amely stabilizálja a protein-származékot a hexamer aggregált állapotban. A fenol-vegyületek, különösen a fenolos konzerválószer a legismertebb stabilizálói az inzulinnak és inzulin-származékoknak. Az ilyen hexamer-stabilizáló vegyület az inzulin hexamert speciális intermolekuláris kötésekkel rögzíti. Hexamer-stabilizáló vegyület például különböző fenol-vegyületek, fenolos konzerválószer, rezorcinol, 4'-hidroxi-acetanilid (tilenol), 4-hidroxi-benzamid és 2,7-dihidroxi-naftalin. A találmány szerinti gyakran alkalmazott oldhatatlan készítmények egy konzerválószer és azonfelül még egy hexamer-stabilizálót is tartalmaznak. A találmány szerinti készítményekben konzerválószerként fenolos konzerválószer alkalmazható.

A „konzerválószer” kifejezés, olyan gyógyszer technológiai segédanyagot jelent, amely mikroba-ellenes hatású. A forgalombahozatal egyik alapkövetelménye, hogy a parenterális gyógyszerkészítményeknek meg kell felelniük az eltarthatósági előírásoknak. A szakterületen ismert, parenterális gyógyszerkészítésre alkalmas és hatékony konzerválószer, pl. benzalkónium-klorid, benzetónium, klórhexidin, fenol,

m-krezol, benzil-alkohol, metil-paraben, klórbutanol, o-krezol, p-krezol, klórkrezol, fenil-higany-nitrát, tiomerzál, benzoésav és ezek keverékei. Ld. pl., Wallhäuser K.-H., Develop. Biol. Standard, 24: 9-28 (1974) (S. Krager, Basel).

A „puffer” vagy „gyógyszerészetileg elfogadható puffer” kifejezés, olyan inzulin készítményekben közismerten alkalmazott vegyületet jelent, amely a készítmény pH-ját a megkívánt értékre állítja be. A találmány szerinti készítmények pH értéke kb. 6,0 és kb. 8,0 közötti, előnyösen kb. 6,8 és kb. 7,8 közötti. A pH értéket az enyhén savastól az enyhén lúgosig beállító, gyógyszerészetileg elfogadható pufferek pl. a foszfát, acetát, citrát, arginin, Tris és a hisztidin. A „Tris” 2-amino-2-hidroxi-metil-1,3-propándiolt valamint gyógyszerészetileg elfogadható sóit jelenti. A Tris két leggyakoribb formája a szabad bázis és a klorid-só forma. A Tris a szakirodalomban trimetilol-aminometánként, trometaminként és trisz(hidroximetil)-aminometánként is ismert. Egyéb gyógyszerészetileg elfogadható pufferek, melyek a kívánt pH érték beállítására alkalmasak, kémikus szakember számára kézenfekvőek.

Az „adagolás” kifejezés a találmány szerinti készítmény bevezetését jelenti azoknak a betegeknek a testébe, akik arra egy betegség vagy egy kóros állapot miatt rászorulnak.

A „kezelés” kifejezés a diabéteszben vagy hiperglikémiában vagy más - inzulin adagolását igénylő - kóros állapotban szenvedő betegek olyan ápolását és ellátását jelenti, amelyet a kóros állapotokból adódó tünetek ill. komplikációk enyhítésére vagy megszüntetésére végeznek. A kezelés magában foglalja a találmány szerinti készítmény adagolását a tünetek és a komplikáció kialakulásának kivédésére, a már kialakult tünetek és komplikációk enyhítésére ill, a betegség, kóros állapot vagy rendellenesség megszüntetésére.

Amint azt már korábban említettük, a jelen találmány szerinti oldhatatlan készítmények bizonyos tulajdonságokban az NPH inzulinhoz hasonlóak, más szempontból viszont attól előnyösebbek. A találmány tárgyát képező készítmények a fizikai tulajdonságok tekintetében mutatnak hasonlóságot az NPH inzulinhoz. Immerziós objektívvel és keresztezett polarizátorral ellátott fénymikroszkóp felhasználásával a találmány szerint a18. példában előállított – B29-Ná-oktanoil-humán inzulint, cinket, protamint és fenolt tartalmazó – mikrokristályokat vizsgáltunk. A vizsgálat 1000-szeres nagyításnál a B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok önálló pálcikaszerű, kristálymorfológiailag egységes szerkezetet mutattak. A mikrokristályok mérete általában a kb. 2-8 mikronos mérettartományon belül mozgott. A fenti mikroszkóppal elvégzett direkt összehasonlító vizsgálatok azt mutatták, hogy ezek a mikrokristályok megjelenésükben hasonlatosak azokhoz a forgalomban lévő sertés NPH mikrokristályokhoz, amelyeket már másutt leírtak, mint pálcikaszerű kristályokat. A B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok mérete szintén hasonló volt a forgalomban lévő NPH mikrokristályokhoz, melyek átlagos hossza általában kb. 5 mikron. A forgalomban lévő gyári NPH mikrokristályos készítmények hossza 1 és 40 mikron közötti.

A találmány szerinti mikrokristályok azonban meglepően és előre meg nem jósolható módon különböznek az NPH mikrokristályoktól az oldódási tulajdonságok és a hatástartam szempontjából. A találmány szerinti mikrokristályok sokkal lassabban oldódnak a fiziológias körülményeket utánozó körülmények között, mint az NPH mikrokristályok és egy hosszabb és egyenletesebb profilú vércukorszint szabályozást tesznek lehetővé. Ezt demonstrálják az alábbi kísérletek.

Egyes oldható protein-származékoknál azt találtuk, hogy a hatásideje nem különbözik számottevően a szabályos humán inzulinénál. Három állatcsoportot

használtunk. Az első csoportban minden egyes állat egy adag (0,75 nmol/kg) Humulin® R (oldható humán inzulin) készítményt, a második csoportban minden egyes állat egy adag (0,75 nmol/kg) oldható B29-Ná-oktanoil-humán inzulint („C8-hl”) a harmadik csoportban lévő állatok pedig egy adag (0,75 nmol/kg) oldható B29-Ná-dekanoil-humán inzulint („C10-hl”) kaptak. A kísérleteket az 5. példában leírtak szerint, csoportonként öt-öt kutyán hajtottuk végre. A proteinekét bőr alá adagoltuk. A vércukorszinteket mértük és ezeket az adatokat az alábbi táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

Vércukor koncentrációk a Humulin® R, az oldható B29-Ná-oktanoil-humán inzulin („C8-hl”), illetve az oldható B29-Ná-dekanoil-humán inzulin („C10-hl”) adagolása előtt és után, szimultán adott szomatosztatin által kiváltott átmeneti diabétikus állapotú normál kutyákban.

(Az értékek átlagoltak $\pm$ a standard hiba)

Idő (óra)	Vércukor koncentráció (mg/dl)		
	Humulin® R	Oldható C8-hl	Oldható C10-hl
-0,5	110 $\pm$ 2	115 $\pm$ 4	108 $\pm$ 2
0	101 $\pm$ 2	101 $\pm$ 7	96 $\pm$ 4
0,5	83 $\pm$ 5	80 $\pm$ 5	85 $\pm$ 6
1	54 $\pm$ 6	52 $\pm$ 4	70 $\pm$ 5
1,5	49 $\pm$ 4	51 $\pm$ 2	57 $\pm$ 4
2	48 $\pm$ 4	51 $\pm$ 2	52 $\pm$ 3

2,5	55±4	60±3	56±4
3	59±2	65±4	58±4
3,5	65±2	73±5	63±4
4	71±2	85±6	68±4
5	87±2	110±8	79±3
6	104±3	124±4	91±7
7	119±8	145±14	106±8
8	144±5	153±16	119±11

Ezekből az adatokból tisztán látszik, hogy az oldható B29-Ná-dekanoil-humán inzulin - szubkután adagolva átmeneti diabetikus állapotban lévő kutyáknak - nagyjából olyan vércukorszint csökkenést eredményez, mint amit az oldható humán inzulin esetében kaptunk. A legfeltűnőbbnek azt találtuk, hogy az oldható B29-Ná-oktanoil-humán inzulin gyorsabb hatáskezdést és rövidebb hatástartamot mutat a humán inzulinénál.

A második kísérletben tanulmányoztuk a találmány szerint előállított B29-Ná-oktanoil-humán inzulin kristályok oldhatóságának mértékét és azt tapasztaltuk, hogy feltűnően hosszabb a feloldódás időtartama, mint ami a gyárilag előállított sertés NPH inzulin esetében megfigyelhető. Az NPH sertés inzulin oldhatósági viszonyait mértük oly módon, hogy egy 1 cm hosszúságú szögletes kvarc küvettába, 22°C-on U100 NPH sertés inzulin 5 mikroliterét 3 ml Dulbecco foszfát puffert tartalmazó sóoldatba (kálcium ill. magnézium nélkül) tettük. Az oldatot egy mágneses keverővel folyamatosan kevertük. Az abszorbancia méréseket 320 nm-en 1 perces időközönként végeztük. A 320 nm-en kapott abszorbancia értékek összhangban vannak a vizes szuszpenzióban jelenlévő oldhatatlan részecskék fényszórásával.

Következésképpen a mikrokristályok oldódásakor az abszorbancia a nullához közelít. A kísérlet során nyert adatokat mutatja be az 1. táblázat, mely adatokból kitűnik, hogy a sertés NPH inzulin mikrokristályok kb. 1 óra elteltével teljesen feloldódtak.

Egy analóg eljárást követve megmértük a B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok oldhatóságának mértékét. 12 mikroliter (50 U/ml-től nem több) B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályokat tartalmazó szuszpenziót – melyet a 18. példa szerint állítottunk elő - 3 ml Dulbecco foszfát puffert tartalmazó sóoldatba (kálcium ill. magnézium mentes) tettük. Az oldatot 22°C-on egy mágneses keverővel folyamatosan kevertük. A kísérleti adatokat az 1. táblázatban mutatjuk be (folyamatos vonallal jelölve a találmány szerinti mikrokristály adataiból felvett görbét) melyekből jól látszik, hogy a B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok oldódásához több, mint 5 órára van szükség.

Ezekből a kísérletekből megállapítható, hogy a Dulbecco foszfát puffert tartalmazó sóoldatban (kálcium ill. magnézium mentes) – mely oldat bizonyos szempontokból az intersticiális (sejtek közötti) folyadékhoz hasonló – a B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok oldódása szignifikánsan lassabb, mint a sertés NPH mikrokristályoké. Ez az eredmény szintén nagyon meglepő volt a korábbi eredmények ismeretében, miszerint az oldható B29-Ná-oktanoil-humán inzulin hatásának ideje valamivel rövidebb, mint a humán inzuliné!

A szubkután intersticiális folyadék 0,3 mM humán szérum albumint tartalmaz. Ezért szükségesnek látszott egy harmadik kísérlet, amelyben a B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok és a sertés NPH mikrokristályok megközelítőleg azonos mennyiségének oldhatóságát hasonlítottuk össze, olyan Dulbecco foszfáttal pufferolt sóoldatban amely 0,3 mM humán szérum albumint tartalmaz.

A kísérlet végrehajtásához 25 ml NPH sertés inzulint (kb. 3,5 mg inzulin/ml) 2 ml Dulbecco foszfáttal pufferolt sóoldatba (kálcium és magnézium nélkül) öntöttünk, amely 0,3 mM humán szérum albumint tartalmazott. A kapott szuszpenziót kézzel finoman kavargattuk mindaddig, amíg a mikrokristályok kb. 3-5 perc alatt szemmel láthatóan feloldódtak.

A a B29-Na-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok oldhatóságának vizsgálatához 50 mikroliter - a 18. példa szerint előállított - B29-Na-oktanoil-humán inzulin mikrokristályos készítményt (kb. 1,8 mg/ml) 2 ml Dulbecco foszfáttal pufferolt sóoldatba (kálcium és magnézium mentes) öntöttünk, amely 0,3 mM humán szérum albumint tartalmazott. A kapott szuszpenziót kézzel finoman kavargattuk kb. 3-5 percig, míg a szuszpendált mikrokristályok minimális oldódása megfigyelhetővé vált. Az oldat lágy keverését mágneses keverővel folytattuk, míg a szuszpendált B29-Na-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok kb. 2 óra elteltével teljesen feloldódtak.

Ezek a kísérletek azt támasztják alá, hogy a B29-Na-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok oldódása 0,3 mM humán szérum albumint tartalmazó 2 ml Dulbecco foszfáttal pufferolt sóoldatból (kálcium és magnézium nélkül) szignifikánsan lassabb, mint a forgalomban lévő NPH sertés inzuliné.

Mivel az NPH inzulin készítmények hatástartama erősen függ a mikrokristályok bőr alatti intersticiális folyadékból történő feloldódásától, a fenti kísérletekből az a következtetés vonható le, hogy a B29-Na-oktanoil-humán inzulin mikrokristályos szuszpenziót tartalmazó készítmények a diabéteszes betegek szubkután adagolása esetén nyújtottabb hatásidővel bírnak, mint a szokásos NPH inzulin készítmények.

A találmány szerinti oldhatatlan készítmények lehetnek pálcika-szerű vagy szabálytalan morfológiájú kristályok vagy amorf precipitátumok. Az előnyös

oldhatatlan készítmények acilezett inzulint vagy acilezett inzulin-analógot, cinket – mely kb. 0,3 és kb. 0,7 mól mennyiségben van jelen a protein származék 1 móljára vonatkoztatva - egy fenolos konzerválószer, úgymint fenol, m-krezol, o-krezol, p-krezol, klórkrezol, metilparabén és ezek keverékei, amelyek a protein-származék R6 hexamer konformációjának kialakításához szükséges mennyiségben vannak jelen és a protein-származék 1 móljára számított kb. 0,15 – kb. 0,7 mól mennyiségű protamint tartalmaz.

A protein-származékok előnyösen acilezett proteinek és a találmány szerinti mikrokristályokban ill. készítményekben az acilezett proteinek előnyösen zsírsav-acilezett inzulin és zsírsav-acilezett inzulin-analógok. A legelőnyösebb a zsírsavval acilezett humán inzulin. A zsírsavval acilezett inzulin-analógok szintén nagyon előnyösek.

A találmány szerinti mikrokristályok előállítására azok az inzulin-analógok az előnyösek, amelyekben az aminosav-maradék a B28 helyzetben Asp, Lys, Leu, Val vagy Ala, a B29 helyen Lys vagy Pro, a B10 helyzetben His vagy Asp, a B1 helyzetben Phe, Asp vagy egy aminosav-elhagyás vagy ezek kombinálva a B2 helyen lévő aminosav elhagyással, a B30 helyzetben az aminosav-maradék Thr, Ala, Ser vagy Asp vagy aminosav-hiány, a B9 helyzetben az aminosav-maradék Ser vagy Asp és mind a B28 mind pedig a B29 helyeken Lys az aminosav-maradék.

Az inzulin-analógok egy másik – a találmányhoz használható – előnyös csoportját alkotják azok az inzulin-analógok, amelyek izoelektromos pontja kb. 7,0 és kb. 8,0 közötti. Ezeket az analógokat „pI-változtatott” inzulin-analógoknak nevezik. Ilyen analógok például az ArgB31,ArgB32-humán inzulin, GlyA21,ArgB31,ArgB32-humán inzulin, ArgA0,ArgB31,ArgB32-humán inzulin és az ArgA0,GlyA21,ArgB31,ArgB32-humán inzulin.

Az előnyös inzulin-analógok egy másik csoportjába tartoznak a következő analógok: LysB28-humán inzulin (B28 Lys, B29 Pro), AspB28- humán inzulin (B28 Asp), AspB1-humán inzulin, ArgB31,ArgB32-humán inzulin, ArgA0-humán inzulin, AspB1,GluB13-humán inzulin, AlaB26-humán inzulin, GlyA21-humán inzulin, desz(ThrB30)-humán inzulin és GlyA21,ArgB31,ArgB32-humán inzulin.

Különösen előnyös inzulin-analógok a LysB28,ProB29-humán inzulin, desz(ThrB30)-humán inzulin, AspB28-humán inzulin és az AlaB26-humán inzulin. Egy másik kifejezetten előnyös analóg GlyA21,ArgB31,ArgB32-humán inzulin [Dörschung M., 5,656,722 sz USA-beli szabadalmi leírás (1997.08.12.)]. A legelőnyösebb inzulin-analóg a LysB28,ProB29-humán inzulin.

Az előnyös acilezőszerek egyik csoportját felerészben az egyenesláncú, telített zsírsavak alkotják. Ebbe a csoportba tartozik a hangyasav (C1), ecetsav (C2), propánsav (C3), n-butánsav (C4), n-pentánsav (C5), n-hexánsav (C6), n-heptánsav (C7), n-oktánsav (C8), n-nonánsav (C9), n-dekánsav (C10), n-undekánsav (C11), n-dodekánsav (C12) n-tridekánsav (C13), n-tetradekánsav (C14), n-pentadekánsav (C15), n-hexadekánsav (C16), n-heptadekánsav (C17) és az n-oktadekánsav (C18). Savcsoportként definiálva: formil (C1), acetil (C2), propionil (C3), butiril (C4), pentanoil (C5), hexanoil (C6), heptanoil (C7), oktanoil (C8), nonanoil (C9), dekanoil (C10), undekanoil (C11), dodekanoil (C12), tridekanoil (C13), tetradekanoil (C14) vagy mirisztoil, pentadekanoil (C15), hexadekanoil (C16) vagy palmitil, heptadekanoil (C17) és oktadekanoil (C18).

A találmány szerinti mikrokristályokban alkalmazott zsírsav-acilezett proteinek előállítására előnyösek a páros számú C2, C4, C6, C8, C10, C12, C16 és C18 szénatomos telített zsírsavak.

A találmány szerinti előnyös zsírsavak egy másik csoportját alkotják azok amelyek szénatomszáma 5-nél több, azaz a C6-C18 szénatomos telített zsírsavak.

A találmány szerint előnyös zsírsavak egy harmadik csoportjába tartoznak azok a zsírsavak amelyek szénatomszáma 9-nél kevesebb, ilyenek a C1-C8 szénatomos telített zsírsavak.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma 6 és 8 közötti, azaz a C6, C7 és C8 szénatomos telített zsírsavak.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma 4 és 6 közötti, azaz a C4, C5 és C6 szénatomos telített zsírsavak.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma 2 és 4 közötti, azaz a C2, C3 és C4 szénatomos zsírsavak.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma kevesebb, mint 6 – ilyenek a C1, C2, C3, C4 és a C5 szénatomos telített zsírsavak.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma kevesebb, mint 4 – ilyenek a C1, C2 és a C3 telített zsírsavak.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma több, mint 9 – ilyenek a C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17 és a C18 szénatomos zsírsavak.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma páros számú és 9-nél több, ilyenek a C10, C12, C14, C16 és a C18 szénatomos telített zsírsavak.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma 12, 14 és 16 – ilyenek a C12, C14 és a C16 szénatomos telített zsírsavak.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma 14 vagy 16. A C14 szénatomos zsírsavak különösen előnyösek, és ugyanúgy nagyon előnyösek C16 szénatomos zsírsavak is.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a telített zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma 4 és 10 közötti – ilyenek C4, C5, C6, C7, C8, C9 és a C10 szénatomos telített zsírsavak.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a telített zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma páros számú és 4 és 10 közötti – ilyenek a C4, C6, C8 és a C10 szénatomos telített zsírsavak.

A találmány szerinti proteinek acilezésére alkalmas zsírsavak további előnyös csoportját azok a zsírsavak alkotják, amelyek szénatomszáma 6, 8 vagy 10. A 6 szénatomos zsírsavak különösen előnyösek. Szintén nagyon előnyösek a 8 szénatomos zsírsavak csakúgy, mint a 10 szénatomosak.

Szakember számára nem jelent problémát, hogy a zsírsavak fent leírt csoportjainak kombinálásával a találmány megvalósításához egy szűkebb, előnyös zsírsav csoportot alkosson.

Az előnyös acilezőszerek csoportjának másik felét az elágazó láncú, telített zsírsavak alkotják. Az elágazó láncú zsírsavaknak legkevesebb két elágazásuk van.



Az elágazó láncú zsírsavakban az „elágazás” hossza leírható az elágazásban lévő szénatomok számával, kezdve a számozást a savcsoport szénatomjával. Például az elágazó láncú 3-etil-5-metil-hexánsavnak három elágazása van, melyek öt, hat és hat szénatomos hosszúságúak. Ebben az esetben a leghosszabb elágazás hat szénatomos. Egy másik példa tekintve, a 2,3,4,5-tetraetil-oktánsav esetében öt elágazás van, melyek 4,5,6,7 és 8 szénatomosak. A leghosszabb elágazás nyolc szénatomos. Az elágazó láncú zsírsavak egyik előnyös csoportjába tartoznak azok a zsírsavak, melyekben a leghosszabb elágazás 3 és 10 szénatomszám közötti.

A könnyebb megértés kedvéért néhány ilyen jellegzetes elágazó láncú zsírsavat sorolunk fel, melyek a találmány estében a proteinek acilezésére alkalmazhatóak: 2-metil-propionsav, 2-metil-butírsav, 3-metil-butírsav, 2,2-dimetil-propionsav, 2-metil-pentánsav, 3-metil-pentánsav, 2,2-dimetil-butírsav, 2,3-dimetil-butírsav, 3,3-dimetil-butírsav, 2-etil-butírsav, 2-metil-hexánsav, 5-metil-hexánsav, 2,2-dimetil-pentánsav, 2,4-dimetil-pentánsav, 2-etil-pentánsav, 3-etil-pentánsav, 2,2-dimetil-3-metil-butírsav, 2-metil-heptánsav, 3-metil-heptánsav, 4-metil-heptánsav, 5-metil-heptánsav, 6-metil-heptánsav, 2,2-dimetil-hexánsav, 2,3-dimetil-hexánsav, 2,4-dimetil-hexánsav, 2,5-dimetil-hexánsav, 3,3-dimetil-hexánsav, 3,4-dimetil-hexánsav, 3,5-dimetil-hexánsav, 4,4-dimetil-hexánsav, 2-etil-hexánsav, 3-etil-hexánsav, 4-etil-hexánsav, 2-propil-pentánsav, 2-etil-hexánsav, 3-etil-hexánsav, 4-etil-hexánsav, 2-(1-propil)-pentánsav, 2-(2-propil)-pentánsav, 2,2-di-etil-butírsav, 2,3,4-trimetil-pentánsav, 2-metil-oktánsav, 4-metil-oktánsav, 7-metil-oktánsav, 2,2-dimetil-heptánsav, 2,6-dimetil-heptánsav, 2-etil-2-metil-hexánsav, 3-etil-5-metil-hexánsav, 3-(1-propil)-hexánsav, 2-(2-butil)-pentánsav, 2-(2-(2-metil-propil))-pentánsav, 2-metil-nonánsav, 8-metil-nonánsav, 6-etil-oktánsav, 4-(1-propil)-heptánsav, 5-(2-propil)-heptánsav, 3-metil-undekánsav, 2-pentil-heptánsav, 2,3,4,5,6-pentametil-heptánsav,

2,6-dietil-oktánsav, 2-hexil-oktánsav, 2,3,4,5,6,7-hexametil-oktánsav, 3,3-dietil-4,4-dietil-hexánsav, 2-heptil-nonánsav, 2,3,4,5-tetraetil-oktánsav, 2-oktil-dekánsav és 2-(1-propil)-3-(1-propil)-4,5-dietil-6-metil-heptánsav.

