

70.424/SZE

A2

## Glukagonszerű peptid-1 kristályok

## KIVONAT

A jelen találmány a glukagonszerű peptid-1-gyel rokon molekulák egyedi tetragonális lapos pálcika alakú vagy lemezes kristályait, ezek előállítási eljárásait, összetételeit és ezek javított kristályos formáinak használatát biztosítja. A kristálykészítmények *in vivo* megnyújtott hatásidejűek és a cukorbetegség, a kövérség és rokon állapotok kezelésére hasznos.



2001. 02. 07.

70.424/SZE

## Glukagonszerű peptid-1 kristályok

A jelen találmány a peptidkémia tárgykörébe tartozik, mivel a gyógyszerészeti kutatásban és fejlesztésben alkalmazott peptid-ekkel foglalkozik. A találmány a glukagonszerű peptid-1 egyedi tetragonális lapos pálcika alakú vagy lemezes kristályait, ezek előállítási eljárásait, összetételeit és ezek javított kristályos formáinak használatát biztosítja.

A GLP-1 hormont, mely a 160 aminosav hosszúságú preglukagon előfőhérje proteolízisekor természetes úton kialakuló 37 aminosavból álló peptid, melyet először 1987-ben azonosítottak incertin néven. A GLP-1-et a táplálék bevitel hatására az intestinális L-sejtek választják ki, és azt találták, hogy az inzulin szekréción stimulálja (inzulinotrop hatás), ezzel olyan sejtek glükózfelvételére hatnak, melyek a szérumban glükóz-szintjét csökkentik [Mojsov: Int. J. Peptide Protein Research, 40, 333-343 (1992)]. A GLP-1 aktivitása gyér. A 6. és a 7. helyzetek között bekövetkező endogén hasítás után egy biológiailag sokkal aktívabb GLP-1(7-37)OH peptid keletkezik. Az így létrejött GLP-1(7-37)OH termék, az L-sejtekben bekövetkező terminális glicin eltávolítása miatt, hozzávetőleg 80 %-a C-terminálisán amidált, és rendszerint GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-nek nevezik. Azokat a molekulákat, melyek erős homológiát mutatnak vele, vagy abból származnak, vagy natív for-

máin alapulnak, ebben a szabadalmi bejelentésben általában GLP-knek nevezzük.

Az ismert GLP-k szabad sav vagy amidált formáinak biológiai hatásai és metabolitikus turnover hasonló, és a cukorbetegség, a kövérség és az ezekkel rokon állapotok kezelésére ígéretes szernek látszanak. Ezzel szemben, a GLP-k biológiai felezési ideje igen rövid, néhányuknak 3-5 perc, így gyógyszerészeti szerként történő alkalmazásuk nem vonzó. Jelenleg, a dipeptidil-peptidáz-IV (DPP-IV) aktivitásáról azt gondolják, hogy könnyen inaktivál sok GLP-t és részben felelős a megfigyelt nagyon rövid szérum felezési időért. A parenterális beadást követő gyors abszorpcióért és kiürülésért is felelősnek tartják. Így szükség van olyan eszköz megtalálására, mely ezeknek az ígéretes szereknek a hatását megnyújtja.

Az *in vivo* DPP-IV hasítás ellen az egyik megközelítési mód ezeknek a molekuláknak a módosításában rejlik [lásd például: a 5,512,549 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentést]. Az inzulin szakirodalmában már régóta ismert, hogy a megnyúlt hatástartam olyan kristályos fehérje kisserelések szubkután alkalmazásával oldható meg, melyek raktárként szerepelnek, és amelyek az oldékony fehérjét csak hosszú idő alatt engedik ki.

A GLP-1(7-37)OH heterogén mikrokristályos kristályainak csoportjait sóoldatokból növesztették és a kristályok cinkes és/vagy m-krezolos átítatásos kezelése után megvizsgálták [Kim és Haren: *Pharma. Res.*, 12(11), (1995)]. A túszerű kristályokból



álló GLP(7-36)NH<sub>2</sub> nyers kristályos szuszpenzióinak előállítását, és amorf kicsapását is, a foszfát oldatokból végezték, mely cinket vagy protamint tartalmazott [Pridal és mtsai: International Journal of Pharmaceutics 136, 53-59 (1996)]. Az EP 0 619 322 A2 szabadalmi bejelentés a GLP-1(7-37)OH olyan mikrokristályos formáinak előállítását írja le, amiket a fehérje oldatok pH = 7,0-8,5 értékű pufferben a sók bizonyos kombinációival és alacsony molekulatömegű polietilén-glikolokkal (PEG) történő összekeverésével hoznak létre. Bár, az ilyen kristálycsoportok és nyers szuszpenziók a GLP-k hosszan ható gyógyszerészeti készítményeinek előállításában egyáltalán nem ideálisak, mivel ezek a kristályok vagy amorf-kristályos szuszpenziók heterogén csoportok, valamint a szennyeződések befogására hajlamosak és ráadásul reprodukálható előállításuk és beadásuk nehéz.

Ezen a területen a legmeglepőbb felfedezés az, hogy a különböző GLP-k egyedi tetragonális lapos pálcika alakú vagy lemezes kristályai az anyalúgból reprodukálhatóan előállíthatók, ahol az anyalúg egy igen széles pH tartományú pufferben oldott GLP-t és egy C<sub>1-3</sub> alkoholt, vagy szabadon megválaszthatóan mono- vagy diszacharidot tartalmaz. Az eredményül kapott egyedi lapos pálcika alakú vagy lemezes kristályok a szakirodalomból ismert kristályos csoportokban vagy nyers szuszpenziókban lévő GLP-1(7-37)OH-val szemben sokkal jobbak és számos előnnyel bírnak.

A jelen találmány egyedi tetragonális lapos pálcika alakú vagy lemezes kristályai a szennyezéseket kevésbé képesek csap-

dába ejteni, és ezért az ismert heterogén csoportokkal szemben nagyobb kitermeléssel állíthatók elő, valamint beadásuk reprodukálhatóbb. A jelen találmány kristályos összetételei gyógyszerészetileg aktívak, mivel viszonylag egységesebb formájúak és hosszabb ideig szuszpenzióban maradnak, mint a kristályos csoportok vagy amorf-kristályos szuszpenziók, melyek könnyebben ülepednek, aggregálódnak vagy egybecsapódnak, a fecskendőtütt eltömik és általában a dozírozást kiszámíthatatlanná teszik. Igen jelentős, hogy a jelen találmány kristályos összetételeinek farmakokinetikája kiterjedt, egységes és reprodukálható, ami hagyományos átitatásos kristályosítási technikákat felhasználva cink hozzáadásával módosítható, vagy alternatívaként cinket tartalmazó oldattal módosítható.

A jelen találmány a glukagonszerű peptid-1-gyel kapcsolatos molekulák (GLP-k) egyedi pálcika alakú vagy lemezes kristályainak előállítási folyamatait tartalmazza olyan egyedi pálcika alakú vagy lemezes kristályok előállításával, mely magában foglalja egy kristályosítási oldat elkészítését, amely tisztított GLP-t, pufferelő szert, alkoholt vagy mono- vagy diszacharidot és szabadon megválaszthatóan ammónium-szulfátot vagy cinket tartalmaz. Egy másik megvalósítási formában a tetragonális lapos pálcika alakú vagy lemezes morfológiával rendelkező GLP kristályokat a következőket tartalmazó csoportból választjuk ki: GLP-1 analóg, GLP-1 származék, DPP-IV védett GLP, GLP-1 peptidanalóg, vagy az igénypontokban megfogalmazott GLP-1 bioszintetikus analógjai. A találmány a GLP kristályok

lényegében homogén összetételeit, gyógyszerészeti összetételeit és az ilyen kiszemelések előállításának folyamatait, valamint a cukorbetegség, a kövérség és az ezekkel rokon állapotok kezelését is magában foglalja.

A szakirodalomban bevett szokások alapján a GLP-1(7-37)OH aminoterminálisát 7-tel és a karboxiterminálisát 37-tel jelöljük. Ezt a nomenklaturát alkalmazzuk más GLP-knél is. Ha nem jelöljük, akkor a C-terminális általában a hagyományos karboxil forma. A GLP-1(7-37)OH aminosavszekvenciája és elkészítése a szakirodalomban jól ismert, lásd például az 5,120,712 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés ismereteit, amelyet itt teljes egészében hivatkozásként építettünk be. Az olvasó kényelmének biztosítására az alábbiakban bemutatjuk a szekvenciát:

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-  
Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-  
Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-COOH (a szekvencia száma: 1)

A "GLP-1 analóg" itt olyan molekulát jelent, mely a GLP-1(7-37)-hez képest egy vagy több aminosav helyettesítést, hiányt, inverziót, vagy hozzáadást tartalmazhat, valamint D-aminosavformák is előfordulhatnak. A szakirodalomban számos GLP-1 analóg ismert, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, ezek a következők: GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Gln<sup>9</sup>-GLP-1(7-37), d-Gln<sup>9</sup>-GLP-1(7-37), Thr<sup>16</sup>-Lys<sup>18</sup>-GLP-1(7-37), és Lys<sup>18</sup>-GLP-1(7-37), Gly<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Gly<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Met<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, acetyl-Lys<sup>9</sup>-GLP-1(7-

37), Thr<sup>9</sup>-GLP-1(7-37), D-Thr<sup>9</sup>-GLP-1(7-37), Asn<sup>9</sup>-GLP-1(7-37), D-Asn<sup>9</sup>-GLP-1(7-37), Ser<sup>22</sup>-Arg<sup>23</sup>-Arg<sup>24</sup>-Gln<sup>26</sup>-GLP-1(7-37), Arg<sup>23</sup>-GLP-1(7-37), Arg<sup>24</sup>-GLP-1(7-37),  $\alpha$ -metil-Ala<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, és Gly<sup>8</sup>-Gln<sup>21</sup>-GLP-1(7-37)OH, és hasonlók.

A jelen találmány további GLP-1 analógjai a következő általános képlettel írhatók le:

R<sub>1</sub>- X -Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-  
Y-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Z-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-  
Gly-Arg-R<sub>2</sub> (a szekvencia száma: 2)

ahol R<sub>1</sub>-et a következő csoportból választjuk ki: L-hisztidin, D-hisztidin, dezamino-hisztidin, 2-amino-hisztidin, béta-hidroxi-hisztidin, homohisztidin, alfa-fluor-metil-hisztidin, és alfa-metil-hisztidin; X-et a következő csoportból választjuk ki: Ala, Gly, Val, Thr, Met, Ile és alfa-metil-Ala; Y-t a következő csoportból választjuk ki Glu, Gln, Ala, Thr, Ser és Gly; Z-t a következő csoportból választjuk ki: Glu, Gln, Ala, Thr, Ser és Gly; és R<sub>2</sub>-t a következő csoportból választjuk ki: NH<sub>2</sub> és Gly-OH.

A WO 91/11457 szabadalmi bejelentésben is leírták a GLP-1 analógokat, ezek a következők: GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36) vagy GLP-1(7-37), illetve ezek amidált formái, ezek gyógyszerészetileg elfogadható sói és azok, amelyek a következő csoportból választott legalább egy módosítást tartalmaznak:

- (a) 26. és/vagy a 34. helyzetekben lévő arginin helyettesítése glicin, szerin, cisztein, treonin, aszparagin, glutamin, tirozin, alanin, valin, izoleucin, leucin, metionin, fenilalanin, arginin vagy D-lizin aminosavakkal; vagy a 36.

- helyzetben lévő arginin helyettesítése glicin, szerin, cisztein, treonin, aszparagin, glutamin, tirozin, alanin, valin, izoleucin, leucin, metionin, fenilalanin, arginin, lizin vagy D-arginin aminosavakkal;
- (b) 31. helyzetekben lévő triptofán helyettesítése oxidációval szemben ellenálló aminosavval;
- (c) legalább egy a következő helyettesítések közül: a 16. helyzetű valin tirozinra; 18. helyzetű szerin lizinre; a 21. helyzetű glutaminsav aszparaginsavra; a 22. helyzetű glicin szerinre; a 23. helyzetű glutamin argininra; a 24. helyzetű alanin argininra; és a 26. helyzetű lizin glutaminra; és
- (d) legalább egy a következő helyettesítések közül: a 8. helyzetben lévő alanin glicinre, szerinre vagy ciszteinre; a 9. helyzetben lévő glutaminsav glicinre, szerinre, ciszteinre, treoninra, aszparaginra, glutaminra, tirozinra, alaninra, valinra, izoleucinra, leucinra, metioninra vagy fenilalaninra; a 10. helyzetben lévő glicin szerinre, ciszteinre, treoninra, aszparaginra, glutaminra, tirozinra, alaninra, valinra, izoleucinre, leucinre, metioninra vagy fenilalaninra; és a 15. helyzetben lévő aszparaginsav glutaminsavra; és
- (e) 7. helyzetű hisztidin glicinre, szerinre, ciszteinre, treoninra, aszparaginra, glutaminra, tirozinra, alaninra, valinra, izoleucinra, leucinra, metioninra vagy fenilalaninra vagy a hisztidin D- vagy N-acilezett vagy alkilezett

formáira; ahol az (a), (b), (d) és (e) helyettesítésekben a helyettesített aminosavak szabadon megválaszthatóan az aminosavak D-formái lehetnek és a 7. helyzetben szubsztituált aminosav szabadon megválaszthatóan N-acilezett vagy N-alkilezett forma lehet.