Az acilezőszerek egy további előnyös csoportját alkotják az 5-24 szénatomos cikloalkil-savak, ahol a cikloalkilrész vagy részek 5-7 szénatomból állnak.

A könnyebb megértés kedvéért néhány ilyen jellegzetes cikloalkil-savat sorolunk fel, melyek a találmány esetében a proteinek acilezésére alkalmazhatóak: ciklopentil-formilsav, ciklohexil-formilsav, 1-ciklopentil-ecetsav, 2-ciklohexil-ecetsav, 1,2-diciklopentil-ecetsav és ehhez hasonlóak.

A találmány szerinti mikrokristályokban alkalmazott protein-származékok egy előnyös csoportját képezik a monoacilezett proteinek. A monoacilezés az α -aminocsoportnál a legelőnyösebb. Inszulin esetében előnyös a LysB29-nél végzett acilezés. Ehhez hasonlóan bizonyos inzulin-analógoknál, úgymint LysB28, ProB29-humán inzulin, a monoacilezés a LysB28 α -aminocsoportjánál a legelőnyösebb. A B-lánc (B1) α -aminocsoportjának mono-acilezése szintén előnyös, csakúgy mint az A-lánc (A1) α -aminocsoportjának mono-acilezése.

A találmány szerinti mikrokristályokban alkalmazott protein-származékok másik előnyös csoportját képezik a diacilezett proteinek. A diacilezés történhet pl. a Lys α -aminocsoportnál és a B-lánc α -aminocsoportjánál, vagy a Lys α -aminocsoportnál és a A-lánc α -aminocsoportjánál, vagy A-lánc α -aminocsoportjánál és a B-lánc α -aminocsoportjánál.

A találmány szerinti mikrokristályokban alkalmazott protein-származékok másik előnyös csoportját képezik a triacilezett proteinek. A triacilezett proteinek a Lys α -aminocsoportjánál, a B-lánc α -aminocsoportjánál és az A-lánc α -aminocsoportjánál vannak acilezve.

A monoacilezett és a diacilezett proteinek keverékének alkalmazása szintén előnyös.

Hasonlóképpen előnyös a monoacilezett és a triacilezett proteinek keverékének alkalmazása.

A diacilezett és triacilezett proteinek keverékének alkalmazása ugyanúgy előnyös.

Fentiekhez hasonlóan előnyös továbbá, az olyan keverék alkalmazása is amely monoacilezett, diacilezett és triacilezett proteint tartalmaz.

A találmány könnyebb megértése kedvéért néhány ilyen jellegzetes zsírsav-acilezett proteint sorolunk fel, melyek a találmány szerinti mikrokristályokban felhasználhatók. A felsorolás csupán szemléltető jellegű és az a tény, hogy egy adott zsírsav-acilezett protein nem szerepel a felsorolásban még nem jelenti azt, hogy nem tartozik bele a találmány körébe.

B29-Ná-formil-humán inzulin.

B1-Ná-formil-humán inzulin.

A1-Ná-formil-humán inzulin.

B29-Ná-formil-, B1-Ná-formil-humán inzulin.

B29-Ná-formil-, A1-Ná-formil-humán inzulin.

A1-Ná-formil-, B1-Ná-formil-humán inzulin.

B29-Ná-formil-, A1-Ná-formil-, B1-Ná-formil-humán inzulin.

B29-Ná-acetil-humán inzulin.

B1-Ná-acetil-humán inzulin.

A1-Ná-acetil-humán inzulin.

B29-Ná-acetil-, B1-Ná-acetil-humán inzulin.

B29-Ná-acetil-, A1-N-acetilá-humán inzulin.

A1-Ná-acetil-, B1-Ná-acetil-humán inzulin.

B29-Á-acetil-, A1-Ná-acetil-, B1-Ná-acetil-humán inzulin.

B29-Ná-propionil-humán inzulin.

B1-Ná-propionil-humán inzulin.

A1-Ná-propionil-humán inzulin.

B29-Ná-propionil-, B1-Ná-propionil-humán inzulin.

B29-Ná-propionil-, A1-Ná-propionil-humán inzulin.

A1-Ná-propionil-, B1-Ná-propionil-humán inzulin.

B29-Ná-propionil-, A1-Ná-propionil-, B1-Ná-propionil-humán inzulin.

B29-Ná-butiril-humán inzulin.

B1-Ná-butiril-humán inzulin.

A1-Ná-butiril-humán inzulin.

B29-Ná-butiril-, B1-Ná-butiril-humán inzulin.

B29-Ná-butiril-, A1-Ná-butiril-humán inzulin.

A1-Ná-butiril-, B1-Ná-butiril-humán inzulin.

B29-Ná-butiril-, A1-Ná-butiril-, B1-Ná-butiril-humán inzulin.

B29-Ná-pentanoil-humán inzulin.

B1-Ná-pentanoil-humán inzulin.

A1-Ná-pentanoil-humán inzulin.

B29-Ná-pentanoil-, B1-Ná-pentanoil-humán inzulin.

B29-Ná-pentanoil-, A1-Ná-pentanoil-humán inzulin.

A1-Ná-pentanoil-, B1-Ná-pentanoil-humán inzulin.

B29-Ná-pentanoil-, A1-Ná-pentanoil-, B1-Ná-pentanoil-humán inzulin.

B29-Ná-hexanoil-humán inzulin.

B1-Ná-hexanoil-humán inzulin.

A1-Ná-hexanoil-humán inzulin.

B29-Ná-hexanoil-, B1-Ná-hexanoil-humán inzulin.

B29-Ná-hexanoil-, A1-Ná-hexanoil-humán inzulin.

A1-Ná-hexanoil-, B1-Ná-hexanoil-humán inzulin.

B29-Ná-hexanoil-, A1-Ná-hexanoil-, B1-Ná-hexanoil-humán inzulin.

B29-Ná-heptanoil-humán inzulin.

B1-Ná-heptanoil-humán inzulin.

A1-Ná-heptanoil-humán inzulin.

B29-Ná-heptanoil-, B1-Ná-heptanoil-humán inzulin.

B29-Ná-heptanoil-, A1-Ná-heptanoil-humán inzulin.

A1-Ná-heptanoil-, B1-Ná-heptanoil-humán inzulin.

B29-Ná-heptanoil-, A1-Ná-heptanoil-, B1-Ná-heptanoil-humán inzulin.

B29-Ná-oktanoil-humán inzulin.

B1-Ná-oktanoil-humán inzulin.

A1-Ná-oktanoil-humán inzulin.

B29-Ná-oktanoil-, B1-Ná-oktanoil-humán inzulin.

B29-Ná-oktanoil-, A1-N-oktanoil-humán inzulin.

A1-Ná-oktanoil-, B1-Ná-oktanoil-humán inzulin.

B29-Ná-oktanoil-, A1-Ná-oktanoil-, B1-Ná-oktanoil-humán inzulin.

B29-Ná-nonanoil-humán inzulin.

B1-Ná-nonanoil-humán inzulin.

A1-Ná-nonanoil-humán inzulin.

B29-Ná-nonanoil-, B1-Ná-nonanoil-humán inzulin.

B29-Ná-nonanoil-, A1-Ná-nonanoil-humán inzulin.

A1-Ná-nonanoil-, B1-Ná-nonanoil-humán inzulin.

B29-Ná-noanoil-, A1-Ná-nonanoil-, B1-Ná-nonanoil-humán inzulin.

B29-Ná-dekanoil-humán inzulin.

B1-Ná-dekanoil-humán inzulin.

A1-Ná-dekanoil-humán inzulin.

B29-Ná-dekanoil-, B1-Ná-dekanoil-humán inzulin.

B29-Ná-dekanoil-, A1-Ná-dekanoil-humán inzulin.

A1-Ná-dekanoil-, B1-Ná-dekanoil-humán inzulin.

B29-Ná-dekanoil-, A1-Ná-dekanoil-, B1-Ná-dekanoil-humán inzulin.

B28-Ná-formil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B1-Ná-formil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-formil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-formil-, B1-Ná-formil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-formil-, A1-Ná-formil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-formil-, B1-Ná-formil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-formil-, A1-Ná-formil-, B1-Ná-formil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-acetil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B1-Ná-acetil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-acetil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-acetil-, B1-Ná-acetil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-acetil-, A1-Ná-acetil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-acetil-, B1-Ná-acetil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-acetil-, A1-Ná-acetil-, B1-Ná-acetil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-propionil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B1-Ná-propionil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-propionil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-propionil-, B1-Ná-propionil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B29-Ná-propionil-, A1-Ná-propionil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-propionil-, B1-Ná-propionil-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

B28 Ná-propionil-, A1-Ná-propionil-, B1-Ná-propionil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-butiril-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

B1-Ná-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-butiril-, B1-Ná-butiril-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-butiril-, A1-Ná-butiril-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-butiril-, B1-Ná-butiril-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-butiril-, A1-Ná-butiril-, B1-Ná-butiril-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-pentanoil-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

B1-Ná-pentanoil-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-pentanoil-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-pentanoil-, B1-Ná-pentanoil-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-pentanoil-, A1-Ná-pentanoil-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-pentanoil-, B1-Ná-pentanoil-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-pentanoil-, A1-Ná-pentanoil-, B1-Ná-pentanoil-LysB28,Pro29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B1-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-hexanoil-, B1-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-hexanoil-, A1-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-haxanoil-, B1-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-hexanoil-, A1-Ná-hexanoil-, B1-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-heptanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B1-Ná-heptanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-heptanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-heptanoil-, B1-Ná-heptanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-heptanoil-, A1-Ná-heptanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-heptanoil-, B1-Ná-heptanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-heptanoil-, A1-Ná-heptanoil-, B1-Ná-heptanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-oktanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B1-Ná-oktanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-oktanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-oktanoil-, B1-Ná-oktanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-oktanoil-, A1-Ná-oktanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-oktanoil-, B1-Ná-oktanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-oktanoil-, A1-Ná-oktanoil-, B1-Ná-oktanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-nonanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B1-Ná-nonanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-nonanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-nonanoil-, B1-Ná-nonanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-nonanoil-, A1-Ná-nonanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-nonanoil-, B1-Ná-nonanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-nonanoil-, A1-Ná-nonanoil-, B1-Ná-nonanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-dekanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B1-Ná-dekanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-dekanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-dekanoil-, B1-Ná-dekanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-Ná-dekanoil-, A1-Ná-dekanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

A1-Ná-dekanoil-, B1-Ná-dekanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B28-N-dekanoil-, A1-Ná-dekanoil-, B1-Ná-dekanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

B29-N-pentanoil-GlyA21,Arg31,Arg32-humán inzulin.

B1-Ná-hexanoil-GlyA21,Arg31,Arg32-humán inzulin.

A1-Ná-heptanoil-GlyA21,Arg31,Arg32-humán inzulin.

B29-N-oktanoil-, B1-Ná-oktanoil-GlyA21,Arg31,Arg32-humán inzulin.

B29-N-propionil-, A1-Ná-propionil-GlyA21,Arg31,Arg32-humán inzulin.

A1-Ná-acetil-, B1-Ná-acetil-GlyA21,Arg31,Arg32-humán inzulin.

B29-Ná-formil-, A1-Ná-formil-, B1-Ná-formil-GlyA21,Arg31,Arg32-humán inzulin.

B29-Ná-formil-desz (TyrB26)-humán inzulin.

B1-Ná-acetil-AspB28-humán inzulin.

B29-Ná-propionil-, A1-Ná-propionil-, B1-Ná-propionil-AspB1,AspB3,AspB21-humán inzulin.

B29-Ná-pentanoil-Gly21-humán inzulin.

B1-Ná-hexanoil-GlyA21-humán inzulin.

A1-Ná-heptanoi-GlyA21-humán inzulin.

B29-Ná-oktanoil-, B1-Ná-oktanoil-GlyA21-humán inzulin.

B29-Ná-propionil-, A1-Ná-propionil-GlyA21-humán inzulin.

A1-Ná-acetil-, B1-Ná-acetil-GlyA21-humán inzulin.

B29-Ná-formil-, A1-Ná-formil-, B1-Ná-formil-GlyA21-humán inzulin.

B29-Ná-butilil-desz (ThrB30)-humán inzulin.

B1-Ná-butilil-desz (ThrB30)-humán inzulin.

A1-Ná-butilil-desz (ThrB30)-humán inzulin.

B29-Ná-butilil-, B1-Ná-butilil-desz (ThrB30)-humán inzulin.

B29-Ná-butilil-, A1-Ná-butilil-desz (ThrB30)-humán inzulin.

A1-Ná-butilil-, B1-Ná-butilil-desz (ThrB30)-humán inzulin.

B29-Ná-butilil-, A1-Ná-butilil-, B1-Ná-butilil-desz (ThrB30)-humán inzulin.

A vizes készítmények fő oldószerként előnyösen vizet tartalmaznak. Azok a szuszpenziók, amelyekben víz az oldószer különösen előnyösek.

A találmány szerinti készítmények diabéteszes vagy hiperglikémiás betegek kezelésére alkalmasak. A találmány tárgyát képező készítményekben a protein-származék koncentrációja jellemzően kb. 1 mg/ml és kb. 10 mg/ml közötti. Ezek az inzulin-vegyületeket tartalmazó készítmények jól jellemezhetők az un. inzulin aktivitási egység koncentrációjával (egység/ml), úgymint U40, U50, U100 stb., amely egyenként, hozzávetőlegesen 1,4 1,75 és 3,5 mg/ml-nek felel meg. A dózis, az adagolás menete és a napi adagok száma függ a páciens betegségének típusától és okától, a páciens nemétől, súlyától, mozgékonyaságától, táplálkozási szokásaitól, az adagolás módjától és más egyéb tényezőktől melyet a szakterületen jártas orvosok jól ismernek, és amelyeket a kezelőorvosnak szem előtt kell tartania. A napi adag széles határok között változhat: kb. 1 nmól/kg testsúly és kb. 6 nmól /kg testsúly közötti lehet (6 nmól ekvivalens kb. 1 inzulin aktivitási egységgel). Jelen inzulin terápiában a jellemző dózis kb. 2 és 3 nmól/kg közötti érték.

Az inzulin terápiában jártas szakorvos ki tudja választani a találmány szerinti készítmények azon adagolási módját, amely terápiásan a legelőnyösebb. Az inzulin tartalmú szuszpenziós készítmények parenterális adagolásának jellemző módja szubkután és az intramuszkuláris alkalmazás. A találmány szerinti készítmények adagolhatók nazálisan, bukkálisan, pulmonárisan vagy okkulárisan is.

Izotonizálószerként a 12 mg/ml és 25 mg/ml közötti koncentrációjú glicerín előnyös. Még előnyösebb izotonizálási célra a glicerín használata kb. 15 mg/ml és kb. 17 mg/ml közötti koncentrációban.

A találmány szerinti készítményekben előnyös konzerválószer az m-krezol és a fenol vagy ezek keverékei.

A protein-származékok előállíthatók inzulin, inzulin-analógok vagy proinzulinok felhasználásával számos ismert peptid szintézises módszerekkel, melybe beletartoznak a klasszikus (oldat) eljárások, szilárd fázisú eljárások, félszintetikus módszerek és a legújabb rekombináns DNS technikák. Ld. például: Chance R.E. és munkatársai, 5,514,646 sz. USA-beli szabadalmi leírás (1996.02.07.), Brange J.J. és munkatársai 214,826 sz. EP szabadalmi leírás (1987.03.18.) és Belagaje R.M. és munkatársai, 5,304,473 sz. USA-beli szabadalmi leírás (1994.04.19), ezekben a szabadalmi publikációkban különféle proinzulin és inzulin analógok előállítását ismertetik. Ezeket a publikációkat a technika állásához tartozóknak tekintjük.

A protein-származékokat általában a szakirodalomban ismert eljárásokkal állítjuk elő. A fent felsorolt publikációk protein-származékok előállítására alkalmas eljárásokat közölnek. Ezeket a publikációkat kifejezetten a protein-származékok előállítására vonatkozó referenciaként említjük. Az acilezett proteinek előállításakor a proteint reagáltatjuk egy aktivált szerves savval azaz egy aktivált zsírsavval. Az aktivált zsírsavak rendszeresen alkalmazott acilezőszerek származékai, melyek közé

tartoznak a zsírsav-észterek, zsírsavak halogén származékai, aktivált zsírsavamidok, úgymint aktivált azolid-származékok [Hansen L.B. WO 98/02460 sz. PCT közrebocsátási irat (1998.01.22.)] és zsírsavanhidridek. Az aktivált zsírsavészterek használata – különösen a zsírsavak N-hidroxi-szukcinimid észtereinek használata – nagyon előnyös a szabad aminoscsoportok zsírsavval történő acilezésére. Lapidot és munkatársai N-hidroxi-szukcinimidészterek előállítását és ezek alkalmazását írják le N-lauril-L-gutaminsav, N-lauril-L-serin és N-lauril-L-glicin előállítására. Az „aktivált zsírsav-észter” kifejezés olyan zsírsavat jelent, amelyet a szakirodalomban ismert módszerekkel aktiváltak [Riordan J.F. és Vallee B.L., Methods in Enzimology, XXV : 494-499 (1972), Lapidot Y. és munkatársai, J.Lipid Res. 8: 142-145 (1967)]. Hidroxi-benzotriazid (HOBt), N-hidroxi-szukcinimid és ezek származékai jól ismertek a peptid szintéziseknél használt aktivált savak előállítására.

Az α -aminocsoport szelektív acilezéséhez különböző védőcsoportok használhatók annak érdekében, hogy az α -aminocsoportok blokkolva legyenek az acilezés időpontjában. Az e célra alkalmas védőcsoportok szakember számára közismertek, ezek közé tartozik pl. a p-metoxi-benzoxi.karbonil (pmZ). Az α -aminocsoportok acilezése előnyösen egy lépésben történik, amino-védőcsoport alkalmazása nélkül. Lizin N α -aminocsoportjának szelektív acilezési eljárását Baker J.C. és munkatársai az 5,646,242 sz. USA-beli szabadalmi leírásban (1997.07.08.) igénylik, mely szabadalmi leírás teljes tartalmára referenciaként hivatkozunk. Acilezett protein tartalmú száraz por előállítását közlik Baker J.C. és munkatársai az 5,700,904 sz. USA-beli szabadalmi leírásban (1997.12.23.), mely leírás teljes tartalmára referenciaként hivatkozunk.

A cink elsődleges szerepe jelen találmányban az, hogy megkönnyítse a protein-származék hexamer struktúrájának kialakulását. A cink e képessége

ismeretes inzulin és inzulin-analógok hexamerjei esetében. A cink ugyanúgy elősegíti a inzulin-származék hexamerek képződését, mint az inzulin-analógokét. A hexamer szerkezet kialakítható oly módon, hogy a protein-származékot tartalmazó oldat pH-ját Zn (II) ionok jelenlétében semlegesre állítjuk, vagy a Zn (II) ionokat a pH semleges értékre történő beállítása után adjuk az oldathoz.

A találmány szerinti mikrokristályokban ill. amorf precipitátumokban a cink aránya a protein-származékhoz a mikrokristályok vagy amorf precipitátumok eredményes kitermelése szempontjából meghatározó, mégpedig ez az arány nem lehet kevesebb, mint 0,33, vagyis 2 cink atom szükséges protein-származék-hexamerenként a megfelelő hexamerizációhoz. A mikrokristályok és amorf precipitátumok alkalmas módon előállíthatók abban az esetben, amennyiben a cink atomok száma kb. 2 és kb. 4-6 közötti érték. A cink még inkább használható akkor, ha az eljárást olyan vegyület – mint pl. citrát vagy foszfát - jelenlétében hajtjuk végre, amely versenyez a proteinnel cinkkötésekért. A hexamerizációhoz szükséges mennyiség feletti cink többlet kívánatos lehet a még szilárdabb hexamer szerkezet létrejöttéhez. Ezenkívül ha a hexamerizációhoz szükséges mennyiség feletti cink többlet van jelen a találmány szerinti készítményben javulhat a kémiai és fizikai stabilitás, a szuszpendálhatóság, és lehetséges a hatástartam további meghosszabbodása is. Következésképpen a cink : protein arány eléggé széles határok között megengedhető a találmány szerinti készítményekben.

A találmánynak megfelelően a cink kb. 0,3 és kb. 7 mól/mól protein-származék, előnyösebben kb. 0,3 és kb. 1,0 mól/mól protein-származék mennyiségben van jelen a készítményben. Még előnyösebb a 0,3 és 0,7 mól cinkatom/mól protein-származék közötti arány. A legelőnyösebb cink/protein arány a 0,30 és 0,55 mól/mól közötti. A kivételesen jó cink készítmények a PZI

készítményekhez hasonlóan 7 mól/mól protein-származék arányban tartalmaznak cinket.

A találmányban alkalmazható cinkvegyület gyógyszerészetileg elfogadható cinkvegyület lehet. Cink hozzáadása inzulin készítményekhez gyógyszerészetileg elfogadható cink-források formájában a szakirodalomban ismert. A találmány szerint előnyös cinkvegyületek közé tartozik a cink-klorid, cink-acetát, cink-citrát, cink-oxid és a cink-nitrát.

A találmány szerinti mikrokristályok és amorf precipitátumok esetében szükség van komplexképző vegyület alkalmazására. A komplexképző vegyületnek elegendő mennyiségben kell jelen lennie ahhoz, hogy a protein-származék hexamerek teljes precipitációja és kristályosodása végbemenjen. Az egyes készítményekhez használt különböző komplexképző vegyület mennyisége egyszerű titrálással könnyedén meghatározható. A komplexképző vegyület koncentrációját ideálisan úgy állítjuk be, hogy a precipitáció és a kristályosítás befejezése után elhanyagolható mennyiségű komplexképző vegyület maradjon az oldható fázisban. Ezt szükséges kombinálni a kísérleti úton meghatározott „izofán” hányadossal számított komplexképző vegyülettel. Ez a hányados várhatóan nagyon hasonló az NHP és az NPL készítményekhez. Ugyanakkor némileg különbözhet azoktól, mert az acilezés hatással van a protein-protamin interakciók természetére.

Amennyiben protamint alkalmazunk komplexképzőként, e szer mennyisége a mikrokristályban kb.0,15 mg és kb.0,5 mg közötti 3,5 mg protein-származékenként. A protamin aránya a protein-származékhoz előnyösen kb.0,25 és kb.0,40 (mg/mg) közötti, még előnyösebben kb.0,25 és kb.0,38 (mg/mg) közötti. A protein előnyösen kb.0,05 mg és kb.0,2 mg közötti mennyiségben, még előnyösebben kb.0,05 és

kb.0,15 mg közötti mennyiségben van jelen 1 mg protein-származékre vonatkoztatva. A találmányban használható előnyös protein-só a protein-szulfát.