A "GLP-1 származékot" olyan aminosavszekvenciájú GLP-1(7-37) vagy GLP-1 analóg molekulának határoztuk meg, mely egy vagy több aminosav oldalcsoportjában,  $\alpha$ -szénatomjaiban, aminoterminális csoportjában vagy karboxiterminális csoportjában további kémiai módosításokkal rendelkezik. A kémiai módosítások közé anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők tartoznak: kémiai csoportokkal történő kiegészítés, új kötések létesítése és a kémiai csoportok eltávolítása. Az aminosav oldalcsoportok módosításai közé anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők tartoznak: a lizin  $\epsilon$ -aminocsoportjának acilezése, az arginin, hisztidin vagy lizin N-alkilezése, a glutaminsav vagy az aszparaginsav karboxilcsoportjainak alkilezése és a glutamin vagy az arginin dezaminálása. A terminális aminocsoportok módosításai közé anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők tartoznak: dez-amino, N-alacsonyabb szénatomszámú alkil, N-di-alacsonyabb szénatomszámú alkil és N-acil módosítások. A terminális karboxilcsoportok módosításai közé anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők tartoznak: amid, alacsonyabb alkil-amid, dialkil-amid és alacsonyabb alkil-észter módosítások. Az alacsonyabb alkil alatt a C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkileket értjük.

Továbbá, egy vagy több oldalcsoport vagy terminális csoport védőcsoportokkal védhető, melyek a szakirodalomban jártas szakemberek számára ismertek. Az aminosavak  $\alpha$ -szénatomjai mono- vagy dimetilezettek lehetnek.

További GLP-1 származékokra az 5,188,666 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentésben formáltak igényt, amelyet itt teljes egészében hivatkozásként építettünk be. Az ilyen molekulákat a következő aminosavszekvenciával rendelkező molekulák közül választhatjuk ki:

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-  
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-  
Val-X (a szekvencia száma: 3)

és ezek gyógyszerészetileg elfogadható sói, ahol X-et a következő csoportból választjuk ki Lys-COOH és Lys-Gly-COOH; és a szóban forgó peptid származéka, ahol a szóban forgó peptidet a következő csoportból választjuk ki: a szóban forgó peptid alacsonyabb gyógyszerészetileg elfogadható alkilésztere; és a szóban forgó peptid gyógyszerészetileg elfogadható amidja, amelyet a következő csoportból választunk ki: amid, alacsonyabb alkil-amid és alacsonyabb dialkil-amid.

A jelen találmányban alkalmazott további GLP-1 származékok azok, amelyekre az 5,512,549 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentésben formáltak igényt, amelyeket itt teljes egészében hivatkozásként építettünk be, és amelyeket a következő általános képlettel írhatunk le:

R<sub>1</sub>-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-  
 Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Xaa-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-  
 Val-Lys-Gly-Arg-R<sub>3</sub> (a szekvencia száma: 4)

|  
 R<sub>2</sub>

ahol R<sub>1</sub>-et a következő csoportból választjuk ki: 4-imidazopropionil, 4-imidazoacetyl vagy 4-imidazo- $\alpha$ ,  $\alpha$ -dimetyl-acetyl; R<sub>2</sub>-t a következő csoportból választjuk ki: C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> egyenesláncú acilcsoport, vagy hiányzik; R<sub>3</sub>-at a következő csoportból választjuk ki: Gly-OH- vagy NH<sub>2</sub>-csoport; és Xaa jelentése a jelen találmányban Lys vagy Arg lehet.

A "DPP-IV védett GLP-k" olyan GLP-1 analógokra vonatkoznak, melyek a DPP-IV hatásával szemben ellenállók. Ezek közé a 8. helyzetű módosított vagy D-aminosavak tartoznak. Itt olyan bioszintetikus GLP-1 analógokat is értünk, melyek Gly-vel rendelkeznek vagy a 8. helyzetben Val, Thr, Met, Ser, Cys vagy Asp aminosavmaradék található. A további DPP-IV védett GLP-k közé a dez-amino-His<sup>7</sup> származékok tartoznak.

A "GLP-1 peptid analógokat" olyan GLP-1 analógokként vagy származékokként határoztuk meg, amelyek acilezett formákat nem tartalmaznak.

A "bioszintetikus GLP-1 analógok" bármely olyan GLP-1 analógok vagy származékok, melyek csak egy természetben előforduló aminosavat tartalmaznak, és így az élő sejtek expresszálasukra képesek, beleértve a rekombináns sejteket és szervezeteiket.

A "kezelés" a betegség, állapot vagy rendellenesség leküzdésére szolgáló bánásmód vagy gondoskodás, mely a szimptomák vagy komplikációk megjelenésének megakadályozására, a szimptomák vagy komplikációk csökkentésére, a betegség, állapot vagy rendellenesség megszüntetésére a jelen találmány vegyületének alkalmazását tartalmazza. A cukorbetegség kezelése ezért magában foglalja a fiziológiásan kívánatos vérglükózszintek fenntartását az arra rászoruló betegben.

A jelen találmány lapos pálcika alakú vagy lemezes GLP kristályai, melyeket az igényként szereplő folyamat felhasználásával készítenek, bizonyos fokig méretben és alakban eltérnek egymástól. Általában, a méretük hozzávetőleg 2-25 X 10-150 mikrométer ( $\mu\text{m}$ ) és laposak, vastagságuk hozzávetőleg 0,5-5  $\mu\text{m}$ . Ezek az egyedi kristályok egyetlen magból alakulnak ki, és a szakirodalomból jól ismertekkel szemben nem tüskés csillagszerű csoportok.

Az itt közzétett szekvencia és a szilárdfázisú fehérjeszintézis szakirodalmának állása alapján a GLP-k kémiai szintézissel kaphatók meg. Ennek ellenére bizonyos GLP-k a proglukagon enzimikus fermentációjával, felhasználva a szakirodalom jól ismert technikáit, állíthatók elő. Továbbá a találmány szempontjából megfelelő GLP-k kifejezésére a jól ismert rekombináns DNS technikák is felhasználhatók.