A találmány szerinti készítmények hatóidejének további meghosszabbításához, vagy a szuszpendálhatóság javulásához további protamin és cink adható a kristályosítás után. Ennel megfelelően a találmány tárgykörébe tartoznak azok a készítmények is, amelyek az izofán hányadosnál nagyobb mennyiségben tartalmaznak protamint. Ezekben a készítményekben a protamin aránya a protein-származékhoz kb.0,25 és kb.0,5 közötti (mg/mg).

A találmány szerinti mikrokristályok és precipitátumok elengedhetetlen komponensei a hexamer-stabilizáló vegyületek. Három hexamer szerkezet konformációját már leírták a szakirodalomban és T6, T3R3 és R6 néven jelölték. Hexamer-stabilizáló szerek – mint pl. különböző fenol-vegyületek – jelenlétében az R6 konformáció stabilizálódik. Ezért nagyon valószínű, hogy hexamer-stabilizáló vegyület - úgymint fenol-vegyület – jelenlétében a hexamerek az R6 vagy a T3R3 konformációt veszik fel a találmány szerinti kristályokban és precipitátumokban. A hexamer-stabilizáló vegyületek széles skálája alkalmazható. Legalább 2 mól hexamer-stabilizáló vegyület protein-származék hexamerenként elegendő az eredményes hexamer stabilizációhoz. A találmány szerinti mikrokristályokban és precipitátumokban előnyösen legalább 3 mól hexamer-stabilizáló vegyület szükséges protein-származék hexamerenként az eredményes hexamerizációhoz. Nagyobb arányú – legalább 25-50-szeresen nagyobb - hexamer-stabilizáló vegyületek jelenléte abban az oldatban, amelyben a mikrokristályokat és a precipitátumokat állítjuk elő, nem fogja kedvezőtlenül befolyásolni a hexamer-stabilizációt.

A találmány szerinti készítmények tartalmazhatnak konzerválószeret, különösen akkor, ha a készítményeket különféle időpontokban akarjuk kipróbálni.

Amint azt már fent említettük, a használható konzerválószeres széles tárháza ismeretes. A konzerválószeres az oldatban előnyösen olyan mennyiségben vannak jelen, amely a gyógyszerkönyvi előírásoknak megfelelő antimikrobás hatást biztosít.

Előnyös konzerválószeres a fenolos konzerválószeres, melyeket korábban már felsoroltunk. A fenolos konzerválószeres előnyös koncentrációja a vizes szuszpenzió milliliterére számítva kb.2 mg/ml és kb.5 mg/ml közötti érték. Mivel egyes fenolos konzerválószer keverékek is felhasználhatók, ezért ezek a koncentráció értékek a fenolos konzerválószeres össztömegére vonatkoznak. Alkalmazható fenolos konzerválószeres közé tartoznak pl. a fenol, m-krezol és a metil-parabén. A fenolos konzerválószeres – mint pl. fenol és krezol – keverékei szintén nagyon előnyösek. Fenolos vegyület keverékek például a 0,6 mg/ml fenol és 1,6 mg/ml m-krezol, valamint a 0,7 mg/ml fenol és 1,8 mg/ml m-krezol keveréke.

A találmány szerinti mikrokristályok előnyösen hosszúkás alakú, önálló kristályok és két vegyértékű kationnal komplexet alkotó protein-származékból állnak továbbá komplex-stabilizáló és hexamer-stabilizáló vegyületet tartalmaznak. A találmány szerinti mikrokristályok hossza előnyösen az 1mikron – 40 mikron, még előnyösebben a 3 mikron – 15 mikron intervallumon belül van.

A készítmény előnyösen kb.3 mg és kb.6 mg közötti mennyiségű protamin-szulfátot és kb.0,1 mg és kb.0,4 mg közötti mennyiségű cinket tartalmaz 35 mg-nyi protein-származékonként. Egy másik előnyös készítmény kb.10 mg és kb.17 mg közötti mennyiségű protamin-szulfátot és kb.2,0 mg és kb.2,5 mg közötti mennyiségű cinket tartalmaz 35 mg-nyi protein-származékonként. Egy további előnyös készítmény 0,34mg – 0,38 mg közötti mennyiségű protamin-szulfátot és 0,01 mg – 0,04 mg közötti mennyiségű cinket és 3,2 mg - 3,8 mg protein-származékot tartalmaz milliliterenként.

Az oldhatatlan készítmények diabétesz és hiperglikémia kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására is alkalmazhatóak. A találmány szerinti amorf precipitátumok és kristályok sokféle eljárással készíthetők el gyógyszerkénti használatra vagy más egyéb célra. Az alkalmazott eljárások általában az alábbi sorrendben következnek: szolubilizálás, hexamerizáció, komplexképzés, precipitáció, kristályosítás és fakultatív lépésként formulálás. A szolubilizálás a protein-származék olyan mértékű feloldását jelenti, amely lehetővé teszi a hexamerek kialakulását. A hexamerizáció olyan eljárást jelent, amelyben a protein-származék molekulák cinkkel való kötődés révén hexamereket alakítanak ki. A komplexképzés oldhatatlan komplexek kialakítását jelenti a hexamerek és a protamin között. A precipitáció az oldhatatlan komplexek jellegzetes formáját eredményezi. A kristályosítás a precipitált hexamer/protamin komplexek kristályokká, mégpedig jellegzetes pálcika-szerű kristályokká történő átalakítását foglalja magába.

A szolubilizáláskor a protein-származék vizes oldatban történő feloldása történik meg. A vizes oldószer lehet pl. egy savas oldat, semleges oldat vagy egy lúgos oldat. A vizes oldószer tartalmazhat vele elegyedő szerves oldószert, úgymint etanol, acetonitril, dimetil-szulfoxid és ehhez hasonlók. A savas oldatok lehetnek pl. sósavas oldatok, melyekben a sósavtartalom előnyösen kb. 0,01 N és kb. 1,0 N közötti. Más egyéb savak, melyek gyógyszerészetileg elfogadhatók éppúgy használhatóak. A lúgos oldatok lehetnek pl. nátrium-hidroxid-oldatok, előnyösek azok, amelyek nátrium-hidroxidtartalma kb. 0,01 N és 1,0 N közötti, vagy több. Egyéb gyógyszerészetileg elfogadható bázisok is használhatóak. A protein stabilitása miatt a savat vagy a lúgot csak olyan koncentrációban előnyös alkalmazni, ami még éppen elegendő a protein-származék megfelelő feloldódásához.

Sok protein-származék oldható semleges pH értéken. A protein-származékot semleges pH-nál feloldani képes oldatok puffert és tetszőlegesen sókat, egy fenol-vegyületet vagy vegyületeket, cinket vagy egy izotonizáló szert tartalmazhatnak. Az oldódási viszonyoknak olyanoknak kell lenniük, hogy az oldatban lehetőség legyen a derivált proptein-cink hexamerek kialakulására. A hexamer stabilizáló vegyület jelenléte előnyösen befolyásolja a protein-származék-hexamer konformációját és az R6 vagy T3R3 hexamer konformációk kialakulását segíti elő.

A komplexképzési lépésnek tartalmaznia kell a protamin hexamerrel történő egyesítését az oldatban, ahol kezdetben mindegyik oldható. Ez kivitelezhető oly módon, hogy a hexamer állapotú protein-származék és a protamin különálló oldatát egyesítjük vagy protein-származékot és protamint tartalmazó savas vagy lúgos kémhatású oldatot készítünk, majd beállítjuk a pH-t semlegesre.

A kristályosítás ideje alatt az oldat körülményeknek stabilizáló hatást kell gyakorolniuk a kristályformákra. Így az oldat állapota meghatározó lesz a kristályosodás sebességére és kimenetelére. A kristályosodás valószínűleg egy olyan egyensúlyi állapoton keresztül megy végbe, amelyben nem-kristályos precipitált protein-származék-protamin komplexek, oldott protein-származék-protamin komplexek és kristályos protein-származék-protamin komplexek fordulnak elő. A körülmények helyes megválasztásával az egyensúly eltolható a kristályképződés irányába. A feltételezett egyensúly figyelembevételével a protein-származék oldhatósága vélhetően jelentős hatással van az átalakulás sebességére és a kristályok méretére, mivel a kisebb oldhatóság lassabb átalakulást fog eredményezni a precipitátum formából az oldaton át a kristályos formáig. Azon kívül jól ismert tény, hogy ha a kristályosítás sebessége lassabb, akkor rendszerint

nagyobb kristályok keletkeznek. A kristályosítás sebessége és a kristályméret ezért függ a protein-származékon lévő derivált rész méretétől és fajtájától.

Azok a kristályosítási paraméterek, amelyek a találmány szerinti kristályok méretét és a kristályosítás sebességét befolyásolják a következők: az acil-csoport mérete és jellege, a hőmérséklet, a protein-származéknál a cinkért kompetáló vegyületek - úgymint citrát, foszfát, és ehhez hasonlók – jelenlététől és koncentrációjától, a fenol-vegyületek fajtájától és koncentrációjától, a cink koncentrációjától, az elegyedő szerves oldószerek jelenlététől és koncentrációjától, a kristályosításra fordított időtől, a pH-tól és az ionerősségtől, a puffer típusától és koncentrációjától, a precipitálószer koncentrációjától, az oltókristálytól, a tartóedény anyagától és alakjától, a keverés sebességétől és a teljes protein koncentrációjától. A hőmérséklet és a kompetáló vegyület koncentrációja különösen fontos tényező.

A kompetáló vegyület, úgymint citrát, hatással van a kristály képződés sebességére, és közvetetten befolyásolja a kristályméretet és minőséget. Ezek a vegyületek a cinkkel alkotott komplexek képződésének koordinálására használhatóak oldatban, versenyeznek a cinkért a protein-származék hexamer felületén lévő viszonylag gyenge cinkkötő-helyekkel. Ezeknek a gyenge felületi kötődési pontoknak a tevékenysége valószínűleg hátráltatja a kristályosodást. Ezen kívül sok protein-származék részlegesen oldhatatlanná válik, amennyiben a cink mennyisége 1 mól protein-származékra számítva valamivel több, mint 0,333, ilyenkor a kompetáló vegyület jelenléte helyreállítja az oldhatóságot, és lehetőséget teremt a kristályosodásra. A kompetáló vegyület optimális koncentrációját minden egyes protein-származék esetében szükséges meghatározni. A felső limit természetesen az a koncentrációérték, amelynél a cink a kompetáló vegyülettel lecsapódik, vagy az

a koncentrációérték, amelynél a fennmaradó kompetáló vegyület már gyógyszerészetileg elfogadhatatlanná válik, azaz amikor fájdalmat vagy irritációt okoz az alkalmazás helyén.

Az alábbiakban egy példát mutatunk be, amely a találmány szerinti precipitátumok és kristályok előállítási eljárására vonatkozik. Protein-származék por lemért mennyiségét fenolos konzerválószeret tartalmazó vizes oldatban feloldunk. Ehhez az oldathoz cinkoldatot adunk egy oldható sója, pl. Zn(II)Cl_2 formájában, kb. 0,3 és kb. 0,7 vagy 1,0 mól/mól inzulin-származék közötti koncentráció eléréséhez szükséges mennyiségben. Abszolút etanol vagy más elegyíthető oldószer tetszőlegesen adható az oldathoz olyan mennyiségben, hogy az kb. 5% és kb. 10% (t%) közötti szerves oldószer-tartalmú legyen. Ezt követően az oldatot átszűrhetjük egy 22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn. Egy másik oldatot adott mennyiségű protamin vízben történő feloldásával készítünk úgy, hogy az oldat koncentrációja megfelel a fent említett protein-származék oldat koncentráció egytizedének. Ezt az oldatot átszűrjük egy 22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn. A inzulin-származék oldatot és a protamin oldatot egyenlő mennyiségben egyesítjük, majd a kapott oldatot szobahőmérsékleten (jellemzően kb. 20-25°-on) lassan keverjük, mire a protein-származék mikrokristályok kb. 12 óra és kb. 10 nap időintervallumon belül kialakulnak.

A mikrokristályok elválaszthatóak az anyalúgtól és egy másik oldószerbe tehetők tárolás és betegnek történő adagolás céljára. Például, megfelelő vizes oldószer a következők: injekció készítésére alkalmas víz, mely 25 mM Tris, 5 mg/ml fenol és 16 mg/ml glicerin tartalommal rendelkezik; 2 mg/ml kétbázisú nátrium-foszfát, 1,6 mg/ml m-krezol, 0,65 mg/ml fenol és 16 mg/ml glicerin tartalmú

injekció készítésére alkalmas víz; és 25 mM Tris, 5 mg/ml fenol, 0,1M trinátrium-citrát és 16 mg/ml glicerín tartalmú injekció készítésére alkalmas víz.

Egy előnyös megvalósítás szerint a kristályokat oly módon állítjuk elő, hogy nincs szükség a kristályok anyalúgtól való elkülönítésére. Ezért előnyös, ha az anyalúg önmaga alkalmas a betegeknek történő adagolásra vagy megfelelő hígítószerrel való hígítással, adagolásra alkalmassá tehető. A hígítószer elnevezés köztudottan egy vizes oldószert tartalmazó oldatot jelent, amelyben különféle gyógyszerészetileg elfogadható segédanyagok vannak feloldva, melyek magába foglalhatnak - korlátozás nélkül – egy puffert, izotonizálószer, cinket, konzerválószer, protamint, stb.

A találmány szerinti parenterális adagolásra alkalmas gyógyszerkészítmények a protein-származékon, kétvegyértékű kationon, komplexképző vegyületen és hexamer-stabilizáló vegyületen túl még tartalmazhatnak további segédanyagokat és vivőanyagokat, úgymint glicerín, szezámolaj, vizes propilénglikol, és ehhez hasonlóak. Alkalmazásuk esetén ezek a segédanyagok általában kb.0,5% és kb.2,0% közötti mennyiséget tesznek ki a végleges készítmény súlyára számítva. Az ilyen példaként említett gyógyszerkészítmények steril, izotóniás, inzulin-származékt tartalmazó vizes sóoldatok, melyek gyógyszerészetileg elfogadható pufferral pufferoltak és pirogénmentesek. További információk találhatóak a parenterális készítményekben alkalmazott szokásos segéd-, és hordozóanyagok különféle technológiai használatáról a Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. Kiadás, Marck Kiadóvállalat, Easton, PA, USA (1985) kiadványban, melyet a technika állásához tartozónak tekintünk.

A találmány szélesebb gyakorlati alkalmazhatóságához tartozik, hogy a készítmény tartalmazhatja a mikrokristályos forma és egy inzulin-származék, vagy normál inzulin vagy gyors hatású inzulin-analóg oldható frakciójának keverékét, mint pl. LysB28,Pro29-humán inzulin. Az ilyen keverékek lehetővé teszik az étkezési vércukorszint kontrollt az oldható inzulin révén, és biztosítják a vércukorszint alap ellenőrzését is, az oldhatatlan inzulin tartalmuknál fogva.

A következő készítmények és példák a találmány illusztrálására és részletesebb kifejtésére szolgálnak. A találmány körét ezek a készítmények és példák nem korlátozzák. A szilárd anyagokra vonatkozó „rész” ill. „részek” kifejezés súlyrészt jelent. A folyadékokra vonatkozó „részek” kifejezés térfogatrészt jelent. A koncentrációk megadásánál használt százalékok tömeg/térfogat (x100) értékeket jelölnek. Valamennyi hőmérséklet celsius fokban (C°) van megadva. A „Tris” 2-amino-2-hidroxi-metil-1,3-propándiolt jelent. Az 1000 rész per millió rész (ppm) cinkoldat 1,00 ml 10.000 ppm cink atom abszorpciós standard oldat (Ricca Chemical Company, salétromsavban oldott cink) vízzel, a végleges 10,00 ml-es térfogatra történő hígításával készült.

Az alábbiak során bemutatásra kerülő készítmények többségében a precipitátumok és a mikrokristályok hozamát kiszámítottuk. A hozamok kiszámításánál meghatároztuk az inzulin-származék vagy a inzulin-származék-analóg mennyiségét a precipitátumban illetve a mikrokristályban és a kiindulási oldatban. A protein-származék mennyiségének meghatározásához újra feloldott precipitátum illetve mikrokristály mintákat, továbbá az előbb említett precipitátum és mikrokristály felül úszóiból szintén mintákat készítettünk és fordított fázis grádiensű HPLC-n analizáltuk őket az alábbiak szerint.

Az analitikai vizsgálatot C8-as fordított fázisú oszlopon, 23 C°-on végeztük. Az átfolyási sebesség 1,0 ml/perc és az UV detektálást 214 nm-nél hajtottuk végre. Az A oldószer 0,1% (térfogat/térfogat) trifluorecetsav tartalmú 10:90 (térfogat:térfogat) arányú acetonitril:víz elegye. A B oldószer 0,1% (térfogat/térfogat) trifluorecetsav tartalmú 90:10 (térfogat:térfogat) arányú acetonitril:víz elegye. A futtatás rendje a következő volt: (perc; %B): (0,1; 0) (45,1; 75) (50,1; 100) (55; 100) (57; 0) (72; 0). Minden váltás lineáris volt. Más analitikai módszerek is alkalmazhatóak, melyekkel szakember ugyanezt a vizsgálatot el tudja végezni.

A HPLC analízis kivitelezéséhez jól elkevert szuszpenziók alikvotjait oldottunk fel vagy 0,01 N vagy 0,03 N sósavban. Ezeknek az oldatoknak a HPLC analízise a teljes protein-származék mennyiséget (mg/ml) szolgáltatta. A szuszpenziók alikvotjait kb. 5 percre centrifugáltuk egy Eppendorf 5415C típusú mikrocentrifugával 14.000 rpm-en (fordulatszám/perc). A leöntött felülúszót hígítottuk 0,01N vagy 0,1N sósavval és HPLC-vel analizáltuk. A precipitátumot Dulbecco foszfát (kálcium és magnézium nélküli) pufferoldatban történő reszuszpendálással mostuk és centrifugálással újra pelletáltuk. A puffert dekantáltuk és a szilárd anyagot visszaoldottuk 0,01N sósavba. A visszaoldott precipitátumot HPLC-vel analizáltuk. A HPLC vizsgálat a savasított szuszpenzióban, a visszaoldott precipitátumban és a felülúszóban jelenlévő lehetséges proteinek kimutatására és a protein koncentráció meghatározására szolgált. A kromatogramokon lévő csúcsokhoz tartozó retenciós időket összehasonlítottuk azokkal a retenciós időkkel, amelyeket a gyógyszerkészítmények előállításához használt protamin és inzulin vegyületek esetében kaptunk. A retenciós idők közötti megegyezés azt mutatta, hogy a protamin és a protein-származékok ténylegesen beépültek a kristályokba. A protein-származékok koncentrációját úgy határoztuk meg, hogy összehasonlítottuk a

megfelelő csúcs alatti területeket a standard területeivel. A protamin koncentrációkat nem mértük meg. A 0,22 mg/ml koncentrációjú inzulin-származék oldatot tekintettük a standardnak. Egy protamin tartalmú standardot is futtatunk, de csak a retenciók idői meghatározása céljából. Mint már említettük a protamin koncentrációk nem lettek meghatározva.

Az alábbiakban bemutatásra kerülő készítmények többségénél standard spektrofotometriás mérővizsgálatot végeztünk a célból, hogy megmérjük milyen gyorsan oldódnak a kristályok Dulbecco foszfát pufferoldatban (pH 7,4), szobahőmérsékleten. A fontosabb eltéréseket az itt közölt művelettől, a készítmények leírásánál - ahol szükséges - feltüntetjük. Valamennyi oldódási mérővizsgálat esetén ultraibolya tartományban való mérésre alkalmas spektrofotométert használtunk, melyet elláttunk egy 1 cm-es küvettával és egy mágneses küvetta keverővel. A kis méretű keverőt és 3,00 ml foszfát puffer sóoldatot (PBS) tartalmazó küvettát belehelyeztük a spektrofotométer cella rekeszébe. A műszert 320 nm-en használtuk és a fenti pufferrel nulláztuk le. 4 mikroliter alaposan szuszpendált készítményt – melynek teljes koncentrációja hozzávetőlegesen U50 egységű készítménynek felel meg – a küvettába tettük. Egy percnyi keverés után az optikai sűrűséget 320 nm-nél rögzítettük. Mivel azok a proteinek, amelyek vizsgálatunk tárgyát képezték, nem abszorbeálják a fényt 320 nm-nél, az optikai sűrűség csökkenése volt megfigyelhető a kristályok oldódásából adódó fény szóródás csökkenésének köszönhetően. Azt az időt, amelynél az optikai sűrűség az eredeti érték felére csökken, jellemző adatként feljegyeztük ($t_{1/2}$). Kontrollként 2,0 mikroliter U100 Humulin® N (azaz humán inzulin NPH, mely humán NPH inzulinként is ismert) készítményt hozzáadtunk 3 ml PBS pufferhez és az optikai sűrűséget a

fentiek szerint 320 nm-nél megmérjük. Az oldódási felezési idő Humulin® N készítmény esetében kb. 6 perc volt.

1.példa

Gly(A21),Arg(B31),Arg(B32)-humán-inzulin-analóg

Gly(A21),Arg(B31),Arg(B32)-humán-inzulint kaptunk E.coli fermentációval, amelyben egy Gly(A21)-humán proinzulin prekursor molekulát juttattunk a zárványtestekbe. A zárványtestek egy részletét (94,7 g) szolubilizáltuk 500 ml 6M guanidin-kloridot, 0,1M Tris-t, 0,27M nátrium-szulfátot és 0,1M nátrium-tetracionátot tartalmazó oldatban, pH 10,5-en szobahőmérsékleten. A pH-t gyorsan lecsökkentettük 8,8-ra 12N sósavval. Egy nyitott tartályban élénken kevertük 45 percig, miután a pH lecsökkentettük foszforsavval 2,1 -re a mintát egész éjjel 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót dekantáltuk és a következő műveletig 4°C-on tároltuk. A pelletet újra extraháltuk a fenti 10,5 pH értékű oldat további 200 milliliterével, majd ezt követően 3 órán keresztül 4°C-on centrifugáltuk. A mostani és a már korábban kapott felülúszót 4-szeresére hígítottuk 100 mM nátrium-foszfáttal 4-es pH-n, így lecsapódott a termék és egyéb savas komponensek. Miután hagytuk a csapadékot leülepedni, a felülúszó többségét leöntöttük és eldobtuk. A kapott szuszpenziót centrifugáltuk, a maradék felülúszót dekantáltuk és eldobtuk, és nyers Gly(A21)-humán proinzulin S-szulfonát prekursor tartalmú nedves pellet keletkezett. A pelletet szolubilizáltuk 1,5 liter 7M deionizált karbamid oldatban, a pH-t 5N NaOH-val 8-ra állítottuk és néhány órán át 4°C-on kevertük. Ezután sót (NaCl-t) adagoltunk a mintához 1M koncentráció eléréséig, majd ezután XAD-7 oszlopba töltöttük (14 cm x 20 cm, Toso-Naas, Montgomeryville, PA), melyet előzetesen 50% acetonitril/50% 50mM ammónium-bikarbonát, 10% acetonitril/90% 50 mM ammónium-bikarbonát és végül 7 M

deionizált karbamid/1M NaCl/20 mM Tris elegyekben átmostuk, (pH=8). A betöltéskor először az oszlopon átpumpáltunk 200 ml 7 M deionizált karbamid/1 M NaCl/ 20 mM Tris tartalmú 8-as pH-jú oldatot, majd 2,8 liter 50 mM ammónium-bikarbonát/1 M NaCl és 6,5 liter 50 mM ammónium-bikarbonát oldatot. Az oszlopot 50 mM ammónium-bikarbonátban lineáris koncentráció grádiensű acetonitrillel eluáltuk, mialatt az eluent UV fénynél 280 nm-en megfigyeltük. A kiválasztott frakciókat, melyek a részben tisztított Gly(A21)-humán proinzulin S-szulfonát prekuzort tartalmazták összegyűjtöttük, liofilizáltuk és egy, a következőkben leírt protein hajtogatási/diszulfid kötési műveletnek vetettük alá. A prekuzor 5,4 g-nyi mennyiségét feloldottuk 3 liter 20 mM gliceriben, pH 10,5 és 4C°. Ezután keverés mellett 15 ml 240 mM cisztein-kloridot adagoltunk, míg a pH-n (10,5) és a hőmérsékleten (4 C°) nem változtattunk. A reakcióoldatot finoman kevergettük 27 órán keresztül 4 C°-on, majd a pH-t foszforsavval 3,1-re lecsökkentve a folyamatot leállítottuk. Az oldathoz acetonitrilt (155 ml) adtunk, majd 5 x 25 cm C4 típusú ellenfázisú oszlopba töltöttük, de még ezt megelőzően 60% acetontiril/40% víz/0,1%TFA és 10%acetontiril/90%víz/0,1%TFA összetételű oldatokkal átöblítettük. A betöltésnél először az oszlopon átpumpáltunk 1 liter 17,5% acetontiril/82,5%víz/0,1%TFA oldatot és ezután eluáltuk 0,1% TFA-ban lineáris koncentráció grádiensű acetonitrillel, mialatt 280 nm-en megfigyeléseket végeztünk. A kiválasztott frakciókat egyesítettük és liofilizáltuk és 714 mg anyagot nyertünk. Azért, hogy a proinzulin prekuzort átalakítsuk a kívánt inzulin analóggá 697 mg Gly(A21) humán proinzulin prekuzort oldottunk 70 ml 50 mM ammónium-bikarbonátban, majd ezt követően lehűtöttük 4C°-ra, pH 8,3. Sósavban oldott 1 mg/ml sertés tripszin oldatból (Sigma Chemical Company, St. Luis, Mo) 0,14 ml-t adtunk a minta oldathoz, amelyet 4C°-on 24 órán át finoman kevertünk. További

0,14 ml tripszin oldatot adtunk a reakcióoldathoz, amelyet ezután még 21 óra és 45 percen keresztül kevertünk. A reakciót 0,7 ml jégecet és 0,3 ml foszforsav segítségével a pH-t 3,2-re csökkentve leállítottuk. A tripszines hasítással kapott Gly(A21)Arg(B31)Arg(B32)-humán inzulin-analóg minta oldatot hígítottuk 4 x 30% acetonitril/70% 50 mM ecetsav eleggyel 3,1-es pH értéken és egy 1 x 30 cm S HyperD F (Biosepra, Marlborough, MA) kation cserélő oszlopba töltöttük, melyet előzetesen átmostunk 30% acetonitril/70% 50 mM ecetsav/500 mM NaCl oldatot (pH 3,3) és 30% acetonitril/ 70% 50 mM ecetsav oldattal. A betöltéskor először az oszlopon átpumpáltunk kb. 50 ml 30% acetonitril/70% 50 mM ecetsav oldatot, majd eluáltuk 30% acetonitril/70% 50 mM ecetsav elegyben lineáris koncentráció grádiensű NaCl-al, mialatt az eluenst 276 nm-en megfigyeltük. A kiválasztott frakciókat, melyek Gly(A21)Arg(B21)Arg(B32)-humán inzulint tartalmaztak, egyesítettük és 3 x tisztított vízzel hígítottuk és egy 2,2 x 25 cm C4 ellenfázisú oszlopba töltöttük, melyen előzetesen 60% acetonitril/40% víz/0,1% TFA, majd 10% acetonitril/90% víz/0,1% TFA oldatokat pumpáltunk át. A kiválasztott frakciókat egyesítettük és liofilizáltuk, melynek eredményeképpen 101 mg terméket kaptunk. A kapott termék HPLC módszerrel meghatározott tisztasága több, mint 95%. A tisztított termék elektroszórásos tömeg spektroszkópiás analízise (ESMS) alapján a kapott molekulásúly 6062,9 (az elméleti érték:6063,0).

2.példa

Desz(B30)-humán inzulin előállítása

Desz(B30)-humán inzulint állítottunk elő humán proinzulinból tripsitikus hidrolízis útján. 2 g humán proinzulint bioszintetizáltunk rekombináns E. coli-ban és szokásos módon tisztítottuk [Frank, B.H. és Gross, E. (Eds.), Pierce Chemical Company,

Rockford, 729-738. Oldalak, 1981, és szintén Frank, B.H., 4,430,266 sz.USA-beli szabadalmi leírás (1984.02.07.), mely publikációkat referenciaként említünk] és feloldottuk 400 ml 0,1 M, pH 7,5 HEPES pufferben. 8 ml 1 M kalcium-klorid (vízben oldott) hozzáadása után a pH-t 7,5-re állítottuk be 5 N nátrium-hidroxiddal, majd 10 mg/ml 0,01 N sósavban oldott sertés tripszin oldatból (Sigma) 2 ml-t finom keverés mellett a minta oldatba juttattunk. A reakcióoldatot 2 óra 42 percig kevertük környezeti hőmérsékleten, mely időnél a környezet hőmérsékletét 37°C-ra melegítettük, időnkénti keverés mellett. Egy óra 45 perc elteltével 37°C-on a enzimatis reakciót leállítottuk oly módon, hogy a pH-t foszforsavval 3-ra csökkentettük, valamint a hőmérsékletet a tárolási 4°C-ra hűtöttük. Ezt követően az oldatot szobahőmérsékletre hoztuk és hígítottuk 50 ml acetonitrillel, majd az 500 ml-es végleges térfogat eléréséig tisztított vízzel töltöttük fel és 2,5 x 58 cm CG-161 (Toso-Haas) oszlopba töltöttük, melyen előzőleg 1 o.t. (oszlop térfogatnyi) 40% acetonitril/60% 0,1 M ammónium-szulfát oldatot (pH 2,5) és 2 o.t. 10% acetonitril/90% 0,1 M ammónium-szulfát oldatot áteresztettünk. A betöltéskor először az oszlopon átpumpáltunk 1 o.t. 10% acetonitril/90% 0,1 M ammónium-szulfát oldatot (pH 2,5). Az oszlopot 0,1 M ammónium-szulfátban lineáris koncentráció gradiensű acetonitrillel eluáltuk, 2,5-es pH értéken, mialatt az eluenst 276 nm-nél tanulmányoztuk. A részben tisztított desz(B30)-humán inzulint a kiválasztott frakciók egyesítésével összegyűjtöttük. Ezt a részben tisztított desz(B30)-humán inzulint tartalmazó egyesített mintát 1,28 liter tisztított vízzel hígítottuk pH 3,5 értéken és egy 1 x 29 cm S HyperD F (Biosepra, Marlborough, MA) kation cserélő oszlopba töltöttük, melyet előzetesen átmostunk 1 o.t. 30% acetonitril/70% 0,1% TFA/ 0,5 M NaCl oldattal (pH 1,9) és 2 o.t. 30% acetonitril/ 70% 0,1% TFA oldattal (pH 2,3). A betöltéskor az oszlopon először átpumpáltunk 1 o.t. 30% acetonitril/70% 0,1% TFA

oldatot (pH2,3), majd 30% acetonitril/70% 0,1% TFA oldatban lineáris koncentráció grádiensű NaCl-val eluáltuk (pH 1,9-2,3), mialatt az eluenst 276 nm-nél tanulmányoztuk. A tisztított desz (B30)-humán inzulint tartalmazó frakciókat egyesítettük, 2,5-szeresére hígítottuk tisztított vízzel és 35-o.t. C8 SepPak (Waters, Milford, MA), melyet előzetesen tisztítottunk és töltöttünk 2 o.t. acetonitrillel, 2 o.t. 60% acetonitril/40% 0,1% TFA és 2 o.t. 10% acetonitril/90% 0,1% TFA oldattal. Az eluenst liofolizáltuk és 500 mg terméket kaptunk. Az analitikai célból végzett HPLC mérővizsgálat szerint az anyag tisztasága több mint, 95%. A tisztított protein elektroszórásos tömeg spektroszkópos analízise alapján kapott molekulásúly 5706,5 (elméleti érték:5707).

3. példa

Nyúl inzulin előállítása

Nyúl inzulint állítottunk elő Chance R.E. és munkatársai által leírtak szerint [„Proinzulin, insulin, C-peptid” Baba S. és munkatársai (Eds.), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 99-105. Oldalak (1979)].

4. példa

Asp(B29)-humán inzulin analóg előállítása

Asp(B29)-humán inzulint állítottunk elő és tisztítottunk Chance R.E. és munkatársai által leírt 31. és 32. példák kitanítása szerint (5,700,662 sz.USA-beli szabadalmi leírás, /1997.12.23/), melyet a technika állásához tartózonak tekintünk. Desz(B23-30)-humán inzulint [Bromer, W.W. és Chance R.E., Biochim. Biophys. Acta, 133:219-223 (1967), melyet a technika állásához tartózonak tekintünk] és egy tisztított szintetikus oktapeptidet Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Asp-Lys(Tfa)-Thr

kondenzáltunk tripszin-asszisztált félszintézis felhasználásával, a tisztítást gél filtrációval és fordított fázisú HPLC-vel hajtottuk végre, 15% ammónium-hidroxiddal (v/v) négy órán keresztül környezeti hőmérsékleten végeztünk kezelést azért, hogy a trifluor-acetát (Tfa) gátló csoportot eltávolítsuk a Lys(B29)-ről, majd fordított fázisú HPLC-vel tisztítottunk és liofilizáltunk.

5. példa

Protein-származékok szintézisei

Az itt következő példa áttekintést nyújt a találmány szerinti precipitátumok és kristályok előállításához használható különböző protein-származékok szintéziseire vonatkozóan. A vázlat a többi eljárási adattal együtt a 2. táblázatban olvasható.

Tisztított inzulin vagy egy inzulin-analóg lemerített mennyiségét keverés mellett feloldottunk adott mennyiségű dimetil-szulfoxidban (DMSO). Ezt követően adott mennyiségű tetrametil-guanidin-kloridot (TMG) adtunk az oldathoz és alaposan elkevertük. Egy másik különálló tartályban megadott mennyiségű N-acil-szukcinimidet (NAS) oldottunk fel DMSO-ban. Az ismert térfogatú másodikat hozzáadtuk az első oldathoz. A reakciót szobahőmérsékleten hajtottuk végre és az eljárást megfigyelés alatt tartottuk a reakciókeverékből vett minták HPLC analízisével. A reakciót adott mennyiségű etanolamin hozzáadásával majd a pH savasra (2-3) állításával állítottuk le.

A reakciókeveréket ezután tisztítottuk fordított fázisú kromatográfiás módszerrel vagy e módszert kombinálva kation cserélő kromatográfiával, ez esetben a kation cserélő kromatográfia megelőzte a fordított fázisú kromatográfiát. A fordított fázisú tisztítást egy FPLC® műszerrel (Pharmacia), 214 nm-nél és 280 nm-nél végzett UV detektálás mellett hajtottuk végre, frakciógyűjtő, 2,2 x 25 cm vagy 5 x 30

cm C18 típusú oszlop felhasználásával 2,5 vagy 5 ml/perc átfolyási sebesség mellett szobahőmérsékleten. Az A oldat [0,1% trifluor-ecetsav (TFA) tartalmú 10: 90 arányú acetonitril:víz elegy (térfogat:térfogat)] és B oldat [0,1% trifluor-ecetsav (TFA) tartalmú 70: 30 arányú acetonitril: víz elegy (térfogat:térfogat)] keveréke alkotta a folyadék fázist, mely eluálta és elkülönítette a kívánt fajtákat. Az oszlopot kiegyenlítettük és feltöltöttük 100% A oldattal. Azután kis mennyiségű B oldat lineáris koncentráció gradiensét használtuk a reakciótermékek adekvát elkülönítésére. A reakcióterméket tartalmazó frakciókat egyesítettük. A tisztítási módszerek kidolgozása a szakterület ismeretanyagához tartozik.

Az alábbi 2. táblázatban kísérleti adatok szerepelnek, amelyek a találmány szerinti precipitátumok és kristályok előállításához használható különböző protein-származékok szintéziseire vonatkoznak. A kiindulási proteineket a fent leírtak szerint vagy szokásos eljárásokkal állítottuk elő. Szokásos tisztítási módszert alkalmaztunk, amely nagy tisztaságú kiindulási proteineket szolgáltatott a szintézisek számára. Az inzulin, inzulin-analógok és proinzulin előállítására használt szintézisek ismertek a szakirodalomban és megvalósíthatók rekombináns módszer, félszintézis vagy szilárd fázisú szintézis alkalmazásával egyaránt. A találmányban használható megfelelően tiszta származékok kinyerése céljából a szintetizált proteinek tisztítását szokásos tisztítási technikákkal végeztük el.

A tisztított származékok molekulasúlyát tömegspektroszkópiával – ESMS analízissel – határoztuk meg. Az acilezés helyének jelölésére vagy kromatográfiás analízist („HPLC”) vagy N-terminális analízist („N-terminal”) vagy mindkettőt alkalmaztuk.

2. táblázat

Különböző protein-származékok szintézisének összefoglalása

Kiindulási protein	Humán inzulin	Humán inzulin	Humán inzulin
Protein tömeg (mg)	141,3	1.080	120
DMSO (ml)	42	30	36
TMG (μl)	30,5	233	25,9
NAS acil-lánc	n-hexanoil	n-oktanoil	n-dodekanoil
NAS tömeg (mg)	7,76	85,7	9,22
DMSO térfogat (ml)	1,0	1,0	0,7,1
Hozzáadott NAS oldat térfogata (ml)	0,494	0,785	0,701
Reakcióidő (perc)	40	105	40
Etanolamin térfogat (μl)	20	100	120
Teljes kitermelés (%)	40	33	36
Mólsúly (elméleti)	5906,0	5933,9	5990,0
Mólsúly (ESMS)	5906,8	5933,9	5990,0
HPLC tisztaság (%)	<u>96</u>	<u>94</u>	98
Acilezés helye (HPLC)	Ná	Ná	Ná
Acilezés helye (N-terminal)	Ná	Ná	Ná

Kiindulási protein	Humán inzulin	Humán inzulin	Humán inzulin
Protein tömeg (mg)	194	2040	2050
DMSO (ml)	60	62	58
TMG (μl)	41,9	441	443
NAS acil-lánc	n-tetra-dekanoil	n-butiril	n-hexanoil
NAS tömeg (mg)	23,4	269,3	209
DMSO térfogat (ml)	1,0	1,0	2,0
Hozzáadott NAS oldat térfogata (ml)	0,756	0,29	1,44
Reakcióidő (perc)	20	30	30
Etanolamin térfogat (μl)	5	100	100
Teljes kitermelés (%)	45	27*	22
Mólsúly (elméleti)	6018,1	5877,8	5905,9
Mólsúly (ESMS)	6018,2	5877,8	5906,0
HPLC tisztaság (%)	98	94	93
Acilezés helye (HPLC)	Nâ	Nâ	Nâ
Acilezés helye (N-terminal)	Nâ	-	-

* a tisztítás először egy fordított fázisú HPLC, majd egy kation cserélő HPLC, és

ismét egy fordított fázisú HPLC alkalmazásával történt.

A következőkben további protein-származékok szintetikus előállítását ismertetjük. A szintézisek vázlatát egyéb reakció adatokkal együtt, melyek a szintézis teljes menetének bemutatására szolgálnak, a 3. táblázatban olvashatóak. Ismert tömegű tisztított inzulint vagy egy inzulin-analógot ismert térfogatú 50 mM bórsavban pH 2,57-en feloldunk. Acetonitrilit a bórsav oldattal megegyező mennyiségben lassan hozzáadagolunk, keverés mellett. Az „oldószer” térfogatán a bórsav és az acetonitril együttes össztérfogatát értjük. Az oldat pH-ját 10,2 és 10,5 közé állítjuk be nátrium-hidroxiddal. Egy különálló tartályban lemért tömegű N-acil-szukcinimidet („NAS”) oldunk fel ismert térfogatú DMSO-ban. Az ismert térfogatú második oldatot hozzáadtuk az első oldathoz. A reakciót szobahőmérsékleten, a pH értéket kb. 10,2-en tartva, hajtottuk végre és az eljárást megfigyeltük a reakciókeverékből vett minták HPLC analízisével. A reakciót a pH savasra (2-3) állításával állítottuk le. A reakciókeveréket a fenti fordított fázisú kromatográfiás módszer segítségével tisztítottuk.

Az alábbi 3. táblázatban kísérleti adatok szerepelnek, amelyek a találmány szerinti precipitátumok és kristályok előállításához használható különböző protein-származékok szintéziseire vonatkoznak. A tisztított származékok molekulásúlyát tömegspektroszkópiával – ESMS analízissel – határoztuk meg. Az acilezés helyének jelölésére vagy kromatográfiás analízist („HPLC”) vagy N-terminális analízist („N-terminal”) vagy mindkettőt alkalmaztuk.

3. táblázat

Különböző protein-származékok szintézisének összefoglalása

Kiindulási protein	Humán inzulin	Humán inzulin	Humán inzlin
Protein tömeg (mg)	2.170	2.420	2.250
Oldószer (ml)	200	240	200
NAS acil-lánc	n-butiril	n-pentanoil	n-oktanoil
N-acil-szukcinimid tömeg (mg)	108,7	1155	173
DMSO térfogat (ml)	1,0	5	1,0
Hozzáadott NAS oldat térfogata (ml)	0,955	0,719	0,81
Reakcióidő (perc)	40	40	40
Teljes kitermelés (%)	25	12	37
Mólsúly (elméleti)	5877,8	5891,8	5933,9
Mólsúly (ESMS)	5877,7	5891,9	5933,8
HPLC tisztaság (%)	96	95	96
Acilezés helye (HPLC)	Nâ	Nâ	Nâ

Kiindulási protein	Humán inzulin	Humán inzulin	Humán inzlin
Protein tömeg (mg)	1.960	2.750	1.040
Oldószer (ml)	200	200	200
NAS acil-lánc	n-nonanoil	n-dodekanoil	n-tetra-dekanoil
N-acil-szukcinimid tömeg (mg)	145,8	19,9	102,3

DMSO térfogat (ml)	1,0	1,0	1,0
Hozzáadott NAS oldat térfogata (ml)	0,887	0,771	0,885
Reakcióidő (perc)	40	30	35
Teljes kitermelés (%)	35	14	39
Mólsúly (elméleti)	5947,9	5990,0	6018,1
Mólsúly (ESMS)	5948,1	5989,9	6018,1
HPLC tisztaság (%)	94	93	94
Acilezés helye (HPLC)	Ná	Ná	Ná

Kiindulási protein	Birka inzulin	Marha inzulin	Sertés inzulin
Protein tömeg (mg)	312	275	200
Oldószer (ml)	100	100	100
NAS acil-lánc	n-hexanoil	n-hexanoil	n-oktanoil
N-acil-szukcinimid tömeg (mg)	27,2	19,9	16,4
DMSO térfogat (ml)	1,0	1,0	1,0
Hozzáadott NAS oldat térfogata (ml)	0,644	0,771	0,764
Reakcióidő (perc)	45	30	82
Teljes kitermelés (%)	31	50	41

Mólsúly (elméleti)	5801,7	5831,8	5903,9
Mólsúly (ESMS)	5801,8	5831,7	5903,9
HPLC tisztaság (%)	96	96	96
Acilezés helye (HPLC)	Ná	Ná	Ná

Kiindulási protein	Nyúl inzulin	Desz(B30)-humán inzulin	AspB28-humán inzulin
Protein tömeg (mg)	211,4	205,3	132,3
Oldószer (ml)	100	20	20
NAS acil-lánc	n-oktanoil	n-oktanoil	n-oktanoil
N-acil-szukcinimid tömeg (mg)	16,8	21,5	11,5
DMSO térfogat (ml)	1,0	0,5	1,0
Hozzáadott NAS oldat térfogata (ml)	0,786	0,303	0,715
Reakcióidő (perc)	57	40	85
Teljes kitermelés (%)	39	47	32
Mólsúly (elméleti)	5919,9	5833,6	5951,9
Mólsúly (ESMS)	5920,0	5832,7	5952,2
HPLC tisztaság (%)	95	96	94
Acilezés helye (HPLC)	Ná	Ná	Ná

Kiindulási protein	GlyA21,ArgB31,Arg B32-humán inzulin- analóg	Humán inzulin	Desz(B27)-humán inzulin-analóg
Protein tömeg (mg)	36,2	134,8	44,8
Oldószer (ml)	10	20	7
NAS acil-lánc	n-oktanoil	2-metil-hexanoil	n-oktanoil
N-acil-szukcinimid tömeg (mg)	22,4	749	3,6
DMSO térfogat (ml)	0,5	4,93*	1,0
Hozzáadott NAS oldat térfogata (ml)	0,115	0,052	0,993
Reakcióidő (perc)	40	45	40
Teljes kitermelés (%)	45	45	53
Mólsúly (elméleti)	6189,2	5919,9	5832,8
Mólsúly (ESMS)	6189,2	5919,9	5832,9
HPLC tisztaság (%)	97	96	93
Acilezés helye (HPLC)	Nâ	Nâ	Nâ

* DMSO helyett acetonitrilben oldva.

Kiindulási protein	Humán inzulin	Humán inzulin	Humán inzulin
--------------------	---------------	---------------	---------------

Protein tömeg (mg)	160	147,7	2.080
Oldószer (ml)	20	20	200
NAS acil-lánc	4-metil-oktanoil	3-metil-dekanoil	n-oktanoil
N-acil-szukcinimid tömeg (mg)	715	22,5	146,7
DMSO térfogat (ml)	4,97*	1,0*	1,0*
Hozzáadott NAS oldat térfogata (ml)	0,0734	0,609	0,884
Reakcióidő (perc)	60	45	40
Teljes kitermelés (%)	54	38	5,3**
Mólsúly (elméleti)	5947,9	5976,0	6060,1
Mólsúly (MS)***	5947,8	5976,2	6060,5
HPLC tisztaság (%)	96	96	92
Acilezés helye	Ná	Ná	A1-Ná, Ná

* DMSO helyett acetonitrilben oldva.

** Az A1-Ná,B29-Ná-diacil-humán inzulin-származék kitermelése.

*** ESMS helyett mátrix-asszisztált lézer deszorpció ionizáció (MALDI)

tömegspektroszkópiával meghatározva.