A polipeptidek szilárdfázisú kémiai szintézisének alapjai a szakirodalomban jól ismertek, és például erről olvashatunk a következő irodalmakban: [Dugas és Penney: Bioorganic



Chemistry, Springer-Verlag, New York, 54-92 (1981); Merrifield: J.M., Chem. Soc., 85, 2149 (1962); és Stewart és Young: Solid Phase Peptide Synthesis, Freeman (San Francisco) 24-66 (1969)].

A molekuláris biológia is abban a helyzetben van, hogy az általános szakmai képességekkel rendelkező szakemberek számára eszközt biztosít, mellyel a GLP-k megkapható. Bár a GLP-k szilárdfázisú peptidszintézissel, rekombináns módszerekkel vagy a glukagon fragmentálásával előállíthatók, mégis a GLP-1 analógok bioszintetikus előállításában a rekombináns eljárások előnyösek, mivel ezzel igen jó kitermelés várható.

A jelen találmány céljainak megfelelően, a GLP-1 peptidanalógokat és a bioszintetikus GLP-1 peptidanalógokat részesítjük előnyben. Előnyösebbek a DPP-IV védett GLP-k. Igen előnyösek a bioszintetikusan előállított GLP-1 peptidanalógok. A GLP-1 peptidanalógok egy másik előnyben részesített csoportja a 8. helyzetben egyetlen aminosav helyettesítéssel rendelkezik melyek D- és módosított aminosavakból állhatnak. A bioszintetikus GLP-1 peptidanalógok igen előnyös formái közé azok tartoznak, melyek a 8. helyzetben egyetlen aminosav helyettesítést tartalmaznak, előnyösebben azok, amelyek glicint tartalmaznak, vagy amelyek a 8. helyzetben Val, Thr vagy Met aminosavak közül az egyiket tartalmazzák.

A jelen találmány az egyedi tetragonális pálcika alakú GLP kristályok anyalúgból történő előállítási folyamatát biztosítja. Az alacsonytól a neutrális pH-tartományig, körülbelül pH 6-7 között, előnyösen körülbelül  $6,4 \pm 0,2$ -nél a kristályosítási oldat, vagy

anyalúg, végkoncentrációban körülbelül 1-10 mg/ml, előnyösen 2-7 mg/ml GLP-t tartalmaz.

A találmány gyakorlatában számos hagyományos alkoholt vagy mono- vagy diszacharidot tartalmazó pufferoldat felel meg. Előnyben részesítjük a 10 - 50 mM-os TRISZ-t, ammónium-acetátot, nátrium-acetátot vagy bisz-TRISZt. Az alkohol koncentrációja körülbelül 2-15 térfogat%, előnyösen 3-13 %. Az előnyben részesített alkoholokat a következő csoportból választjuk ki: metanol, etanol, propanol vagy glicerin, az etanolt a legjobban preferált.

Szabadon megválaszthatóan, a kristályok kitermelésének növelése érdekében az anyalúghoz általában további hozzávetőleg 1 vegyes% ammónium-szulfátot adunk. A szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a bakteriális növekedés megakadályozására az anyalúghoz például nátrium-azid tartósítósó hozzáadása előnyös.

Egy másik megvalósítási formában az alkohol azonos tömeg/térfogat arányban mono- vagy diszacharidokkal helyettesíthető. A jelen találmányban használható alkalmas mono- vagy diszacharidok közé a következők tartoznak: trehalóz, mannit, glükóz, eritróz, ribóz, galaktóz, fruktóz, maltóz, szukróz, és laktóz, bár a trehalózt részesítjük előnyben.

A jelen találmány még egy másik megvalósítási formájában a folyamatot neutrális vagy magas pH-n hajtjuk végre, ahol a cinket tartalmazó környezet pH-ja körülbelül 7 és 10 között van előnyösen a pH körülbelül 7,2-9,7 értéket vesz fel. Ilyen körül-

mények között a GLP koncentrációja hozzávetőleg 1-20 mg/ml, előnyösen körülbelül 2-10 mg/ml. A teljes cink mennyisége a GLP moláris mennyiségéhez viszonyítva körülbelül 0,5 - 1,7, előnyösen 0,6 - 1,5 tartományban van.

Az ilyen neutrális vagy magas pH-n a cinkkel együtt alkalmazható pufferek és sók koncentrációi a glicinre nézve körülbelül 10-100 mM és az NaCl-re nézve 0-200 mM tartományban vannak, előnyösen a pufferek 40-60 mM glicint és 0-150 mM NaCl-t tartalmaznak. Az előnyben részesített pufferek a glicin, az aszparaginsav és a TRISZ. Az alkohol vagy a cukor koncentrációit ilyen körülmények között már az előzőekben megadtuk.

Az anyalúgot elkészülte után a 12-48 órás kristályosítás alatt hozzávetőleg 15-37 °C-on tartjuk, előnyösen a kristályosítást körülbelül 18-25 °C-on végezzük. A kristályokat ezután áthelyezhetjük vagy más módon kezelhetjük anélkül, hogy a kristály morfológiájában bármilyen észrevehető károsító hatás bekövetkezne, ami arra utal, hogy az ilyen kristályokat strukturális sérülés nélkül hosszabb ideig tárolhatjuk.

Egy másik megvalósítási formában a gyógyszerészeti kiszereelés gyógyszerészetileg elfogadható kötőanyag, hordozó, tartósító és hígító hozzáadásával úgy készíthető el, hogy miután a kristályok kialakultak, a fentieket közvetlenül az anyalúghoz adjuk. Ebben a megvalósítási formában a kristályosítást és az ezt követő hozzáadásokat steril körülmények között végezzük. A cink kristályokba történő beépülésének elősegítésére a cink közvetlenül az anyalúghoz adható. Az azonos tárolóedényből megvalósítható

többszörös injektáláshoz a kristályos kisserelések biztosítására az anyalúghoz tartósító szerek adhatók. Miután a kristályok kialakultak, más adalékanyagok, mint például antioxidánsok, pufferek, a pH beállításához savak és lúgok, ionerősséget biztosító szerek és hasonlóak szintén közvetlenül az anyalúghoz adhatók.