Kiindulási protein	Desz(B30)-humán inzulin-analóg	Humán inzulin	Humán inzulin
Protein tömeg (mg)	205,3	1.960	2.110

Oldószer (ml)	20	200	200
NAS acil-lánc	n-oktanoil	n-nonanoil	n-dekanoil
N-acil-szukcinimid tömeg (mg)	21,5	145,8	150,5
DMSO térfogat (ml)	1,0	1,0	1,0
Hozzáadott NAS oldat térfogata (ml)	0,089	0,0887	0,975
Reakcióidő (perc)	40	40	60
Teljes kitermelés (%)	11,0	11,5	11,1
Mólsúly (elméleti)	5959,5	6088,2	6116,2
Mólsúly (ESMS)	5959,3	6088,3	6116,4
HPLC tisztaság (%)	96	92	92
Acilezés helye (HPLC)	A1-Ná, Ná	A1-Ná, Ná	A1-Ná, Ná

* DMSO helyett acetonitrilben oldva.

** Az A1-Ná,B29-Ná-diacil-humán inzulin-származék kitermelése.

6. példa

B29-Ná-oktanoil-LysB29 humán inzulin tartalmú mikrokristályok

B29-Ná-oktanoil-LysB29 humán inzulin száraz port (7 tömegrész) feloldunk 1000 térfogatrész vizes oldószerben, mely 25 mM Trist, 0,1 M trinátrium-citrátot és 10 mg/ml fenolt tartalmaz (pH 7,6). Ehhez az oldathoz 150 rész 15,3 mM cink-klorid oldatot adunk. A pH-t 1 N sósavval és/vagy 1 N nátrium-hidroxiddal 7,6 értékre

állítjuk be. Ezután 120 térfogatrész etanolt adagolunk. Az oldatot 0,22 mikronos, kis proteineket megkötő szűrőn átszűrjük. Egy második oldatot készítünk oly módon, hogy 6 tömegrész protamin-szulfátot 10.000 térfogatrész vízben oldunk, majd ezt egy 0,22 mikronos, kis proteineket megkötő szűrőn átszűrjük. Az acilezett inzulin oldat és a protamin-szulfátot tartalmazó oldat megegyező térfogatnyi mennyiségét összekeverjük. Amorf precipitátum keletkezik. Ezt a szuszpenziót szobahőmérsékleten (jellemzően 22°C-on) 24 órán keresztül lassan kevergetjük. Az amorf precipitátum mikrokristályos szilárd anyaggá alakul át.

7. példa

B29-Ná-oktanoil-LysB29 humán inzulin mikrokristályokat tartalmazó gyógyszerkészítmény

A 6. Példa szerint előállított mikrokristályokat elkülönítjük az anyalúgtól és szokásos szilárd fázis/folyadék fázis szeparációs eljárásokkal, úgymint szűrés, centrifugálás vagy dekantálás, a mikrokristályokat kinyerjük. A kapott mikrokristályokat ezután 25 mM Trist, 5 mg/ml fenolt és 16 mg/ml glicerint tartalmazó oldatban szuszpendáljuk (pH 7,4), az így keletkezett acilezett inzulin termék végleges koncentrációja 100 U/ml inzulin oldatával azonos.

8. példa

B29-Ná-hexanoil-LysB29 humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-hexanoil-LysB29 humán inzulin száraz port (7 tömegrész) feloldunk 1000 térfogatrész vizes oldószerben, mely 25 mM Trist, 0,1 M trinátrium-citrátot, 10 mg/ml fenolt és 16 mg/ml glicerint tartalmaz (pH 7,6). Ehhez az oldathoz 120 térfogatrész 15,3 mM cink-klorid oldatot adunk. A pH-t 1 N sósavval és/vagy 1 N

nátrium-hidroxiddal 7,6 értékre állítjuk be. Ezután 120 térfogatrész etanolt adagolunk. Az oldatot 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrjük. Egy második oldatot készítünk oly módon, hogy 6 tömegrész protamin-szulfátot 10.000 térfogatrész vízben oldunk, majd ezt egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrjük. Az acilezett inzulin oldat és a protamin-szulfátot tartalmazó oldat megegyező térfogatnyi mennyiségét összekeverjük. Amorf precipitátum keletkezik. Ezt a szuszpenziót szobahőmérsékleten (jellemzően 22°C-on) 24 órán keresztül lassan kevergetjük. Az amorf precipitátum mikrokristályos szilárd anyaggá alakul át.

9. példa

B29-Ná-hexanoil-LysB29 humán inzulin mikrokristályokat tartalmazó gyógyszerkészítmény

A 8. Példa szerint előállított B29-Ná-hexanoil-LysB29 humán inzulin mikrokristályokat elkülönítjük az anyalúgtól és szokásos szilárd fázis/folyadék fázis szeparációs eljárásokkal kinyerjük. A kapott mikrokristályokat ezután 2 mg/ml dibázisos nátrium-foszfátot, 1,6 mg/ml m-krezolt, 0,65 mg/ml fenolt és 16 mg/ml glicerint (pH 6,8) tartalmazó oldatban szuszpendáljuk, az így keletkezett acilezett inzulin termék végleges koncentrációja 100 U/ml inzulin oldatával azonos.

10. példa

B28-Ná-oktanolil-LysB28,ProB29-humán inzulin mikrokristályok

B28-Ná-oktanolil-LysB28,ProB29-humán inzulin száraz port (7 tömegrész) feloldunk 1000 térfogatrész vizes oldószerben, mely 25 mM Trist, 0,1 M trinátrium-citrátot és 10 mg/ml fenolt tartalmaz (pH 7,6). Ehhez az oldathoz 150 rész 15,3 mM cink-klorid oldatot adunk. A pH-t 1 N sósavval és/vagy 1 N nátrium-hidroxiddal 7,6

értékűre állítjuk be. Ezután 120 térfogatrész etanolt adagolunk. Az oldatot 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrjük. Egy második oldatot készítünk oly módon, hogy 6 tömegrész protamin-szulfátot 10.000 térfogatrész vízben oldunk, majd ezt egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrjük. Az acilezett inzulin oldat és a protamin-szulfátot tartalmazó oldat megegyező térfogatnyi mennyiségét összekeverjük. Amorf precipitátum keletkezik. Ezt a szuszpenziót szobahőmérsékleten (jellemzően 22°C-on) 24 órán keresztül lassan kevergetjük. Az amorf precipitátum mikrokristályos szilárd anyaggá alakul át.

11. példa

B28-Na-oktanolil-LysB28,ProB29-humán inzulin mikrokristályokat tartalmazó

készítmény

A 10. Példa szerint előállított mikrokristályokat elkülönítjük az anyalúgtól és szokásos szilárd fázis/folyadék fázis szeparációs eljárásokkal kinyerjük. A kapott mikrokristályokat ezután 25 mM Trist, 5 mg/ml fenolt, 0,1 M trinátrium.citrátot és 16 mg/ml glicerint tartalmazó oldatban szuszpendáljuk (pH 7,6), az így keletkezett acilezett inzulin termék végleges koncentrációja 100 U/ml inzulin oldatával azonos.

12. példa

B28-Na-butiril-LysB28,ProB29-humán inzulin mikrokristályok

B29-Na-butiril-LysB28 humán inzulin száraz port (7 tömegrész) feloldunk 1000 térfogatrész vizes oldószerben, mely 25 mM Trist, 0,1 M trinátrium-citrátot és 10 mg/ml fenolt tartalmaz (pH 7,6). Ehhez az oldathoz 150 rész 15,3 mM cink-klorid oldatot adunk. A pH-t 1 N sósavval és/vagy 1 N nátrium-hidroxiddal 7,6 értékűre állítjuk be. Ezután 120 térfogatrész etanolt adagolunk. Az oldatot 0,22 mikronos, kis

proteineket megkötő szűrőn átszűrjük. Egy második oldatot készítünk oly módon, hogy 6 tömegrész protamin-szulfátot 10.000 térfogatrész vízben oldunk, majd ezt egy 0,22 mikronos, kis proteineket megkötő szűrőn átszűrjük. Az acilezett inzulin oldat és a protamin-szulfátot tartalmazó oldat megegyező térfogatnyi mennyiségét összekeverjük. Amorf precipitátum keletkezik. Ezt a szuszpenziót szobahőmérsékleten (jellemzően 22°C-on) 24 órán keresztül lassan kevergetjük. Az amorf precipitátum mikrokristályos szilárd anyaggá alakul át.

13. példa

B28-Na-butiril-LysB28,ProB29-humán inzulin mikrokristályokat tartalmazó gyógyszerkészítmények

A 13. példa szerint előállított mikrokristályokat elkülönítjük az anyalúgtól és szokásos szilárd fázis/folyadék fázis szeparációs eljárásokkal kinyerjük. A kapott mikrokristályokat ezután 22 mM Tris, 2,5 mg/ml m-krezolt, 0,65 mg/ml fenolt és 16 mg/ml glicerint (pH 7,8) tartalmazó oldatban szuszpendáljuk, az így keletkezett acilezett inzulin termék végleges koncentrációja megközelítőleg 100 U/ml inzulin oldatával azonos.

14. példa

B29-Na-butiril-humán inzulin mikrokristályok

B29-Na-butiril-humán inzulint az 5. Példában leírtak szerint állítottunk elő. B29-Na-butiril-humán inzulin mintát (16,21 mg) feloldottunk 0,8 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után 0,32 ml cink-klorid oldatot – mely 1000 ppm Zn (II) tartalmú – adagoltunk, majd az így kapott oldatot alaposan elkevertük. Ezután 3,2 ml kristályosító oldatot adtunk és a kapott keveréket a teljes homogenitás eléréséig

kevertük. A kristályosító oldatot oly módon készítettük, hogy vízben feloldottunk keverés közben 0,603 g Tris-t, 1,007 g fenolt, 1,582 g glicerint és 2,947 g trinátrium-citrátot. Az így keletkezett oldatot ezután vízzel 100 ml-re egészítettük ki. A cink-inzulin-származék oldatot a kristályosító oldattal elkevertük, majd az oldat pH-ját 7,59-re állítottuk be 1 N sósav és 1 N nátrium-hidroxid szükség szerinti kis részleteivel. A pufferolt oldatot 0,22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn leszűrtük. A leszűrt oldathoz azonos térfogatú vizes protamin oldatot adtunk, melyet úgy állítottunk elő, hogy 18,59 mg protamin-szulfátot 50 ml végleges térfogat eléréséhez szükséges mennyiségű víz vízben oldottunk. A két oldatot a teljes homogenitás eléréséig óvatosan összekevertük, majd 25°C-on állni hagytuk. Pálcika-szerű kristályok keletkeztek, a kitermelés nagyobb, mint 90%. A korábban már ismertetett spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat szerint a B29-Ná-butiril-humán inzulin mikrokristályok oldódási felezési ideje ($t_{1/2}$) 32-33 perc közötti volt szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

15. példa

B29-Ná-pentanoil-humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-pentanoil-humán inzulint az 5. példában leírtak szerint állítottunk elő. A B29-Ná-pentanoil-humán inzulin mintát (16,14 mg) 0,8 ml 0,1 N sósavban feloldottunk. A továbbiakban 14. példában leírt eljárást követtük, kivéve azt, hogy a pH-t 7,6-ra állítottuk be és az 50 ml végleges térfogatú vizes protamin-szulfát oldatban a protamin-szulfát tartalom 18,64 mg volt. 80%-nál nagyobb hozammal pálcika-szerű mikrokristályok keletkeztek. A korábban már ismertetett spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat szerint a B29-Ná-pentanoil-humán inzulin

mikrokristályok oldódási felezési ideje ($t_{1/2}$) 33-34 perc közötti volt szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

16. példa

B29-Ná-hexanoil-humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-hexanoil-humán inzulint az 5. példában leírtak szerint állítottunk elő. B29-Ná-hexanoil-humán inzulin mintát (15,87 mg) 0,1 N sósavban feloldottunk. A továbbiakban 14. példában leírt eljárást követtük, kivéve azt, hogy a pH-t 7,58-ra állítottuk be. 90%-nál nagyobb hozammal pálcika-szerű mikrokristályok keletkeztek. A korábban már ismertetett spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat szerint a B29-Ná-hexanoil-humán inzulin mikrokristályok oldódási felezési ideje ($t_{1/2}$) 69-70 perc közötti volt szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

17. példa

B29-Ná-(2-metil-hexanoil)-humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-(2-metil-hexanoil)-humán inzulint az 5. példában leírtak szerint állítottunk elő. B29-Ná-(2-metil-hexanoil)-humán inzulint (8,19 mg) feloldottunk 0,400 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után 0,160 ml cink-nitrát oldatot – mely 1000 ppm Zn(II)-t tartalmazott – adagoltunk, majd a kapott oldatot alaposan elkevertük. Ezt követően 1,60 ml olyan oldatot adtunk az előző oldathoz, amelynek 100 ml-ében 0,604 g Tris, 1,003 g fenol, 3,218 g glicerin és 3,069 g trinátrium-citrát volt megtalálható. A keletkezett oldat pH-ját 7,61-re állítottuk be kis mennyiségű 1,0 N sósavval és 1,0 N nátrium-hidroxiddal és a pufferolt oldatot 0,22 mikronos kis

proteint megkötő szűrőn átszűrtük, majd a leszűrt oldathoz 2 ml protamin-szulfát oldatot adtunk (37,41 mg protamin/100 ml oldat). Az elegyet óvatosan kevergettük és precipitátum képződött. A keveréket 25°C-on állni hagytuk. Pálcika-szerű kristályok keletkeztek 65%-nál nagyobb kitermeléssel. A korábban már ismertetett spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat szerint a B29-Ná-2-metil-hexanoil-humán inzulin mikrokristályok oldódási felezési ideje ($t_{1/2}$) 23 perc volt szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

18. példa

B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-oktanoil-LysB29 humán inzulint (4,17 mg) feloldottunk 1 ml 25 mM Tris-t, 0,1 M trinátrium-citrátot és 10 mg fenolt tartalmazó oldatban (pH 7,6). Ehhez az oldathoz 0,15 ml 15,3 mM cink-klorid oldatot adtunk. A kapott oldat pH-ját 1 N nátrium-hidroxiddal 7,6-ra állítottuk be. Ehhez az oldathoz 0,12 ml etanolt adtunk. A keletkezett oldatot 0,22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn átszűrtük. Egy második oldatot készítettünk oly módon, hogy 3,23 mg protamin-szulfátot 10 ml vízben feloldottunk és 0,22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn átszűrtük. 1 ml B29-Ná-oktanoil-LysB29 humán inzulin oldatot és 1 ml protamin-szulfát oldatot egyesítettünk, melynek következtében az oldatban amorf precipitátumot képződött. Ezt az oldatot két 1 ml-es részre osztottuk, melyeket fiolába töltöttünk, majd 19 órán keresztül szobahőmérsékleten (kb. 22°C) egy csukló-mozgású rázókészülék segítségével rázattuk. E procedúra után fehér- kevésbé fehér színű mikrokristályos szilárd anyag keletkezett. A kristályokat - melyeket eltávolítottunk az anyalúgtól és alaposan átmostunk - HPLC analízisnek vetettük alá, azért hogy kimutassuk a protamin jelenlétét a kristályos anyagban.

19. példa

Ná-oktanoil-humán inzulint tartalmazó kristályos szuszpenziós készítmény

Ná-oktanoil-humán inzulint tartalmazó savas oldatot állítottunk elő 39,7 mg Ná-oktanoil-humán inzulin 1 ml 0,1 N sósavban történő oldásával. Az oldatot kb. 5 percig kevertük. Ehhez az oldathoz 0,4 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot adtunk keverés mellett. A cink-nitrát oldat a 10.000 ppm Zn(II) atom abszorpciós standardoldat 1.10 arányú hígításával lett előállítva. Ná-oktanoil-humán inzulin + cink oldathoz 4 ml kristályosító oldatot adunk (40 mg/ml glicerín, 50 mM Tris, 4 mg/ml m-krezol, 1,625 mg/ml fenol, 100 mM trinátrium-citrát, pH 7,4). A kapott oldat pH-ját 7,61-re állítjuk be. A pufferolt oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrjük. 5 ml protamin oldatot (37,6 mg protamin-szulfát oldva 50 ml vízben) hozzáadtunk 5ml leszűrt Ná-oktanoil-humán inzulin oldathoz. Az oldatot 63 órán keresztül 25°C-on állni hagyjuk.

A 63 óra után elvégzett mikroszkópos vizsgálat azt mutatta, hogy a kristályosodás megtörtént és a készítményt egyforma, önálló, pálcika-szerű kristályokként nyertük ki, mely kristályok átlagos hossza hozzávetőlegesen kb.10 mikron.

A kristályokat leülepítettük oly módon, hogy a készítményt zavartalanul állni hagyjuk. Ezután 8 milliliter felülúszót eltávolítottunk és 8 ml oldattal (16 mg/ml glicerín, 20 mM Tris, 1,6 mg/ml m-krezol, 0,65 mg/ml fenol, 40 mM trinátrium-citrát, pH 7,4) helyettesítettük. A kristályokat reszuszpendáltuk. Ezt a műveletet ugyanígy háromszor megismételtük, kivéve a harmadik alkalommal, amikor is a 8 ml felülúszót 7 ml oldattal helyettesítettük.

A készítmény inzulin tartalmát HPLC vizsgálattal analizáltuk azért hogy meghatározhassuk a teljes hatásosságot. A teljes hatásosság a humán inzulin és az N α -oktanoil-humán inzulin totális koncentrációjára vonatkozik. Teljesen egészében reszuszpéndált készítmény kis részletét (0,050 ml) feloldottunk 0,950 ml 0,01 N sósavban és HPLC analízisnek vetettük alá az alábbi módon. A HPLC analízishez a következő körülményeket alkalmaztuk: egy C8 fordított fázisú oszlop, konstans 23°C, 1,0 ml/perc, detektálás 214 nm-nél, A oldószer=10% acetonitril (v/v) tartalmú 0,1% vizes trifluor-ecetsav, B oldószer=90% acetonitril (v/v) tartalmú 0,1% vizes trifluor-ecetsav, lineáris koncentráció grádiens (0,1 perc 0%B, 45,1 perc 75%B, 50,1 perc 100%B, 55 perc 100%B, 57 perc 0%B, 72 perc 0%B). A standardot inzulin és acilezett inzulin 0,01 N sósavban történő feloldásával készítettük. Mindegyik standard koncentrációját UV spektroszkópiásan meghatároztuk. 1 cm-es küvettában lévő 1,000 mg/ml humán inzulin oldat 1,05 optikai sűrűségi egységre vonatkozó abszorbanciával rendelkezik a maximális hullámhossznál (kb. 276 nm). Ez 6098-as moláris elnyelési együtthatónak (mol. ext. koeff.) felel meg. Az acilezett inzulin esetében elfogadtuk, hogy ugyan olyan moláris elnyelési állandóval rendelkezik, mint a humán inzulin. Az oldatokat UV alapján kalibráltuk, majd hígítottuk hogy 0,220, 0,147, 0,073 és 0,022 mg/ml standardokat kapjunk. A standardokat HPLC-n futtattuk és egy mérőoldat koncentrációjára vonatkozó standard görbét kaptunk.

Az N α -oktanoil-humán inzulin hatásossága a kristályos készítményben 3,76 mg/ml volt. Az oldható N α -oktanoil-humán inzulin koncentrációját 0,01 mg/ml-nek határoztuk meg. Nem acilezett humán inzulint nem találtunk a HPLC analízis szerint.

A kristályok oldódásának mértékét megmértük oly módon, hogy 0,005 ml egységesen szuszpendált készítményt 3 ml Dulbecco foszfát puffer sóoldatba (kálcium és magnézium nélküli) tettünk egy 1cm-es szögletes kvarc küvettában 22°C

hőmérsékleten. Ezt az oldatot állandó sebességgel kevertük egy mágneses küvetta keverővel. Abszorbancia méréseket végeztünk egy perces időközönként. Az vizes szuszpenzióban jelenlévő részecskék 320 nm-nél kapott abszorbancia értékei a szórt fénnel megegyezők. Következésképpen ahogy a mikrokristályok oldódnak az abszorbancia a nullához közelít. Az a hozzávetőleges idő, amely 0,005 ml készítmény oldódásához szükséges több, mint 400 perc. Ugyanilyen körülmények között 0,005 ml U100 szokványos Humulin® N készítmény feloldódásához kb. 10 perc szükséges.

Részecskeméret meghatározást végeztünk egy készítmény mintán részecske mérő műszer segítségével (Multisizer Model IIE, Coulter Corp., Miami, FL 33116-9015). 0,25 ml kristályos készítményt adtunk 100 ml 14 mM dibázisos nátrium-foszfát, 16mM glicerin, 1,6 mg/ml m-krezol és 0,65 mg/ml fenol tartalmú (pH 7,4) oldathoz. A mérőműszer rekesznyílás mérete 50 mikronos volt. A részecskeméret adatokat 50 másodpercenként gyűjtöttük. A kristályok fő részecske átmérője kb. 6 mikron volt, megközelítőleg normál eloszlás mellett, a részecskeméret kb.2 és kb.12 mikron között mozgta. Ez az érték hasonló a szokványos NPH készítmény részecske méret eloszlásához, melyet DeFelippis M.R. és munkatársai a J. Pharmaceut. Sci. 87: 170-176 (1998) szakfolyóiratban ismertettek.