Egy másik megvalósítási formában a találmány egyedi tetragonális lapos pálcika alakú vagy lemezes GLP kristályok homogén összetételeit biztosítja. Az itt közzétett és igénypontokban megjelölt folyamatok kidolgozása előtt ilyen összetételeket nem tudtak létrehozni. A találmány összetételei a gyártási folyamatokban és az időben megnyújtott hatású gyógyszerészeti kisserelések előállításában fontosak, melyek a cukorbetegség, a kövérség és az ezekkel rokon állapotok kezelésére vagy megelőzésére szolgálnak.

Az igényként szereplő GLP kristályok és összetételek szabadon megválaszthatóan hagyományos kristály átítási technikák felhasználásával cinkkel kezelhetők. Az átítás során a kristályok körülbelül egy 0,5 mg/ml-es cinkoldatban kristálykomplexekké alakulnak, ami a GLP beadás megnyújtott hatástartamának kialakítására szolgál. Ezen felül, a cink koncentrációjának változtatásával a komplex összetétele is megváltoztatható, mely így hosszabb vagy rövidebb hatástartamú lehet.

Ahogy azt jeleztük a találmány olyan gyógyszerészeti kissereléseket biztosít, amelyek egyedi tetragonális lapos pálcika alakú vagy lemezes GLP kristályokból és további, egy vagy több,

gyógyszerészetileg elfogadható hígítóból, hordozóból vagy kötőanyagból állnak. A cukorbetegség, a kövérség vagy rokon állapotok terápiás vagy megelőző kezeléséhez a kristályok a parenterális beadáshoz kiszerezhetők. Például a jelen találmány kristályai hagyományos gyógyszerészeti hordozókkal és kötőanyagokkal összekeverhetők. Az igényként szereplő kristályokat tartalmazó kiszerezések körülbelül 0,5 - 50 mg/ml aktív GLP-t és előnyösen körülbelül 1,0 - 10 mg/ml aktív GLP-t tartalmaznak. Továbbá, a jelen találmány kristályai magukban vagy más antidiabetikus szerrel együtt kombinációban is beadhatók. A szubkután vagy intramuszkuláris készítményeknél a jelen találmány kristályainak steril kiszerezése szuszpenzióban, az eredeti vagy módosított kristályosítási anyalúgban, vagy gyógyszerészeti hígítóban, mint például pirogénmentes desztillált vízben, fiziológiás oldatban vagy 5 %-os glükóz oldatban, beadható. A jelen találmány alkalmas kiszerezése szuszpenzióként egy vizes bázisban vagy egy gyógyszerészetileg elfogadható olajos bázisban, például a hosszúláncú zsírsavak észtereiben, mint például etil-oleátban, elkészíthető.

A többszöri használat megvalósításához az előnyben részesített gyógyszerészetileg elfogadható tartósító szerek a következők: alkilparaben, különösen metilparaben, etilparaben, propilparaben vagy butilparaben vagy klórbutanol, fenol vagy meta-krezol. A kiszerezések ionerősséget biztosító szert is tartalmazhatnak, melyek fiziológiásan tolerálhatók és a kiszerezésnek megfelelő ionerősséget adnak, ezzel a víz

sejtmembránokon át történő nettó áramlását megakadályozzák. Ilyen célokra, ismert koncentrációkban, általában például glicerint használunk. A további ionerősséget biztosító szerek közé a sók, például NaCl, a dextróz, a mannit és a laktóz tartoznak. Izotóniás szerként a glicerint részesítjük előnyben. Parenterális kiszerezéseknél az izotóniás szer koncentrációtartománya a szakirodalomból ismert, és a glicerint előnyösen körülbelül 16 mg/ml és körülbelül 25 mg/ml között használják.

A kívánt szintű pH szabályozásához a kiszérés gyógyszerészetileg elfogadható puffert is tartalmazhat. A pH-nak ideálisan a betegbe történő beadásakor elfogadhatónak kell lennie, de egyben a kiszérés mind fizikai, mind kémiai stabilitását is biztosítani kell. Előnyösen a pH-t a gyengén savanyú és a gyengén lúgos közé állítjuk be, például körülbelül pH 5 és pH 9 közé. Előnyösebben a pH körülbelül 6 és 8 között van. A pufferelő szerek közé, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők tartoznak: citrát, acetát, foszfát, TRISZ vagy bázisos aminosavak, mint például lizin vagy arginin, amelyek ezekben a pH-tartományokban közismerten gyógyszerészetileg elfogadhatók. A további gyógyszerészetileg elfogadható pufferek pufferelési pH-tartományai a szakirodalomban ismertek. A puffer megválasztása és koncentrációja a szakirodalomban jártas szakemberek számára ismert.

### 1. Példa

pH = 6,4 1,0 % ammónium-szulfáttal

12,5 mg kémiailag szintetizált GLP-1(7-37)OH analógot, mely a 8. helyzetében lévő Ala helyett Val-lal helyettesített (V8-GLP-1), egy 3,0 ml-es üvegfiolába mértünk és 2,0 ml 10 mM TRISZ-HCl-t és 0,02 %  $\text{NaN}_3$ -at tartalmazó oldatban felvettünk, pH = 6,4, így egy tiszta pH = 3,6-es oldatot kaptunk. Az oldat pH-ját 2 mol/l NaOH-val 8,7-re állítottuk és ezután 1 mol/l HCl-lel a pH-t 6,4-re csökkentettük. A pH állítások alatt az oldat tiszta maradt. Az oldatot 0,22 mikronos Millex GV13 fecskendőszűrőn (Millipore, Bedford MA) keresztül egy új 3,0 ml-es üvegfiolába szűrtük. A V8-GLP-1 törzsoldat koncentrációja 4,76 mg/ml volt, ahogy azt 280 nm-en mért abszorbanciájával meghatároztuk, melyhez felhasználtuk az 1,0 mg/ml V8-GLP-1 oldat extinkciós koefficiensét, ami egy 1 cm-es cellában 2,015. A V8-GLP-1 törzsoldatból 0,25 ml-t egy 2,0 ml-es üvegfiolába átraktunk. Ehhez az oldathoz 2,0 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -et tartalmazó 0,25 ml 10 mM TRISZ-HCl - 0,02 %  $\text{NaN}_3$  puffert (pH = 6,4) adtunk. A fiolát lezártuk, gyengén forgattuk és ezután 18 °C-ra helyeztük. A kristályos csoportokat 200-szoros nagyításnál 36 óra után figyelhettük meg. A mennyiségi meghatározáshoz az anyalúg egy részét eltávolítottuk és 16000 g-vel centrifugáltuk. A tisztán maradó felülúszóban a V8-GLP-1 tartalmat a fentiekben leírtaknak megfelelően 280 nm-es abszorbancia méréssel határoztuk meg. A kristálykitermelés mértékét úgy határoztuk meg, hogy a kiindulási oldatban lévő V8-GLP-1 mennyiségéből a

felülúszóban talált V8-GLP-1 mennyiségét kivontuk. Ebben a mintában a kristályok kitermelési szintje 63,9 %-nak adódott.

## 2. Példa

pH = 6,4 1 % etanollal és 1,0 % ammónium-szulfáttal

A V8-GLP-1 törzsoldatából az 1. példában leírtaknak megfelelően 0,25 ml-t egy 2,0 ml-es üvegfiolába tettünk. Ehhez az oldathoz 2,0 %  $(\text{NH})_4\text{SO}_4$ -et és 2,0 % etanolt tartalmazó 0,25 ml 10 mM TRISZ-HCl - 0,02 %  $\text{NaN}_3$  puffert (pH = 6,4) adtunk. Az oldatot ezután az 1. példában leírtaknak megfelelően kezeltük és értékeltük. Ebben a mintában kristályos csoportok alakultak ki, valamint néhány tetragonális kristály. A kitermelés 73,1 %-os volt.

## 3. Példa

pH = 6,4 5 % etanollal és 1,0 % ammónium-szulfáttal

A V8-GLP-1 törzsoldatából az 1. példában leírtaknak megfelelően 0,25 ml-t egy 2,0 ml-es üvegfiolában tettünk. Ehhez az oldathoz 2,0 %  $(\text{NH})_4\text{SO}_4$ -et és 10,0 % etanol tartalmazó 0,25 ml 10 mM TRISZ-HCl - 0,02 %  $\text{NaN}_3$  puffert (pH = 6,4) adtunk. Az oldatot ezután az 1. példában leírtaknak megfelelően kezeltük és értékeltük. Ebben a mintában kristályos csoportok, egyedi tetragonális kristályok alakultak ki és néhány pálcát találtunk. A kitermelés 80,3 %-os volt.

## 4. Példa

pH = 6,4 10 % etanollal és 1,0 % ammónium-szulfáttal

A V8-GLP-1 törzsoldatából az 1. példában leírtaknak megfelelően 0,25 ml-t egy 2,0 ml-es üvegfiolában tettünk. Ehhez az oldathoz 2,0 %  $(\text{NH})_4\text{SO}_4$ -et és 20,0 % etanol tartalmazó 0,25 ml 10 mM TRISZ-HCl - 0,02 %  $\text{NaN}_3$  puffert (pH = 6,4) adtunk. Az oldatot ezután az 1. példában leírtaknak megfelelően kezeltük és értékeltük. Ebben a mintában egyedi tetragonális kristályok és pálcák alakultak ki. A kitermelés 81,9 %-os volt.

5. Példa

pH = 6,4 1 % etanollal

A V8-GLP-1 törzsoldatából az 1. példában leírtaknak megfelelően 0,25 ml-t egy 2,0 ml-es üvegfiolában tettünk. Ehhez az oldathoz 2,0 % etanol tartalmazó 0,25 ml 10 mM TRISZ-HCl - 0,02 %  $\text{NaN}_3$  puffert (pH = 6,4) adtunk. Az oldatot ezután az 1. példában leírtaknak megfelelően kezeltük és értékeltük. Ebben a mintában csak a kristályos csoportok nyomai képződtek. A kitermelés 8,8 %-os volt.

6. Példa:

pH = 6,4 5 % etanollal:

A V8-GLP-1 törzsoldatából az 1. példában leírtaknak megfelelően 0,25 ml-t egy 2,0 ml-es üvegfiolába tettünk. Ehhez az oldathoz 10,0 % etanol tartalmazó 0,25 ml 10 mM TRISZ-HCl - 0,02 %  $\text{NaN}_3$  puffert (pH = 6,4) adtunk. Az oldatot ezután az 1. példában leírtaknak megfelelően kezeltük és értékeltük. Ebben a

mintában kristályos csoportok, egyedi tetragonális kristályok és pálcák alakultak ki. A kitermelés 39,1 %-os volt.

### 7. Példa

#### pH = 6,4 10 % etanollal

A V8-GLP-1 törzsoldatából az 1. példában leírtaknak megfelelően 0,25 ml-t egy 2,0 ml-es üvegfiolában tettünk. Ehhez az oldathoz 20,0 % etanol tartalmazó 0,25 ml 10 mM TRISZ-HCl - 0,02 % NaN<sub>3</sub> puffert (pH = 6,4) adtunk. Az oldatot ezután az 1. példában leírtaknak megfelelően kezeltük és értékeltük. Ebben a mintában egyedi tetragonális kristályok és pálcák alakultak ki. A kitermelés 55,5 %-os volt.

### 8. Példa

#### Farmakokinetika

28 mg bioszintetikusán előállított V8-GLP-1-et üvegfiolába mértünk és 4,5 ml 10 mM NH<sub>4</sub>OAc-ban diszpergáltuk, így egy zavaros oldatot kaptunk, melynek pH-ja 5,6 volt. A pH 5 mol/l nátrium-hidroxiddal 9,5-re történő állításával az anyagot teljesen feloldottuk és miután a pH-t 2 mol/l HCl-lel 6,4-re csökkentettük teljesen oldható maradt. Ezt az oldatot 0,22 mikronos Millex GV13 fecskedőszűrővel új üvegfiolába szűrtük, melynek vég-térfogata 4,3 ml volt. A V8-GLP-1 oldat koncentrációját úgy határoztuk meg, hogy a törzsoldatból készített 20-szoros hígítás abszorbanciáját 280 nm-en mértük, ami 5,51 mg/ml-nek adódott, ehhez felhasználtuk az 1,0 mg/ml V8-GLP-1 oldat extinkciós koefficiensét, mely egy 1 cm-es cellában 2,015. Ehhez az oldathoz 4,3 ml következő összetételű kicsapó oldatot adtunk: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc, 2,0 % (NH)<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 20 % etanol, pH = 6,4. A fiolát

lezártuk, gyengén forgattuk és ezután 18 °C-ra helyeztük. A tetragonális kristályokat 200-szoros nagyításnál 72 óra után figyelhetjük meg. A kristályokat az anyalúgból alacsony fordulatszámú centrifugálással különítettük el és a következő összetételű A-pufferben körülbelül 4,0 mg/ml-es koncentrációban újra felvettük: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc, 16 mg/ml glicerin, pH = 5,5. Az anyalúg egy részét 16000 g-vel centrifugáltuk. A tisztán maradó felülúszóban a V8-GLP-1 tartalmat 280 nm-es abszorbancia méréssel határoztuk meg. A kristálykitermelés mértékét úgy határoztuk meg, hogy a kiindulási oldatban lévő V8-GLP-1 mennyiségéből a felülúszóban talált V8-GLP-1 mennyiségét kivontuk. Ebben a mintában a kristályok kitermelési szintje 83,0 %-nak adódott.