20. példa

B29-Na-nonanoil-humán inzulin mikrokristályok

B29-Na-nonanoil-humán inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B29-Na-nonanoil-humán inzulint (16,16 mg) feloldottunk 0,8 ml, 0,1 N sósavban. Az eljárást a 14. példában leírtak szerint folytattuk, kivéve azt, hogy a protamin oldat az 50 ml végtérfogatban 18,64 mg protamin-szulfátot tartalmazott. Pálcika-szerű

kristályok keletkeztek, több mint 80%-os kitermeléssel. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B29-Ná-nonanoil-humán inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje 82 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

21. példa

B29-Ná-dekanoil-humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-dekanoil-humán inzulin mikrokristályt állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. A B29-Ná-dekanoil-humán inzulin mikrokristályt (60,7 mg) feloldottuk 1,5 ml 0,1 N sósavban. 0,6 ml -1000 ppm Zn(II)-t tartalmú - cink-nitrát oldatot hozzáadtunk és alaposan elkevertük. A kapott oldat 0,7 ml-éhez az „A fiolában” 2,0 ml „A” oldatot (50 mM citrát, 5 mg/ml fenol, 16 mg/ml glicerol, 25 mM Tris, pH 7,6) adtunk. A cink-protein oldat egy másik 0,7 ml-es részletéhez 2,0 ml „B oldatot” (100 mM citrát, 2 mg/ml fenol, 50 mM Tris, pH 7,6) adtunk. A pH-t a fiolákban egyenként beállítottuk 7,62-re és 7,61-re, majd mindkettőt átszűrtük egy 0,22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn. Az A fiola tartalmából 2,5 ml-t elkevertünk 2,5 ml protamin-szulfát oldattal (7,4 mg protamin-szulfát oldva 10 ml A oldatban). Az összeöntést követően azonnal egy zavaros csapadék fejlődött. A készítményt zavartalanul állni hagytuk 25°C-on. Az előzőekhez hasonlóképpen, a B fiola tartalmából is 2,5 ml-t elkevertünk 2,5 ml protamin-szulfát oldattal (37,8 mg protamin-szulfát oldva 50 ml vízben). Az összeöntést követően azonnal egy zavaros csapadék fejlődött. A készítményt zavartalanul állni hagytuk 25°C-on. Hatvan óra elteltével mindkét fiola tartalmát mikroszkóposan megvizsgáltuk és mindkét esetben kis méretű kristályok keletkezését figyelhetjük meg. A B fiolában lévő kristályoknál tisztán kivehető volt a pálcika-szerű morfológia. A B fiolában lévő kristályok hozamát HPLC vizsgálattal

80%-nak találtuk. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B fiolában lévő B29-Ná-dekanoil-humán inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje 70 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

22. példa

B29-Ná-dodekanoil-humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-dodekanoil-humán inzulin mikrokristályt állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. A B29-Ná-dodekanoil-humán inzulin mikrokristályt (17,00 mg) feloldottuk 4,0ml vizes oldatban, mely milliliterenként 10 mg fenolt, 32 mg glicerint, 30 mg trinátrium-citrát dihidrátot és 6,1 mg Tris-t tartalmaz (pH 8,47). Az inzulin-analóg oldat pH-ját kis mennyiségű 1 N nátrium-hidroxiddal 8,57-re állítottuk be. A pufferolt oldathoz 0,320 ml 1000 ppm Zn(II)-t tartalmazó cink-nitrát oldatot adtunk. A cink-inzuli-analóg oldat pH-ját kis mennyiségű 1 N sósavval és 1 N nátrium-hidroxiddal 7,59-re állítottuk be. A pufferolt oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn átszűrtük. Az „A fiolában” a kapott oldat 2 milliliteréhez hozzáadtunk 0,25 ml etanolt. Az elegyet finoman elkevertük. A kapott oldat egy másik 2 ml-es részletéhez a „B fiolában” 0,6 ml etanolt adtunk. Az elegyet finoman elkevertük. Mind az A mind a B fiola tartalmához 2 ml protamin-szulfát oldatot (milliliterenként 0,376 mg protamin vízben feloldva) öntöttünk. A protamin oldat hozzáadását követően azonnal zavaros szuszpenzió képződött mindkét fiolában. A fiolák tartalmát finom kevergetéssel alaposan elkevertük, majd 25°C-on állni hagytuk. Több, mint 90% kitermeléssel kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B29-Ná-dodekanoil-humán

inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje több, mint 300 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

23. példa

B29-Ná-tetradekanoil-humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-tetradekanoil-humán inzulin mikrokristályt állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. A B29-Ná-tetradekanoil-humán inzulin mikrokristályt (16,42 mg) feloldottuk 0,5 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,32 ml 1000 ppm Zn(II)-t tartalmazó cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. Ezután 3,2 ml vizes oldatot, mely milliliterenként 10 mg fenolt, 32 mg glicerint, 30 mg trinátrium-citrát dihidrátot és 6,1 mg Tris-t tartalmaz (pH 7,58) adagoltunk és a kapott keveréket a teljes elegyededésig kavargattuk. A keletkezett oldat pH-ját először 7,9-re, majd ismét 7,59-re állítottuk be annyi 1 N sósavval és 1 N nátrium-hidroxiddal, amennyi szükséges. A pufferolt oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn átszűrtük. A kapott oldat 1,97 ml-es részletéhez az „A fiolában” 0,246 ml etanolt adtunk és ezt óvatosan elkevertük. A kapott oldat másik 1,97 ml-es részletéhez a „B fiolában” 0,591 ml etanolt öntöttünk, aminek következtében a fiolában opálosság keletkezett. Az elegyet óvatosan elkevertük. Mind az A mind a B fiola tartalmához 1,97 ml protamin-szulfát oldatot (milliliterenként 0,376 mg protamin vízben feloldva) adtunk. A protamin oldat hozzáadását követően mindegyik fiolában zavaros szuszpenzió alakult ki. A teljes homogenitás eléréséig a fiolák tartalmát óvatosan kavargattuk, majd 25°C-on állni hagytuk. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek 90%-nál nagyobb kitermelés mellett. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B29-Ná-tetradekanoil-humán

inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje több, mint 300 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

24. példa

B29-Ná-hexadekanoil-humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-hexadekanoil-humán inzulin mikrokristályt állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. A B29-Ná-hexadekanoil-humán inzulin mikrokristályt (16,29 mg) feloldottuk 0,5 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,32 ml 1000 ppm Zn(II)-t tartalmazó cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. Ezután 3,2 ml vizes oldatot, mely milliliterenként 10 mg fenolt, 32 mg glicerint, 30 mg trinátrium-citrát dihidrátot és 6,1 mg Tris-t tartalmaz (pH 7,58) adagoltunk és a kapott keveréket a teljes elegyedésig kavargattuk. A keletkezett oldat pH-ját először 8,0-ra, majd 7,61-re állítottuk be annyi 1 N sósavval és 1 N nátrium-hidroxiddal, amennyi szükséges. A pufferolt oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn átszűrtük. A kapott oldat 2,0 ml-es részletéhez az „A fiolában” 0,25 ml etanolt adtunk és ezt óvatosan elkevertük. A kapott oldat másik 2,0 ml-es részletéhez a „B fiolában” 0,6 ml etanolt öntöttünk, aminek következtében a fiolában opálosság keletkezett. Az elegyet óvatosan elkevertük. Mind az A mind a B fiola tartalmához 2,0 ml protamin-szulfát oldatot (milliliterenként 0,376 mg protamin vízben feloldva) adtunk. A protamin oldat hozzáadását követően mindegyik fiolában zavaros szuszpenzió alakult ki. A teljes homogenitás eléréséig a fiolák tartalmát óvatosan kavargattuk, majd 25°C-on állni hagytuk. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek 90%-nál nagyobb kitermelés mellett. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,160 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük.

25. példa

A1-Ná- A1-Ná-oktanoil-B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok

A1-Ná-oktanoil-B29-Ná-oktanoil-humán inzulin-analógot feloldottunk 1,60 ml oldatban, amely 0,604 g Tris-t, 1,003 g fenolt, 3,218 g glicerint és 3,069 g trinátrium-citrátot tartalmaz 100 milliliterenként. Az oldat pH-ját 1 N sósav és 1 N nátrium-hidroxid kis mennyiségével 7,61-re állítottuk be. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,16 ml 1000 ppm Zn(II)-t tartalmazó cink-nitrát oldatot és ismét alaposan elkevertük. A pH-t újra beállítottuk 7,61-re, majd az oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn átszűrtük. A leszűrt oldat 2,0 milliliteres részletéhez 2,0 ml protamin-szulfát oldatot (37,41 mg protamin/100ml oldat) öntöttünk. Az elegyet finoman kavargattuk. Csapadék képződött. A keveréket 25°C-on zavartalanul állni hagytuk. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek.

26. példa

A1-Ná-oktanoil-B29-Ná-oktanoil-deszB30-humán inzulin mikrokristályok

Lényegében a 25. példa szerinti eljárást követtük, azzal a különbséggel hogy 8,08 mg A1-Ná- A1-Ná-oktanoil-B29-Ná-oktanoil-deszB30-humán inzulint használtunk fel. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek.

27. példa

A1-Ná-nonanoil-B29-Ná-nonanoil-deszB30-humán inzulin mikrokristályok

Lényegében a 25. példa szerinti eljárást követtük, azzal a különbséggel hogy 8,07 mg A1-Ná-nonanoil-B29-Ná-nonanoil-deszB30-humán inzulint használtunk fel. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek.

28. példa**A1-Ná-dekanoil-B29-Ná-dekanoil-deszB30-humán inzulin mikrokristályok**

Lényegében a 25. példa szerinti eljárást követtük, azzal a különbséggel hogy 8,22 mg A1-Ná-dekanoil-B29-Ná-dekanoil-deszB30-humán inzulint használtunk fel. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek.

29. példa**B29-Ná-oktanoil-Gly(A21),Arg(B31),Arg(B32)-humán inzulin-analóg
mikrokristályok**

B29-Ná-oktanoil-Gly(A21),Arg(B31),Arg(B32)-humán inzulin-analógot az 5. példában leírtak szerint állítottunk elő. B29-Ná-oktanoil-Gly(A21),Arg(B31),Arg(B32)-humán inzulin-analógot feloldottunk (8,6 mg) 0,4 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,160 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. Ezután 1,60 ml oldatot adagoltunk, amely 100 milliliterében 0,604 g Tris-t, 1,003 g fenolt, 3,218 g glicerint és 3,069 g trinátrium-citrátot tartalmazott, és a kapott oldatot elkevertük. A keletkezett oldat pH-ját 7,59-re állítottuk be kis mennyiségű 1 N sósavval és 1 N nátrium-hidroxiddal. A puffert oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn átszűrtük. A leszűrt oldat 2 milliliteréhez 2 ml protamin-szulfát oldatot (37,41 mg protamin/100 ml) öntöttünk. Az elegyet óvatosan kavargattuk. Csapadék képződött. Ezután a keveréket 25°C-on zavartalanul állni hagytuk. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek.

30. példa**B29-Ná-oktanoil-desz(Thr30)-humán inzulin mikrokristályok**

B29-Ná-oktanoil-desz(Thr30)-humán inzulint az 5. példában leírtak szerint állítottunk elő. B29-Ná-oktanoil-desz(Thr30)-humán inzulint (16,21 mg) feloldottunk

0,5 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,32 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. Ezután 3,2 ml vizes oldatot, mely milliliterenként 10 mg fenolt, 32 mg glicerint, 30 mg trinátrium-citrátot és 6,1 mg Tris-t tartalmazott (pH 7,58) adagoltunk, majd a kapott elegyet alaposan elkevertük. A homogenizálás után keletkezett oldat pH-ját először 8,45-re állítottuk be kis mennyiségű 1N nátrium-hidroxiddal. Ettől az oldat még nem tisztult ki teljesen. A pH-t ezután 7,61-re állítottuk be szükség szerinti kis mennyiségű 1 N sósavval. A pufferolt oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteint megkötő szűrőn átszűrtük. A leszűrt oldathoz vele azonos térfogatú vizes protamin oldatot (0,376 mg protamin/100 ml) öntöttünk. Ezt követően zavaros szuszpenzió képződött. A szuszpenziót finoman kavargattuk, majd 25°C-on állni hagytuk. Pálcika-szerű kristályok keletkeztek, melyek hozama 80%-nál nagyobb volt. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B29-Ná-oktanoil-desz (Thr30)-humán inzulin kristályok t_{1/2} ideje 94 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

31. példa

B29-Ná-oktanoil-desz(B30)-humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-oktanoil-desz(Thr30)-humán inzulint az 5. példában leírtak szerint állítottunk elő. B29-Ná-oktanoil-desz(Thr30)-humán inzulint (8,09 mg) feloldottunk 0,400 ml 0,1N sósavban. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,16 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,16 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. Ezt követően 1,60 ml oldatot adagoltunk, amely 100 ml-enként 0,604 g Tris-t, 1,003 g fenolt, 3,218 g glicerint és 3,069 g trinátrium-citrátot tartalmazott, és

keverést végeztünk. A keletkezett oldat pH-ját kis mennyiségű 1,0 N sósavval és 1,0 N nátrium-hidroxiddal 7,61-re állítottuk be, majd egy 0,22 mikronos, kis proteineket megkötő szűrőn átszűrtük. A leszűrt oldat 2 milliliteres részletéhez 2 ml protamin oldatot (37,41 mg protamin/100 ml) öntöttünk. Az elegyet finoman kavargattuk. Csapadék képződött. A keveréket 25°C-on állni hagytuk.

32. példa

B29-Ná-hexanoil-marha inzulin mikrokristályok

B29-Ná-hexanoil-marha inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B29-Ná-hexanoil-marha inzulint feloldottunk 0,8 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,32 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. Ezt követően 3,2 ml vizes kristályosító oldatot adagoltunk, mely milliliterenként 10 mg fenolt, 16 mg glicerint, 30 mg trinátrium-citrát-dihidrátot és 6,0 mg Tris-t tartalmazott nem-pufferolt vizes oldatban, és a kapott oldatot a teljes homogenitás eléréséig kevertük. A keverés utáni oldat pH-ját kis mennyiségű 1 N sósavval és 1 N nátrium-hidroxiddal 7,58-ra állítjuk be. A pufferolt oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteineket megkötő szűrőn átszűrtük. A leszűrt oldathoz vele megegyező térfogatú vizes protamin oldatot (milliliterenként 0,375 mg protamint tartalmazó nem pufferolt vizes oldat) öntöttünk. A keveréket a teljes elegyedésig eléréséig finoman kavargattuk. Zavaros szuszpenzió képződött, amelyet további keverésnek vetettünk alá, majd 25°C-on állni hagytuk. Pálcika-szerű kristályok keletkeztek, melyek hozama 90%-nál nagyobb volt. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B29-Ná-hexanoil-marha inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje több, mint 300 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

33. példa

B29-Ná-hexanoil-birka inzulin mikrokristályok

B29-Ná-hexanoil-birka inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B29-Ná-hexanoil-nyúl inzulint (16,15 mg) feloldottunk 0,8 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,32 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. A keletkezett oldat opálos volt és további 0,1 ml 0,1 N sósav hozzáadása sem eredményezett tökéletes diszpergálódást. Az eljárást a 32. példában leírtaknak megfelelően folytattuk tovább, azzal a különbséggel, hogy a pH-t 7,58 helyett 7,61-re állítottuk be. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek, melyek hozama több, mint 80% volt. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B29-Ná-hexanoil-birka inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje 184 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

34. példa

B29-Ná-oktanoil-sertés inzulin mikrokristályok

B29-Ná-oktanoil-sertés-inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B29-Ná-oktanoil-sertés-inzulint (16,78 mg) feloldottunk 0,5 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,32 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. Ezt követően 3,2 ml vizes oldatot, mely milliliterenként 10 mg fenolt, 32 mg glicerint, 30 mg trinátrium-citrátot és 6,1 mg Tris-t (8,5) tartalmazott, adagoltunk és a kapott oldatot teljesen elhomogenizáltuk. A keverés utáni oldat pH-ját először 8,4-re állítottuk szükség szerinti mennyiségű 1N nátrium-hidroxiddal, majd kis mennyiségű 1 N sósavval 7,6-ra. Ezután az eljárást 32.

példában leírtaknak megfelelően folytattuk tovább. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek, 80%-nál nagyobb kitermeléssel. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B29-Ná-oktanoil-sertés inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje több, mint 300 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

35. példa

B29-Ná-oktanoil-nyúl inzulin mikrokristályok

B29-Ná-oktanoil-nyúl inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B29-Ná-oktanoil-nyúl inzulint (8,10 mg) feloldottunk 0,25 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,16 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. Ezt követően 1,6 ml vizes oldatot, mely milliliterenként 10 mg fenolt, 32 mg glicerint, 30 mg trinátrium-citrátot és 6,1 mg Tris-t (pH 8,5) tartalmazott, adagoltunk és a kapott oldatot teljesen elhomogenizáltuk. A keverés utáni oldat pH-ját először 8,34-re állítottuk szükség szerinti mennyiségű 1N nátrium-hidroxiddal, majd kis mennyiségű 1 N sósavval 7,57-ra. Ezután az eljárást 32. példában leírtaknak megfelelően folytattuk tovább. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek, 80%-nál nagyobb kitermeléssel. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B29-Ná-oktanoil-nyúl inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje 119 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

36. példa

B29-Ná-oktanoil-desz(B27)-humán inzulin-analóg mikrokristályok

B29-Ná-oktanoil-desz(B27)-humán inzulin-analógot állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B29-Ná-oktanoil-desz(B27)-humán inzulin-analógot (8,02 mg) feloldottunk 0,400 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,16 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. Ezt követően 1,6 ml vizes oldatot, mely 100 milliliterében 0,604 g Tris-t, 1,003 g fenolt, 3,218 g glicerint és 3,069 g trinátrium-citrátot tartalmazott, adagoltunk és a kapott oldatot teljesen elhomogenizáltuk. A keverés utáni oldat pH-ját 7,61-re állítottuk szükség szerinti mennyiségű 1N sósavval és 1N nátrium-hidroxiddal, majd egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrjük. A leszűrt oldat 2 ml-es részletéhez 2 ml protamin oldatot (37,41 mg protamin/100 ml) öntöttünk. Az elegyet finoman kavargattuk. Csapadék képződött. A keveréket 25°C-on állni hagytuk. Hat nap után jól-formált, önálló, pálcika-szerű kristályok keletkeztek.

37. példa

B29-Ná-oktanoil-Asp(B28)-humán inzulin-analóg mikrokristályok

B29-Ná-oktanoil-Asp(B28)-humán inzulin-analógot (8,16 mg) feloldottunk 1,60 ml vizes oldatban, mely 100 milliliterében 0,604 g Tris-t, 1,003 g fenolt, 3,218 g glicerint és 3,069 g trinátrium-citrátot tartalmazott. Az oldat pH-ját 7,61-re állítottuk szükség szerinti mennyiségű 1N sósavval és 1N nátrium-hidroxiddal. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,16 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. A pH-t ismét beállítottuk 7,62-re, majd a pufferolt oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrtük. A leszűrt oldat 2 ml-es részletéhez 2 ml protamin oldatot (37,41 mg protamin/100 ml) öntöttünk. Az elegyet finoman kavargattuk. Csapadék képződött. A keveréket 25°C-on állni hagytuk. Kicsi. Szabálytalan kristályok keletkeztek, melyek hozama több volt 80%-

nál. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B29-Ná-oktanoil-Asp(B28)-humán inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje 15 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

38. példa

B28-Ná-butiril-LysB28,ProB29-humán inzulin mikrokristályok

B28-Ná-butiril-LysB28,ProB29-humán inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B28-Ná-butiril-LysB28,ProB29-humán inzulint (16,09 mg) feloldottunk 0,8 ml 0,1 N sósavban. 5-10 perces keverés után hozzáadtunk 0,16 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot és alaposan elkevertük. Ezután 3,2 ml kristályosító oldatot adagoltunk és a kapott keveréket teljesen elhomogenizáltuk. (A kristályosító oldatot úgy állítottuk elő, hogy vízben feloldottunk keverés mellett 0,603 g Tris-t, 1,007 g fenolt, 1,582 g glicerint és 2,947 g trinátrium-citrátot. Ezután az oldat térfogatát a végleges térfogat elérése érdekében vízzel 100 ml-re egészítettük ki.) Azután, hogy a cink-inzuli-származék oldatot elkevertük a kristályosító oldattal, A keletkezett oldat pH-ját kis mennyiségű 1 N sósavval és 1 N nátrium-hidroxiddal 7,60-ra állítottuk be. A pufferolt oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn leszűrtük. A leszűrt oldathoz vele azonos térfogatú vizes protamin oldatot öntöttünk, melyet úgy állítottunk elő, hogy 18,64 mg protamin-szulfátot 50 ml-es végtérfogat eléréséhez szükséges mennyiségű vízben feloldottunk. A két oldatot tartalmazó keveréket finoman kavargattuk, majd 25°C-on állni hagytuk.

39. példa

B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin mikrokristályok

B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulint (15,59 mg) feloldottunk 0,8 ml 0,1 N sósavban. Ezután a 38. példában leírt eljárásnak megfelelően jártunk el. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek, melyek hozama 80%-nál nagyobb volt. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje 5-6 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

40. példa

B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin mikrokristályok

B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulint (16,8 mg) feloldottunk 4 ml vizes oldatban, mely milliliterenként 10 mg fenolt, 32 mg glicerint, 30 mg trinátrium-citrát dihidrátot és 6,1 mg Tris-t tartalmazott (pH 7,58). A kapott oldat pH-ját kis mennyiségű 1 N nátrium-hidroxiddal 8,4-re állítottuk be. A pufferolt oldathoz hozzáadtunk 0,320 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot. A cink-inzulin-analóg-származék oldat pH-ját kis mennyiségű 1N sósavval és 1 N nátrium-hidroxiddal 7,61-re állítottuk be. A pufferolt oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteinekét megkötő szűrőn átszűrtük. A leszűrt oldat 2 ml-éhez az „A fiolában” 0,25 ml etanolt juttattunk. A leszűrt oldat egy másik 2ml-es részletéhez a „B fiolában” 0,6 ml etanolt adtunk. Az elegyet finoman elkevertük és az oldat opállossá vált. Mind az A, mind a B fiola tartalmához 2,0 ml protamin oldatot (milliliterenként 0,376 mg protamin vízben oldva) öntöttünk. Ezt követően mindkét fiolában zavaros szuszpenzió jelent meg. Mindkét fiola tartalmát finom kavargatással teljesen elhomogenizáltuk, majd 25°-on

állni hagytuk. A fiolákban kristályok képződtek. Az A ampullában lévő oldatot a benne maradt inzulin-analóg koncentráció meghatározása céljából analizáltuk, a kristályokon pedig oldódási tesztet végeztünk.

41. példa

B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin mikrokristályok

B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulint (16,02 mg) feloldottunk 0,8 ml 0,1 N sósavban. A továbbiakban a 38. példa eljárásának megfelelően jártunk el. Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek, melyek hozama 80%-nál nagyobb volt. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B28-Ná-oktanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje 7-8 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

42. példa

B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin mikrokristályok

B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B28-Ná-hexanoil-LysB28,ProB29-humán inzulint (16,35 mg) feloldottunk 4 ml vizes oldatban, mely milliliterenként 10 mg fenolt, 32 mg glicerint, 30 mg trinátrium-citrát dihidrátot és 6,1 mg Tris-t tartalmazott (pH 7,58). A kapott oldat pH-ját kis mennyiségű 1 N nátrium-hidroxiddal 8,4-re állítottuk be. A pufferolt oldathoz hozzáadtunk 0,320 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot. A cink-inzulin-analóg-származék oldat pH-ját kis mennyiségű 1N sósavval és 1 N nátrium-hidroxiddal 7,62-re állítottuk be. A pufferolt oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteineket

megkötő szűrőn átszűrtük. A leszűrt oldat 2 ml-éhez az „A fiolában” 0,25 ml etanolt juttattunk. Az elegyet finoman elkevertük és az oldat opállossá vált. A leszűrt oldat egy másik 2ml-es részletéhez a „B fiolában” 0,6 ml etanolt adtunk. Finoman elkevertük és az oldat opállossá vált. Mind az A, mind a B fiola tartalmához 2,0 ml protamin oldatot (milliliterenként 0,376 mg protamin vízben oldva) öntöttünk. Ezt követően mindkét fiolában zavaros szuszpenzió jelent meg. Mindkét fiola tartalmát finom kavargatással teljesen elhomogenizáltuk, majd 25°-on állni hagytuk. A fiolákban kristályok képződtek. Az A ampullában lévő oldatot a benne maradt inzulin-analóg koncentráció meghatározása céljából analizáltuk, a kristályokon pedig oldódási tesztet végeztünk. . Kicsi, szabálytalan kristályok keletkeztek, melyek hozama 80%-nál nagyobb volt. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B28-Na-oktanoil-LysB28,ProB29-humán inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje 15 perc volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

43. példa

B29-Na-oktanoil-humán inzulint tartalmazó amorf szuszpenzió

B29-Na-oktanoil-humán inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B29-Na-oktanoil-humán inzulint (16,95 mg protein tartalmú 20,31 mg szilárd anyag) feloldottunk 0,1N sósavban. Ezt követően hozzáadtunk 200 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot, majd 2,0 ml oldatot, mely milliliterenként 1,625 mg fenolt, 4 mg m-krezolt, 40 mg glicerint, 5 mg vízmentes kétbázisú nátrium-foszfátot és 7,5 mg trinátrium-citrát-dihidrátot (pH7,6) tartalmazott. A kapott oldat pH-ját 0,090 ml 1 N nátrium-hidroxiddal 7,58-ra állítottuk be. Az oldatot átszűrtük egy 0,22 mikronos kis proteinek megkötő szűrőn, majd egész éjjel hűtöttük. Ekkor az inzulin-származék

koncentrációja 6,074 mg/ml volt. Következő reggel az oldatban nem volt megfigyelhető csapadék. 2,50 ml oldatot elkevertünk 2,875 ml protamin-szulfát oldattal - mely milliliterenként 0,75 mg szilárd protamin-szulfátot tartalmazott vízben oldva - és azonnal egy amorf precipitátum képződött. A protamin hozzáadása után a B29-Ná-oktanoil-humán inzulin koncentráció 2,825 mg/ml-re változott. Az inzulin-származék és a protamin oldatok összekeverését követő kb. 1 óra 40 perc elteltével a szuszpenziót két kutyának beinjekcióztuk.