Öt üvegfiolába a fentieknek megfelelően készített V8-GLP-1 kristályok 4,0 mg/ml-es szuszpenziójából előre meghatározott alikvótokat tettünk és a végkoncentrációt az A-pufferrel a 2,5 mg/ml V8-GLP-1 koncentrációnál kissé magasabbra állítottuk. A kristályos szuszpenziókhoz a ZnCl<sub>2</sub> törzsoldat (A-pufferben 33,4 mg/ml Zn<sup>++</sup>) alikvótjait úgy adtuk, hogy a cink koncentrációk sorra 0,5, 1,0, 1,5, vagy 2,4 mg/ml legyenek. A szuszpenziókat gyengén forgattuk és 18 órára 5 °C-ra helyeztük. Ennek megfelelően az egyes fiolákban a V8-GLP-1 végkoncentrációk 2,5 mg/ml-nek feleltek meg. 18 óra után a kristályos V8-GLP-1 cink szuszpenziókat szobahőmérsékletre helyeztük, 30-as tűn átengedtük, és a pH-t 1 N NaOH-dal 6,0-ra állítottuk.

A 0,1 mg/ml cink-kristályos V8-GLP-1 szuszpenziót úgy készítettük el, hogy először a 2,5 mg/ml-es kristályos szuszpenziót

a fentiekben leírtaknak megfelelően 0,15 mg/ml cinkkel kezeltük. Az 5 °C-on végzett 18 órás inkubálás után a cinkkel kezelt kristályokat alacsony fordulatszámú centrifugálással izoláltuk és átraktuk a B-pufferbe (0,1 mg/ml cinket tartalmazó A puffer). E szuszpenzió V8-GLP-1 végkoncentrációját 2,5 mg/ml-re állítottuk a B-puffer segítségével. A szuszpenziókat 30-as tűn átengedtük, és a pH-t 1 N NaOH-dal 6,0-ra állítottuk.

A fentiekben leírt öt kristályos V8-GLP-1 cink szuszpenziót, melyek mindegyikében 2,5 mg/ml V8-GLP-1 volt és az egyes fiolák 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, vagy 2,4 mg/ml cinket tartalmaztak, egy éjszakán át éheztetett beagle kutyákban teszteltük. Mindegyik állat a 0. órában egyszeri szubkután injekcióban 24 nmol/kg kristályos V8-GLP-1 cink szuszpenziót kapott. Az állatokból az artériás vérmintákat (1,5 ml) előre meghatározott időpontokban vettük le, EDTA-val előkezelt és 40 µl Trasyol-t tartalmazó csövekbe áthelyeztük, és ezután centrifugáltuk. Mindegyik minta plazma részét elkülönítettük, és ezeket az analízis megkezdéséig -80 °C-on tároltuk. Mindegyik minta V8-GLP-1 immunreaktív plazma-koncentrációját RIA-val megmértük. A szuszpenziók különböző időpontokban mért immunoreaktív V8-GLP-1 plazma-koncentrációit az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. Táblázat:

A kutya vérplazmában lévő immunreaktív V8-GLP-1 szintek (pikomólban):

Idő (óra)	0,1 mg/ml cink (n = 5)		0,5 mg/ml cink (n = 5)		1,0 mg/ml cink (n = 3)		1,5 mg/ml cink (n = 5)		2,4 mg/ml cink (n = 5)	
	V8-GLP-1 (pM)	SEM	V8-GLP-1 (pM)	SEM	V8-GLP-1 (pM)	SEM	V8-GLP-1 (pM)	SEM	V8-GLP-1 (pM)	SEM
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,5	nd	nd	123	41	27	4	7	5	5	5
3,0	nd	nd	132	38	38	7	40	13	27	21
4,5	nd	nd	196	51	108	41	76	34	83	37
6,0	301	57	264	79	140	55	142	47	143	60
7,5	nd	nd	265	71	184	57	198	61	179	63
9,0	nd	nd	344	94	220	61	252	64	214	66

## 1. Táblázat:

A kutya vérplazmában lévő immunreaktív V8-GLP-1 szintek (pikomólban):

	0,1 mg/ml cink (n = 5)	0,5 mg/ml cink (n = 5)	1,0 mg/ml cink (n = 3)	1,5 mg/ml cink (n = 5)	2,4 mg/ml cink (n = 5)
10,5	nd	302	231	250	225
12,0	nd	282	236	267	238
13,5	nd	238	241	286	236
15,0	nd	263	273	325	246
16,5	nd	235	234	275	218
18,0	nd	210	184	254	211
19,5	nd	221	209	278	173
21,0	nd	215	219	301	178
22,5	nd	224	193	232	167
24,0	190	210	187	227	166
30,0	nd	nd	nd	nd	171

SEM = a standard hiba átlaga; nd = nem mértük

## 9. Példa

### pH = 9,4 5 % trehalózzal és cinkkel

6,8 mg liofilezett bioszintetikus V8-GLP-1-et 3,0 ml-es üvegfiolába mértünk. Ezután a peptidet feloldása érdekében 1,0 ml 25 mM glicin-HCl-t, 150 mM NaCl-t, 5 % trehalózt tartalmazó puffert, pH = 9,0, adtunk hozzá. Az oldatot ezután 5 mol/l NaOH-dal pH = 10,3-re állítottuk. Miközben az oldatot gyengén kevertük, vízben oldott 9,0 µl 10 mg/ml cink-klorid oldatot adtunk hozzá és a pH-t 2 mol/l HCl-lel 9,4-re állítottuk. A V8-GLP-1 végkoncentrációja 5,4 mg/ml volt, amit az oldat 10-szeres hígításából 280 nm-en mérve határoztunk meg. Az oldatot 0,22 mikronos Millex GV13 fecskendőszűrőn (Millipore, Bedford MA) keresztül szűrtük. A fiolát bedugaszoltuk, gyengén forgattuk és ezután környezeti hőmérsékletre helyeztük. A V8-GLP-1 kristálycsoportokat és a négyszögletes kristályokat 430-szoros nagyításnál 24 óra után figyelhettük meg, ezeket körülbelül 40 mikron hosszúnak, 15 mikron szélesnek és 3 mikron vastagnak becsültük. Az anyalúg egy részét eltávolítottuk és 16000 g-vel centrifugáltuk. A tisztán maradó felülúszóban a V8-GLP-1 tartalmat 280 nm-es abszorbancia méréssel meghatároztuk. A kristálykitermelés mértékét úgy határoztuk meg, hogy a kiindulási oldatban lévő V8-GLP-1 mennyiségéből a felülúszóban talált V8-GLP-1 mennyiségét kivontuk. Ebben a mintában a kristályok kitermelési szintje 89,8 %-nak adódott. A trehalóz nél-

küli kristályosításkor kis négyszögletes kristályokat nem tudtunk megfigyelni.