44. példa

B28-Ná-mirisztoil-LysB28,ProB2-humán inzulin-analógot tartalmazó amorf szuszpenzió

B28-Ná-mirisztoil-LysB28,ProB2-humán inzulin-analógot állítottunk elő lényegében az 5. példában leírtak szerint. B28-Ná-mirisztoil-LysB28,ProB2-humán inzulin-analógot (18,53 mg proteint tartalmazó 20,43 mg szilárd anyag) feloldottunk 0,5 ml 0,1 N sósavban. Ezt követően hozzáadtunk 200 ml 1000 ppm Zn(II)-tartalmú cink-nitrát oldatot, majd 2,0 ml oldatot, mely milliliterenként 1,6 mg fenolt, 4 mg m-krezolt, 40 mg glicerint, 5 mg vízmentes kétbázisú nátrium-foszfátot és 7,5 mg trinátrium-citrát-dihidrátot (pH7,6) tartalmazott. A készítmény pH-ját 5,9-ről 8,7-re állítottuk be 100 mikroliter 1 N nátrium-hidroxiddal. Az oldat tiszta volt. Ezután az oldat pH-ját 20 mikroliter 1 N sósavval 7,59-re állítottuk. Ekkor 6,57 mg/ml protein koncentrációt mértünk. Az oldatot átszűrtük egy 0,22 mikronos kis proteinek megkötő szűrőn, majd egész éjjel hűtöttük. Következő reggel az oldatban nem volt megfigyelhető csapadék. 2,50 ml oldatot elkevertünk 2,875 ml protamin-szulfát oldattal - mely milliliterenként 0,75 mg szilárd protamin-szulfátot tartalmazott vízben oldva - és azonnal egy amorf precipitátum képződött. A protamin hozzáadása után a B28-Ná-mirisztoil-LysB28,ProB29-humán inzulin koncentráció 3,056 mg/ml-re

csökkent. A protamin hozzáadást követően azonnal HPLC analízist végeztünk. Az ismert retenció idő csúcsokat alapul véve, a HPLC analízis azt mutatta, hogy az oldhatatlan anyag protamint és B28-Ná-mirisztoil-LysB28,ProB29-humán inzulin tartalmaz. A B28-Ná-mirisztoil-LysB28,ProB29-humán inzulin koncentrációját a felülúszóban 0,005 mg/ml-nek találtuk és egy, az eredeti térfogatban visszaoldott precipitátum mintában 3,13 mg/ml-es koncentrációt mértünk. A B28-Ná-mirisztoil-LysB28,ProB29-humán inzulin koncentrációja egy savas szuszpenziót tartalmazó mintában 3,34 mg/ml volt.

45. példa

B29-Ná-oktanoil humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-oktanoil humán inzulin száraz port (7 tömegrész) feloldottunk 175 térfogatrész 0,1 N sósavban, majd cink-klorid oldatot (60 térfogatrész) adtunk hozzá, melyet úgy állítottunk elő, hogy cink-oxidot sósavban oldottunk és 15,3 mM cink-koncentrációjú oldatot kaptunk. A kapott oldathoz 800 térfogatrész 25 mM Tris-t, 10 mg/ml fenolt, 0,1 M citrátot és 40 mg/ml glicerint tartalmazó vizes oldatot (pH 7,6) adagoltunk. Az így keletkezett oldat pH-ját 7,6-ra állítottuk be és egy 0,22 mikronos, kis proteineket megkötő szűrőn átszűrtük.

Egy másik oldatot is készítettünk 7 tömegrész protamin-szulfát 10.000 térfogatrész vízben történő oldásával. A protamin oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteineket megkötő szűrőn átszűrtük. A acilezett inzulin oldathoz a protamin oldatot vele azonos térfogatnyi mennyiségben hozzáöntöttük. Amorf csapadék képződött. A szuszpenziót 25°C-on 48 órán keresztül zavartalanul állni hagytuk. A kapott készítményben lévő mikrokristályok nyújtottabb és egyenletesebb hatást biztosítanak, mint az azonos dózisban adott NPH humán inzulin.

46. példa**B29-Ná-oktanoil humán inzulin mikrokristályok**

A 45. példa eljárását követve jártunk el. A szuszpenziót 30C°-on 48 órán keresztül zavartalanul állni hagytuk. Az előző példában leírtakhoz hasonló eredményeket kaptunk.

47. példa**B29-Ná-oktanoil humán inzulin mikrokristályok**

B29-Ná-oktanoil humán inzulin száraz port (7 tömegrész) feloldottunk 175 térfogatrész 0,1 N sósavban, majd cink-klorid oldatot (60 térfogatrész) adtunk hozzá, melyet úgy állítottunk elő, hogy cink-oxidot sósavban oldottunk és 15,3 mM cink-koncentrációjú oldatot kaptunk. A kapott oldathoz 1000 tömegrész 35 mM kétbázisú nátrium-foszfátot, 4 mg/ml m-krezolt, 1,6 mg/ml fenolt, 25 mM citrátot és 40 mg/ml glicerint tartalmazó vizes oldatot (pH 7,6) adagoltunk. Az így keletkezett oldat pH-ját 7,6-ra állítottuk be és egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrtük.

Egy másik oldatot is készítettünk 6 tömegrész protamin-szulfát 10.000 térfogatrész vízben történő oldásával. A protamin oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrtük. A acilezett inzulin oldathoz a protamin oldatot vele azonos térfogatnyi mennyiségben hozzáöntöttük. Amorf csapadék képződött. A szuszpenziót 25°C-on egy hétig zavartalanul állni hagytuk. A kapott készítményben lévő mikrokristályok nyújtottabb és egyenletesebb hatást biztosítanak, mint az azonos dózisban adott NPH humán inzulin.

48. példa

B29-Ná-oktanoil humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-oktanoil humán inzulin száraz port (7 tömegrész) feloldottunk 175 térfogatrész 0,1 N sósavban, majd cink-klorid oldatot (60 térfogatrész) adtunk hozzá, melyet úgy állítottunk elő, hogy cink-oxidot sósavban oldottunk és 15,3 mM cink-koncentrációjú oldatot kaptunk. A kapott oldathoz 1000 tömegrész 35 mM kétbázisú nátrium-foszfátot, 4 mg/ml m-krezolt, 1,6 mg/ml fenolt, 25 mM citrátot és 40 mg/ml glicerint tartalmazó vizes oldatot (pH 7,6) adagoltunk. Az így keletkezett oldat pH-ját 7,6-ra állítottuk be és egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrtük.

Egy másik oldatot is készítettünk 6 tömegrész protamin-szulfát 10.000 térfogatrész vízben történő oldásával. A protamin oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrtük. A acilezett inzulin oldathoz a protamin oldatot vele azonos térfogatnyi mennyiségben hozzáöntöttük. Amorf csapadék képződött. A szuszpenziót 25°C-on egy hétig zavartalanul állni hagytuk. A kapott készítményben lévő mikrokristályok nyújtottabb és egyenletesebb hatást biztosítanak, mint az azonos dózisban adott NPH humán inzulin.

49. példa**B29-Ná-oktanoil humán inzulin mikrokristályok**

A 47. példa eljárását követve jártunk el. A szuszpenziót 30°C-on 60 órán keresztül zavartalanul állni hagytuk. A kapott készítményben lévő mikrokristályok nyújtottabb és egyenletesebb hatást biztosítanak, mint az azonos dózisban adott NPH humán inzulin.

50. példa**B29-Ná-oktanoil humán inzulin mikrokristályok**

Oldatot készítettünk oly módon, hogy fenolt (0,65 tömegrész), m-krezolt (1,6 tömegrész), és glicerint (16 tömegrész) adtunk injekció készítésére alkalmas vízhez (WFI, 1000térfogatrész). Az így kapott oldatban protamin-szulfát port (0,6 tömegrész) oldottunk fel. Cink-klorid oldatot (60 térfogatrész) készítettünk oly módon, hogy cink-oxidot sósavban oldottunk – a kapott oldat koncentrációja cinkre nézve 15,3 mM a 0,1 N sósavban – majd ezt az oldatot az előző oldathoz adtuk. B29-Ná-oktanoil humán inzulin száraz port (7 tömegrész) adtunk az oldathoz és keverés közben feloldottuk. A pH-t az oldódás elősegítése érdekében -amennyiben szükséges – kis mennyiségű 1 N sósavval és 1 N nátrium-hidroxiddal 3-ra állítottuk. Ezt követően a pH-t 3-3,6 között tartottuk kis mennyiségű 1 N sósav és 1 N nátrium-hidroxid alkalmazásával. Ezt az oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteineket megkötő szűrőn átszűrtük.

Egy másik oldatot is készítettünk kétbázisú nátrium-foszfát (7,56 tömegrész), fenol (0,65 tömegrész), m-krezol (1,6 tömegrész) és glicerint (16 tömegrész) injekciós vízben (1000 térfogatrész) történő feloldásával. Az oldat pH-ját olyan értékre állítottuk be, hogy ezen oldat és a B29-Ná-oktanoil humán inzulint tartalmazó előző oldat azonos térfogatnyi mennyiségben történő összeöntésekor a keletkezett oldat pH-ja kb. 7,5 és kb. 7,7 közötti legyen. A megfelelő pH beállítás után az oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteineket megkötő szűrőn átszűrtük. Ezután következett a B29-Ná-oktanoil humán inzulint tartalmazó oldat és az utóbbi leszűrt oldat azonos térfogatnyi mennyiségben történő egyesítése. Azonnal amorf csapadék képződött, amely 25°C-on, 60 órás zavartalan állás után kikristályosodott. A kapott készítményben lévő mikrokristályok nyújtottabb és egyenletesebb hatást biztosítanak, mint az azonos dózisban adott NPH humán inzulin.

51. példa

B29-Ná-oktanoil humán inzulin mikrokristályok

Oldatot készítettünk oly módon, hogy kétbázisú nátrium-foszfátot (3,78 tömegrész) fenolt (0,65 tömegrész), m-krezolt (1,6 tömegrész), és glicerint (16 tömegrész) adtunk injekció készítésére alkalmas vízhez (WFI, 1000 térfogatrész).. Cink-klorid oldatot (60 térfogatrész) készítettünk oly módon, hogy cink-oxidot sósavban oldottunk – a kapott oldat koncentrációja cinkre nézve 15,3 mM a 0,1 N sósavban – majd ezt az oldatot az előző oldathoz adtuk. B29-Ná-oktanoil humán inzulin száraz port (7 tömegrész) adtunk az oldathoz és keverés közben feloldottuk. A pH-t az oldódás elősegítése érdekében -amennyiben szükséges – kis mennyiségű 1 N sósavval és 1 N nátrium-hidroxiddal 3-ra állítottuk. Ezt követően a pH-t 7,6-ra állítottuk be 10% sósav és 10% nátrium-hidroxid alkalmazásával. Ezt az oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrtük.

Egy másik oldatot is készítettünk kétbázisú nátrium-foszfát (3,78 tömegrész), fenol (0,65 tömegrész), m-krezol (1,6 tömegrész) és glicerin (16 tömegrész) injekciós vízben (1000 térfogatrész) történő feloldásával. Az oldat pH-ját 7,6-ra állítottuk. Ezt az oldatot egy 0,22 mikronos, kis proteinek megkötő szűrőn átszűrtük. Ezután a protamint tartalmazó oldatot és B29-Ná-oktanoil humán inzulint tartalmazó oldatot azonos térfogatnyi mennyiségben összeöntöttük. Azonnal amorf csapadék képződött, amely 25°C-on, 60 órás zavartalan állás után kikristályosodott. A kapott készítményben lévő mikrokristályok nyújtottabb és egyenletesebb hatást biztosítanak, mint az azonos dózisban adott NPH humán inzulin.

52. példa

B29-Ná-(2-etil-hexanoil)-humán inzulin mikrokristályok

B29-Ná-(2-etil-hexanoil)-humán inzulint állítottunk elő az 5. példában leírtak szerint. B29-Ná-(2-etil-hexanoil)-humán inzulint (8,00 mg) feloldottunk 0,400 ml 0,1 N sósavban. Ezután lényegében a 17. példa eljárását követtük. Csapadék képződött. A keveréket 25°C-on zavartalanul állni hagytuk. Pálcika-szerű kristályok keletkeztek, melyek hozama több, mint 80% volt. Az előzőekben leírt spektrofotometriás oldódási mérővizsgálat alapján a B29-Ná-(2-etil-hexanoil)-humán inzulin kristályok $t_{1/2}$ ideje 34-35 perc közötti volt, szemben a Humulin® N készítmény ugyan azzal a mérővizsgálattal mért kb.6 perces felezési idejével.

1. farmakológiai példa

Diabéteszes kutyákon végzett in vivo vizsgálat

Az eddigi példák egyike szerint előállított mikrokristályokat tartalmazó szuszpenziós készítmény nyújtott hatását vizsgáltuk diabéteszes kutyákon, oly módon, hogy kontroll vegyületekkel hasonlíttjuk össze azok hiperglikámiára gyakorolt kontrolláló képességét. Kb.0,2 egység/testsúly kg dózist alkalmaztunk napi egyszeri adagban. A teszt napokon a szuszpenzió szubkután beadását követően 24 órán keresztül figyeltük a vércukorszintet. Kontroll vegyületként humán inzulin NPH-t alkalmaztunk. A vizsgált dózisban adott találmány szerinti mikrokristályokat tartalmazó szuszpenziós készítmény - összehasonlítva a humán inzulin NPH készítménnyel - csökkenti a vércukorszintet és nyújtott hatással rendelkezik.

2. farmakológiai példa

Mikrokristályok hatástartamának vizsgálata patkányokon

1,898 ml 19. példa szerint előállított kristályos készítményhez 3,102 ml 16 mg/ml glicerint, 20 mM Tris-t, 1,6 mg/ml m-krezolt, 0,65 mg/ml fenolt és 40 mg/ml



trinátrium-citrátot tartalmazó (pH 7,4) oldatot adtunk. Ily módon 5 ml U40 készítmény kaptunk, amelyet BBDP/Wor patkányokon, egy genetikailag jellemzett állatmodellen teszteltünk, amely a Biomedical Research Models, Inc.-el (Rutland, MA) kapcsolatban álló Massachusetts Orvosi Központ Egyetemétől (Worcester, MA) szerezhető be. A DPBB/Wor patkány vérvonal diabéteszre hajlamos és inzulin-függő (autoimmun) diadétesz mellituszt mutat.

Negyven BBDP/Wor patkányból [20 hím/20 nőstény, 4-5 hónaposak, hosszú hatású inzulinon (PZI) tartva] nemek szerinti véletlenszerű kiválasztással 8 kísérleti csoportot hoztunk létre: A, B, C, D, E, F, G és H csoport. Az A csoportot (5 hím) és a B csoportot (5 nőstény) 2 napig kezeltük egy 2,5 mg/ml cinket tartalmazó U40 humán inzulin ultralente készítménnyel. A C csoportot (5 hím) és a D csoportot (5 nőstény) 2 napig egy 1,25 mg/ml cinket tartalmazó U40 humán inzulin ultralente készítménnyel kezeltük. Az E csoportot (5 hím) és az F csoportot (5 nőstény) 2 napig egy U40 marha-sertér PZI inzulin készítménnyel kezeltük. A G csoportot (5 hím) és a H csoportot (5 nőstény) 2 napig egy találmány szerinti kristályos készítménnyel kezeltük. Mindegyik patkány a csoportjuknak megfelelő készítményt tartalmazó napi injekciót kapott a vércukorszint meghatározást megelőzően két napon át és azon a napon, amikor a vércukorszintet meghatároztuk.

A teszt készítmények alkalmazása előtt félórával vért vettünk. Az állatok a szubkután injekciót délelőtt 11 óra 30 perckor kapták meg, a hímek 0,9 U/100 g testtömeg és a nőstények 1,1 U/100 g testtömeg dózisban. A farok bemetszése útján vért vettünk (érzéstelenítés nélkül), jégen tartottuk, centrifugáltuk és Beckman II glükóz analízátor segítségével a vércukor értékeket meghatároztuk. Vért vettünk közvetlenül a teszt készítmények adagolása előtt és 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 és 24 órával az adagolás után. A találmány szerinti kristályos készítmények vércukorszint

szabályozó hatása összehasonlítható azzal, amit a hosszú hatású inzulin készítmények esetében kaptunk.

3. farmakológiai példa

Mikrokristályok hatástartamának vizsgálata patkányokon

A 2. farmakológiai példa teszt eljárását ismételtük meg korábban leírtak szerint előállított szuszpenziót tartalmazó U40 készítmény másik 5 ml-es mintájával.

Harmincöt BBDP/Wor patkányból [18 hím és 17 nőstény, koruk 4-5 hónap, hosszú hatású inzulinon (PZI) voltak tartva] nemek szerinti véletlenszerű kiválasztással 6 kísérleti csoportot hoztunk létre: I, J, K, L, M és N csoport. Az I csoportot (8 hím) és a J csoportot (8 nőstény) 3 napig kezeltük a tallmány szerinti kristályos készítménnyel. A K csoportot (5 hím) és a L csoportot (4 nőstény) 3 napig egy 2,5 mg/ml cinket tartalmazó U40 humán inzulin ultralente készítménnyel kezeltük. Az M csoportot (5hím) és az N csoportot (5 nőstény) 3 napig egy U40 marha-sertés PZI inzulin készítménnyel kezeltük. Mindegyik patkány a csoportjuknak megfelelő készítményt tartalmazó napi injekciót kapott három napon át a vércukor meghatározás előtt, és azon a napon, amelyen a vércukorszintet meghatároztuk.

A teszt készítmények alkalmazása előtt félórával vért vettünk. Az állatok a szubkután injekciót délelőtt 11 óra 30 perckor kapták meg, a hímek 0,9 U/100 g testtömeg és a nőstények 1,1 U/100 g testtömeg dózisban. A farok bemetszése útján vért vettünk (érzéstelenítés nélkül), jégen tartottuk, centrifugáltuk és Beckman II glükóz analizátor segítségével a vércukor értékeket meghatároztuk. Vért vettünk közvetlenül a teszt készítmények adagolása előtt és 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 és 24 órával az adagolás után. A tallmány szerinti kristályos készítmények vércukorszint

szabályozó hatása összehasonlítható azzal, amit a hosszú hatású inzulin készítmények esetében kaptunk.

4. farmakológiai példa

Mikrokristályok hatástartamának vizsgálata patkányokon

Huszonhat BBDP/Wor patkányokból [13 hím és 13 nőstény, koruk 4-6 hónap, hosszú hatású protamin cink inzulinon (PZI) voltak tartva] nemek szerinti véletlenszerű kiválasztással 4 kísérleti csoportot hoztunk létre. O, P, Q és R. Az O csoportot (8 hím) és a P csoportot (8 nőstény) 3 napon keresztül a 2. farmakológiai példában említett, találmány szerinti kristályos készítménnyel kezeltük. Mindegyik patkány a csoportjuknak megfelelő készítményt tartalmazó napi injekciót kapott három napon át a vércukor meghatározás előtt, és azon a napon, amelyen a vércukorszintet meghatároztuk.

A teszt készítmények alkalmazása előtt félórával vért vettünk. Az állatok a szubkután injekciót délelőtt 11 óra 30 perckor kapták meg, a hímek 0,9 U/100 g testtömeg és a nőstények 1,1 U/100 g testtömeg dózisban. A farok bemetszése útján vért vettünk (érzéstelenítés nélkül), jégen tartottuk, centrifugáltuk és Beckman II glükóz analizátor segítségével a vércukor értékeket meghatároztuk. Vért vettünk közvetlenül a teszt készítmények adagolása előtt és 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 és 24 órával az adagolás után. A találmány szerinti kristályos készítmények vércukorszint szabályozó hatása összehasonlítható azzal, amit a hosszú hatású inzulin készítmények esetében kaptunk.

5. farmakológiai példa

B29-Ná-oktanoil-humán inzulin tartalmú amorf precipitátum tanulmányozása kutyákon

A 43. példában leírtak szerint előállított B29-Ná-oktanoil-humán inzulin és protamin tartalmú amorf precipitátum készítmény hatástartamát határoztuk meg két normál kutyán (2nmól/kg, szubkután adva). A kutyák állandó sztomatosztatin infúziót kaptak az átmeneti diabetikus állapot előidézése céljából. Az adatokat összehasonlítottuk azokkal az adatokkal, amelyeket hasonló modellben humán inzulin ultralente (3 nmól/kg, n=5) és sóoldat (n=6) adagolása után kaptunk.

A kísérleteket egy éjszakán át éheztetett, folyamatosan kanülözött, éber állapotú hím és nőstény, 10-17 kg közötti súlyú beagle fajtájú kutyákon (Marsall Farms, North Rose, NY) végeztük el. A tanulmányok megkezdése előtt legalább 10 nappal az állatokat izofluránnal érzéstelenítettük (Anaqest, Madison, WI) és szilikon katétereket, melyeket érbemeneti nyílásokhoz (V-A-PTM, Access Technologies, Norfolk Medical, Skokie, IL) rögzítettünk, a femorális artériába és a femorális vénába vezettünk be. A katétereket glicerin/heparin oldattal (3:1, v/v, 250 kIU/ml végleges heparin koncentráció, a glicerin a Sigma Chemical Co.-tól, /St. Louis, MO/ és a heparin az Elkins-Sinn Inc.-tól /Cherry Hill, NJ beszerezve) töltöttük meg a katéterek eldugulásának megelőzése céljából és a sebeket bezártuk. Kefzolt (Elli Lilly & Co., Indianapolis,, IN) adtunk a műtétet megelőzően (20 mg/kg i.v. és 20 mg/kg i.m.), majd az operáció után Keflex-et adagoltunk (250 mg/kg per os, naponta egyszer hét napon át) a fertőzések kivédése érdekében. Ezen kívül poszt-operatív kezelésként még torbugesic-et adagoltunk (1,5 mg/kg, i.m.) a fájdalom enyhítése céljából.

A kísérleti napot megelőzően vért vettünk, hogy megállapíthassuk az állatok egészségi állapotát. Csupán egy olyan állatot alkalmaztunk, amelynek a hematokrit

indexe 38% fölötti és a leukocita száma 16.000 /mm³ alatti volt (vérelemző készülék: Cell-Dyn 900, Sequoia-Turner, Mountain View, CA).

A kísérlet reggelén az érbemeneti nyílások elő voltak készítve (Access Technologies, Norfolk Medical, Skokie, IL), a katéterek tartalmát már betöltöttük, a katétereket átmostuk sóoldattal (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL), a kutyákat ketrecbe helyeztük, és a ketrecen, amelynek területe rozsdamentes acél pányvával volt körülvédve és amely egy forgó szerkezethez kapcsolódott [Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA] egy bemeneti kapu volt kialakítva.

A kutyákat 10 percig hagytuk hozzászokni a ketrec környezetéhez, mielőtt artériás vérmintát vettünk az éhgyomri inzulin és a vércukor koncentrációk meghatározása céljából (idő=-30 perc). Ekkor egy folyamatos, ciklusos szomatosztatin intravénás infúziót (0,65 µg/kg/perc, BACHEM California, Torrance, CA) indítottunk el és adagoltuk azt, az elkövetkező 30,5 órában. Harminc perccel az infúzió elindítása után (idő=0 perc) artériás vérmintát vettünk és egy szubkután adott tesztanyag vagy hordozóanyag bóluszt injekcióztunk be a nyak dorzális területére. Ez után artériás vérmintákat vettünk háromóránként, hogy meghatározzuk a plazma glükóz és inzulin koncentrációkat.

Az artériás vérmintákat dinátrium-EDTA (Terumo Medical Corp., Elkton, MD) tartalmú vákumos vérgyűjtő kémcsövekbe összegyűjtöttük és azonnal jégre tettük. A mintákat centrifugáltuk és a kapott plazmát propilén teszt csövekbe helyeztük és a vizsgálat idejére jégen hűtöttük.

A plazma glükóz koncentrációkat a vizsgálat napján egy glükóz-oxidáz eljárás felhasználásával Beckman glükóz analizátorral (Beckman Instruments, Inc., Brea, CA) határoztuk meg. Más mérővizsgálatra szánt mintákat az adott analízis

elvégzéséig -80°C -on tartottuk. Az inzulin koncentrációkat dupla antitest radioimmunoassay felhasználásával állapítottuk meg.

A kísérlet végén a katétereket átmostuk friss sóoldattal, kefzolos kezelést végeztünk (20 mg/kg) és glicerin/heparin keveréket töltöttünk bele; az antibiotikumot (keflex, 250 mg) szájon át adagoltuk. A felhasznált állatok számának minimálisra történő csökkentéséhez és – amennyiben ez lehetséges – az alapadatok összepárosításához, az állatokat többféle időpontokban tanulmányoztuk. A megismételt kísérleteket az állatokon minimum egy hét különbséggel hajtottuk végre.

A korábban már leírt eljárással előállított B29-Ná-oktanoil-humán inzulin tartalmú amorf precipitátumos készítmény hatékony vércukor kontrollt biztosít csaknem 27 órán keresztül, szemben a humán inzulin ultralente készítmény 21 órás idejével. A precipitátum szignifikánsan egyenletesebb és hosszabb idejű vércukor kontrollt eredményez, mint a humán inzulin ultralente. Például a vércukor koncentráció legalacsonyabb értékét kaptuk 1,5 órával a precipitátum beadása után és ezt követően a vércukorszint egy nagyjából konstans szintre emelkedett. Ezzel szemben a humán inzulin ultralente esetében a legalacsonyabb vércukorszintet 9 órával a beadás után érték el és ezután a vércukorszint már viszonylag gyorsan emelkedett. A találmány szerinti precipitátum készítmény esetében a legalacsonyabb vércukorszint érték 72 mg/dl volt, míg az ultralente készítmény esetében 56 mg/dl. Végezetül a plazma inzulinszintek megerősítették a fenti megfigyeléseket és összefüggést mutatnak azzal, hogy a B29-Ná-oktanoil-humán inzulin tartalmú precipitátum készítménynél tapasztalt hatás egyenletesebb és hosszabb idejű, mint amit a humán inzulin ultralente produkál.

6. farmakológiai példa

B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályok tanulmányozása kutyákon

A 19. példában leírtak szerint, vagy lényegében a 19. példában leírtak szerint előállított B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályokat tartalmazó két készítmény glükodinamikáját vizsgáltuk meg normál kutyákon, lényegében az 5. farmakológiai példában megadottak szerint. A két mikrokristályos készítmény egyikét 2 nmól/kg dózisban szubkután adagoltuk valamennyi kutyának. A kísérleteket három különböző alkalommal hajtottuk végre. E három kísérlet adatait összesítettük. Az összes adatot 10 kutya szolgáltatta, melyek mindegyike a nevezett készítmény egyikének 2 nmól/kg-os dózisát kapta. Egy másik önálló kísérletben lényegében a 19. példában leírtak szerint előállított B29-Ná-oktanoil-humán inzulin mikrokristályos készítményt adagoltuk szubkután öt kutyának 3 nmól/kg dózisban. Kontrollként humán inzulin NPH-t (2 nmól/kg, n=5) és sóoldatot (n=5) alkalmaztunk. Mindegyik kísérletben a kutyák állandó sztomatostatin infúziót kaptak az átmeneti diabetikus állapot kiváltására.

A 2 nmól/kg dózisban adagolt B29-Ná-oktanoil-humán inzulint tartalmazó mikrokristályos készítmény hatástartama 27 óra volt, szemben az ugyanilyen dózisban alkalmazott humán inzulin NPH készítmény 21 órás hatásidejével. A találmány szerinti készítmény további előnyös tulajdonságaihoz tartozik az, hogy a glükodinamikai profil kevésbé mutat hipoglikémiás hajlamot, mint az a humán inzulin NPH esetében megfigyelhető. A B29-Ná-oktanoil-humán inzulint tartalmazó mikrokristályos készítményt 3 nmól/kg dózisban adva a hatékony vércukor szabályozás legalább 30 órán keresztül fennállt. A legalacsonyabb vércukorszint érték nagyjából megegyezett azzal, mint amit a humán inzulin NPH adagolása után kaptunk (kb. 65 mg/dl). Ez az alacsony vércukorszint azonban sokkal rövidebb ideig állott fenn a B29-Ná-oktanoil-humán inzulint tartalmazó mikrokristályos készítmény

alkalmazásakor (kb. 3 óra), mint amit a humán inzulin NPH készítmény esetében megfigyelhettünk (kb. 7,5 óra). A mélypont után a vércukorszint értéke azokban a kutyákban, amelyek a B29-Ná-oktanoil-humán inzulin tartalmazó mikrokristályos készítményt kapták, csupán 91 és 115 mg/dl között változott a 30. óráig bezáróan (amely idő után további adatok nem állnak rendelkezésre). Ezzel ellentétben a 2nmól/kg dózisban humán inzulin NPH készítményt kapó kísérleti csoportban a mélypont elérését követően a vércukorszint értéke 89 és 145 mg/dl között ingadozott.

7. farmakológiai példa

B29-Ná-hexanoil-humán inzulin mikrokristályok tanulmányozása kutyákon

A 16. példában leírtak szerint előállított B29-Ná-hexanoil-humán inzulin mikrokristályokat tartalmazó készítmény glükodinamikáját vizsgáltuk meg normál kutyákon, lényegében az 5. farmakológiai példában megadottak szerint. A 2 nmól/kg dózisban adagolt B29-Ná-hexanoil-humán inzulin mikrokristályokat tartalmazó készítmény hatékonynak bizonyult 24 órán keresztül, csakúgy, mint az azonos dózisban adott humán inzulin NPH, melynek hatástartama szintén 24 óra volt. A glükodinamikai profil kiegyenlítettebb volt és kevésbé mutatott hipoglikémiás jelleget, mint a humán inzulin NPH készítmény. A legalacsonyabb vércukorszint érték nagyjából hasonló volt azzal, mint amit a humán inzulin NPH adagolása után kaptunk (nevezetesen kb. 67 mg/dl, míg a humán inzulin NPH készítmény esetében 64 mg/kg). Ez az alacsony vércukorszint azonban sokkal rövidebb ideig állott fenn a B29-Ná-hexanoil-humán inzulint tartalmazó mikrokristályos készítmény alkalmazásakor (kb. 3 óra), mint amit a humán inzulin NPH készítmény esetében megfigyelhettünk (kb. 7,5 óra)

Jelen találmány működésének szempontjait, előnyös megvalósítási formáit és módzatait részleteztük e leírásban. Az általunk oltalmazni kívánt találmány azonban nem korlátozódik a közölt, konkrét kiviteli alakokra, ezeket inkább szemléltetésnek szánjuk, semhogy a találmányt ezzel korlátoznánk. A különböző variációk és változatok szakember által megvalósíthatóak anélkül, hogy a találmány lényegétől eltérnének.

Szabadalmi igénypontok

1. Mikrokrisztály, amely
 - a) protein-származékként inzulint-származékot, inzulin-analóg-származékot vagy proinzulin-származékot;
 - b) komplexképző vegyületet;
 - c) hexamer-stabilizáló vegyületet; és
 - d) két vegyértékű fém kationt tartalmaz.
2. Az 1. Igénypont szerinti mikrokrisztály, amely hexamer-stabilizáló vegyületként kb.0,15 mg és kb.3,5 mg közötti mennyiségű protamint tartalmaz 3,5 mg protein-származékra számítva.

3. A 2. igénypont szerinti mikrokristály, amely két vegyértékű fém kationként kb.0,3 mól és kb.0,7 mól/mól protein-származék közötti mennyiségben cinket tartalmaz.

4. A 3. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a hexamer-stabilizáló vegyület a protein-származék R6 hexamer konformációjának kialakulásához szükséges mennyiségben jelen lévő fenolos konzerválószer, mely fenol, m-krezol, o-krezol, p-krezol, klór-krezol, vagy metil-parabén vagy ezek keverékei.

5. A 4. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék egy acilezett inzulin vagy acilezett inzulin-analóg.

6. Az 5. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék egy zsírsav-acilezett inzulin.

7. A 6. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék egy egyenes láncú, telített zsírsavval acilezett inzulin.

8. A 7. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék egy a LysB29-N^o-aminocsoportnál mono-acilezett inzulin.

9. A 8. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék n-hexánsavval, n-heptánsavval, n-oktánsavval, n-nonánsavval vagy n-dekánsavval van acilezve.

10. A 9. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék B29-Ná-hexanoil-humán inzulin, B29-Ná-oktanoil-humán inzulin vagy B29-Ná-dekanoil-humán inzulin.

11. A 8. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék n-dodekánsavval, n-tetradekánsavval vagy n-hexadekánsavval van acilezve.

12. A 7. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a zsírsav-acilezett inzulin egy di-acilezett inzulin, mely a LysB29-Ná-aminocsoportnál és egy N-terminális Ná-aminocsoportnál van acilezve n-hexánsavval, n-heptánsavval, n-oktánsavval, n-nonánsavval vagy n-dekánsavval.

13. A 6. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék egy elágazó láncú, telített zsírsavval acilezett inzulin.

14. A 13. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben az elágazó, telített zsírsav leghosszabb lánc 3-10 szénatomos.

15. A 5. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék egy zsírsav-acilezett inzulin-analóg.

16. A 15. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék egy egyenes láncú, telített zsírsavval acilezett inzulin-analóg.

17. A 16. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék az Ná-aminocsoportnál van mono-acilezve.

18. A 17. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék az n-hexánsav, n-heptánsav, n-oktánsav, n-nonánsav és n-dekánsav alkotta csoportból kiválasztott zsírsavval van acilezve.

19. A 18. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett állati inzulin, zsírsav-acilezett monomer inzulin-analóg, zsírsav acilezett deléciós-analóg vagy zsírsav acilezett pl-változtatott inzulin-analóg.

20. A 19. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett-desz(B30)-humán inzulin-analóg, zsírsav-acilezett-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg vagy zsírsav-acilezett-AspB28-humán inzulin-analóg.

21. A 20. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett-desz(B30)-humán inzulin-analóg.

22. A 17. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék n-dodekánsavval, n-tetradekánsavval vagy hexadekánsavval van acilezve.

23. A 22. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett állati inzulin, zsírsav-acilezett monomer inzulin-analóg, zsírsav acilezett deléciós-analóg vagy zsírsav acilezett pl-változtatott inzulin-analóg.

24. A 23. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett-desz(B30)-humán inzulin-analóg, zsírsav-acilezett-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg vagy zsírsav-acilezett-AspB28-humán inzulin-analóg.

25. A 24. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett-desz(B30)-humán inzulin-analóg.

26. A 25. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék B29-Ná-mirisztoil-desz(B30)-humán inzulin-analóg.

27. A 26. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék B29-Ná-mirisztoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

28. A 15. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a protein-származék egy elágazó láncú, telített zsírsavval acilezett inzulin-analóg.

29. A 28. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben az elágazó láncú telített zsírsav leghosszabb lánc 3-10 szénatomos.

30. Az 1. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a mikrokristály pálcika-szerű kristályszerkezettel rendelkezik.

31. Az 1. igénypont szerinti mikrokristály, amelyben a mikrokristály szabálytalan szerkezetű.

32. Egy szilárd fázist és egy folyékony fázist tartalmazó szuszpenziós készítmény, amelyben a szilárd fázis az 1. igénypont szerinti mikrokristályt, és a folyékony fázis vizet tartalmaz.

33. A 32. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a szilárd fázis a 2. igénypont szerinti mikrokristályt tartalmazza.

34. A 33. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a folyékony fázis tartalmaz továbbá kb.0,5 mg/ml és kb.6 mg/ml közötti koncentrációban fenolos konzerválószer, gyógyszerészetileg elfogadható puffert, és izotonizálószer.

35. A 34. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a folyékony fázis tartalmaz továbbá inzulint, inzulin-analógot, acilezett inzulint vagy acilezett inzulin-analógot.

36. A 35. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a folyékony fázis inzulint tartalmaz.

37. A 35. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a folyékony fázis inzulin-analógot tartalmaz.

38. A 37. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben az inzulin-analóg egy monomer inzulin-analóg.

39. A 38. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben az inzulin-analóg LysB28, ProB29-humán inzulin-analóg.

40. A 32. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a folyékony fázis a protein-származék 1 móljára számítva kb.5 - kb.7 mól cinket és 1 mg derivált proteinre számítva kb.0,25 mg – kb.0,5mg protamint tartalmaz a szuszpenziós készítményben.

41. Eljárás az 1. igénypont szerinti mikrokristály előállítására azzal jellemezve, hogy

- a) protein-származékot, hexamer-stabilizáló vegyületet és két vegyértékű fém kationt egy olyan pH-jú vizes oldószerben feloldunk, amely lehetővé teszi a protein-származék hexamerek képződését, és
- b) egy komplexképző vegyületet adunk hozzá.

42. Eljárás az 1. igénypont szerinti mikrokristály előállítására azzal jellemezve, hogy

- a) protein-származékot, hexamer-stabilizáló vegyületet és két vegyértékű fém kationt egy olyan pH-jú vizes oldószerben feloldunk, amely nem teszi lehetővé a protein-származék hexamerek képződését, és
- b) a pH-t kb.6,8 és kb.7,8 közötti értékre állítjuk be; és
- c) komplexképző vegyületet adunk hozzá.

43. Eljárás diabétesz kezelésére azzal jellemezve, hogy a 32. igénypont szerinti készítményt az arra rászoruló betegeknek a vércukorszint szabályozásához szükséges mennyiségben adagoljuk.

44. Amorf precipitátum, amely

- a) protein-származékként inzulin-származékot, inzulin-analóg-származékot vagy proinzulin-származékot,
- b) komplexképző vegyületet;
- c) hexamer-stabilizáló vegyületet; és
- d) két vegyértékű fém kationt tartalmaz.

45. A 44. igénypont szerinti amorf precipitátum, amely komplexképző vegyületként kb.0,15 mg és kb.0,5 mg közötti mennyiségű protamint tartalmaz 3,5 mg protein-származékre számítva.

46. A 45. igénypont szerinti amorf precipitátum, amely két vegyértékű fém kationként kb.0,3 mól és kb.0,7 mól/mól protein-származék közötti mennyiségben tartalmaz cinket.

47. A 46. igénypont szerinti amorf precipitátum, amely hexamer-stabilizáló vegyületként fenolos konzerválószer tartalmaz olyan mennyiségben, amely a protein-származék R6 hexamer konformációjának kialakulását lehetővé teszi és amely fenolos konzerválószer fenol, m-krezol, o-krezol, p-krezol, klór-krezol, vagy metli-parabén vagy ezek keverékei.

48. A 47. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék egy acilezett inzulin vagy acilezett inzulin-analóg.

49. A 48. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett inzulin.

50. A 49. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék egy egyenes láncú, telített zsírsavval acilezett inzulin.

51. Az 50. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék egy a LysB29-Ná-aminocsoportnál mono-acilezett inzulin.

52. Az 51. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék n-hexánsavval, n-heptánsavval, n-oktánsavval, n-nonánsavval vagy n-dekánsavval van acilezve.

53. Az 52. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék B29-Ná-hexanoil-humán inzulin, B29-Ná-oktanoil-humán inzulin vagy B29-Ná-dekanoil-humán inzulin.

54. Az 51. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék n-dodekánsavval, n-tetradekánsavval vagy n-hexadekánsavval van acilezve.

55. Az 50. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a zsírsav-acilezett inzulin egy di-acilezett inzulin, mely a LysB29-Ná-aminocsoportnál és egy N-terminális Ná-aminocsoportnál van acilezve n-hexánsavval, n-heptánsavval, n-oktánsavval, n-nonánsavval vagy n-dekánsavval.

56. A 49. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék egy elágazó láncú, telített zsírsavval acilezett inzulin.

57. Az 56. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben az elágazó, telített zsírsav leghosszabb láncú 3-10 szénatomos.

58. A 48. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék egy zsírsav-acilezett inzulin-analóg.

59. Az 58. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék egy egyenes láncú, telített zsírsavval acilezett inzulin-analóg.

60. Az 59. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék az Ná-aminocsoportnál van mono-acilezve.

61. A 60. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék n-hexánsavval, n-heptánsavval, n-oktánsavval, n-nonánsavval vagy n-dekánsavval van acilezve.

62. A 61. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett állati inzulin, zsírsav-acilezett monomer inzulin-analóg, zsírsav acilezett deléciós-analóg vagy zsírsav acilezett pl-változtatott inzulin-analóg.

63. A 62. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett-desz(B30)-humán inzulin-analóg, zsírsav-acilezett-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg vagy zsírsav-acilezett-AspB28-humán inzulin-analóg.

64. A 63. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett-desz(B30)-humán inzulin-analóg.

65. A 60. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék n-dodekánsavval, n-tetradekánsavval vagy n-hexadekánsavval van acilezve.

66. A 65. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett állati inzulin, zsírsav-acilezett monomer inzulin-analóg, zsírsav acilezett deléciós-analóg vagy zsírsav acilezett pl-változtatott inzulin-analóg.

67. A 66. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett-desz(B30)-humán inzulin-analóg, zsírsav-acilezett-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg vagy zsírsav-acilezett-AspB28-humán inzulin-analóg.

68. A 67. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék zsírsav-acilezett-desz(B30)-humán inzulin-analóg.

69. A 68. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék B29-Ná-mirisztoil-desz(B30)-humán inzulin-analóg.

70. A 69. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék B29-Ná-mirisztoil-LysB28,ProB29-humán inzulin-analóg.

71. Az 58. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben a protein-származék egy elágazó láncú, telített zsírsavval acilezett inzulin-analóg.

72. A 71. igénypont szerinti amorf precipitátum, amelyben az elágazó láncú telített zsírsav leghosszabb lánc 3-10 szénatomos.

73. Egy szilárd fázist és egy folyékony fázist tartalmazó szuszpenziós készítmény, amelyben a szilárd fázis a 44. igénypont szerinti amorf precipitátumot, és a folyékony fázis vizet tartalmaz.

74. A 45. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a szilárd fázis a 2. igénypont szerinti mikrokristályt tartalmazza.

75 A 41. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a folyékony fázis tartalmaz továbbá kb.0,5 mg/ml és kb.6 mg/ml közötti koncentrációban fenolos konzerválószer, gyógyszerészetileg elfogadható puffert, és izotonizálószer.

76. A 75. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a folyékony fázis tartalmaz továbbá inzulint, inzulin-analógot, acilezett inzulint vagy acilezett inzulin-analógot.

77. A 76. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a folyékony fázis inzulint tartalmaz.

78. A 76. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a folyékony fázis inzulin-analógot tartalmaz.

79. A 78. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben az inzulin-analóg egy monomer inzulin-analóg.

80. A 79. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben az inzulin-analóg LysB28, ProB29-humán inzulin-analóg.

81. A 79. igénypont szerinti szuszpenzió, amelyben a folyékony fázis a protein-származék 1 móljára számítva kb.5 - kb.7 mól cinket és 1 mg protein-származékra számítva kb.0,25 mg – kb.0,5mg protamint tartalmaz a szuszpenziós készítményben.

82. Eljárás a 45. igénypont szerinti amorf precipitátum előállítására azzal jellemezve, hogy

- a) protein-származékot, hexamer-stabilizáló vegyületet és két vegyértékű fém kationt egy olyan pH-jú vizes oldószerben feloldunk, amely lehetővé teszi a protein-származék hexamerek képződését, és
- b) egy komplexképző vegyületet adunk hozzá.

83. Eljárás az 45. igénypont szerinti amorf precipitátum előállítására azzal jellemezve, hogy

- a) protein-származékot, hexamer-stabilizáló vegyületet és két vegyértékű fém kationt egy olyan pH-jú vizes oldószerben feloldunk, amely nem teszi lehetővé a protein-származék hexamerek képződését, és
- b) a pH-t kb.6,8 és kb.7,8 közötti értékre állítjuk be; és
- c) komplexképző vegyületet adunk hozzá.

84. Eljárás diabétesz kezelésére azzal jellemezve, hogy a 73. igénypont szerinti készítményt az arra rászoruló betegeknek a vércukorszint szabályozásához szükséges mennyiségben adagoljuk.

A meghatalmazott

Dr. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
Dr. S.B.S. és Társaság
Szabadalmi Ügyvédi Iroda
H-1022 Budapest, Andrássy út 115.
Telefon: 34-21-9301, Fax: 34-21-9323

Köves György

BÓROS ISTVÁN