#### 10. Példa

##### pH = 9,4 10 % mannittal és cinkkel

6,8 mg liofilezett bioszintetikus V8-GLP-1-et 3,0 ml-es üvegfialába mértünk, majd 1,0 ml következő összetételű pufferben vettük fel: 25 mM glicin-HCl, 150 mM NaCl, 10 % mannit, pH = 9,0, és a tiszta oldat kialakításához diszpergáltuk. Az oldatot ezután 5 mol/l NaOH-dal pH = 10,3-ra állítottuk. Miközben az oldatot gyengén kevertük, vízben oldott 9,0 µl 10 mg/ml cink-klorid oldatot adtunk hozzá és a pH-t 2 mol/l HCl-lel 9,4-re állítottuk. A V8-GLP-1 végkoncentrációja 5,31 mg/ml volt, amit a kristályosítási oldat 10-szeres hígításából 280 nm-en mérve határoztunk meg. Az oldatot ezután 0,22 mikronos Millex GV13 fecskendőszűrőn szűrtük. A fiolát bedugaszoltuk, gyengén forgattuk és ezután környezeti hőmérsékletre helyeztük. A V8-GLP-1 kis négyszögletes, lemezes kristályokat 430-szoros nagyításnál 24 óra után figyelhettük meg, ezeket körülbelül 10-30 mikron hosszúnak és 10 mikron szélesnek becsültük. A kitermelést a 9. példában leírtaknak megfelelően határoztuk meg. Ebben a mintában a kristályok kitermelési szintje 35 %-nak adódott.

#### 11. Példa

##### pH = 9,0 cinkkel



A V8-GLP-1 oldat 1,0 ml-es alikvótját 3 mg/ml koncentrációban a következő összetételű pufferben készítettük el: 50 mM glicin, 150 mM NaCl, pH = 9,0. Ehhez az oldathoz vízben oldott 7,5  $\mu$ l 20,85 mg/ml cink-klorid oldatot adtunk, majd a pH-t 9,0-re visszaállítottuk. Gyenge keverés után a tiszta mintát egy 3 ml-es üvegfiolában környezeti hőmérsékleten egy napig tároltuk. Ezután a kristályos precipitátumot 90-szeres nagyítással mikroszkóp alatt megvizsgálva kis lemezeket figyelhettünk meg. A kristályosodás mértékének megállapítására a teljes szuszpenziót 0,2  $\mu$ m szűrőn (Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan) engedték át. A tiszta szűrletben lévő V8-GLP-1 tartalmat 280 nm-es hullámhosszon spektroszkópiásan mennyiségileg meghatároztuk, felhasználva az 1,0 mg/ml V8-GLP-1 oldat extinkciós koefficiensét, mely egy 1 cm-es cellában 2,015. A kristálykitermelés mértékét úgy határoztuk meg, hogy a kiindulási oldatban lévő V8-GLP-1 mennyiségéből a felülúszóban talált V8-GLP-1 mennyiségét kivontuk. Ebben a mintában a kristályok kitermelési szintje 5,6 %-nak adódott.

## 12. Példa

### pH = 9,0 10 % etanollal és cinkkel

A V8-GLP-1 oldat 1 ml-es alikvótját a 11. példában leírtaknak megfelelően elkészítettük, azzal az eltéréssel, hogy a cink-klorid oldat hozzáadása előtt az oldathoz 110  $\mu$ l abszolút etanolt adtunk. Ebben a példában néhány csoporton kívül nagy tetragonális kristályokat kaptunk, és a kitermelés 80,6 % volt.

### 13. Példa

#### pH = 9,5 10 % etanollal és cinkkel

Az 50 mM glicin-150 mM NaCl pufferben lévő (pH = 10,5) 10 mg/ml-es V8-GLP-1 oldatot steril 0,2 µm-es Acrodisc szűrőn (Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan) átengedtük. Az oldat 500 µl-éhez 500 µl 50 mM glicin-150 mM NaCl puffert adtunk (pH = 9,0). Ehhez az oldathoz 110 µl abszolút etanolt adtunk, majd vízben oldott 7,5 µl 20,85 mg/ml koncentrációjú cink-klorid oldatot. Az oldat pH-ját kis mennyiségű 1 mol/l HCl-lel 9,5-re állítottuk. Miután a fenti oldatot gyengén forgattuk, egy 3 ml-es üvegflióba zárva környezeti hőmérsékleten két napig tároltuk. A V8-GLP-1 egyedi kristályos lemezei legfeljebb 150 µm hosszúak, hozzávetőleg 25 µm vastagok és kevesebb mint 5 µm vastagok voltak, és a kitermelés 72 %-os volt.

### 14. Példa

#### pH = 7,9 8,5 % etanollal és cinkkel

A V8-GLP-1-et 4 mg/ml-es koncentrációban 50 mM glicin pufferben felvettük (pH = 9,5), majd 0,2 µm szűrőn (Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan) átengedtük. Az oldat 1 ml-éhez 100 µl abszolút etanolt adtunk és ezután 60 µl vízben készített 2,08 mg/ml-es koncentrációjú cink-klorid oldatot. Az oldat pH-ját kis mennyiségű 0,1 mol/l HCl-lel 8,0-ra állítottuk. Miután a fenti oldatot gyengén forgattuk egy 3 ml-es üvegflióba zárva környezeti hőmérsékleten két óráig tároltuk. A tiszta oldat pH-ját ezután kis mennyiségű 0,1 mol/l HCl-lel 7,86-ra állítottuk, majd

további két napig környezeti hőmérsékleten tároltuk. A mikroszkópos megfigyelés közepes méretű, egyedi tetragonális lemezeket és néhány csoportot mutatott. A tiszta felülúszóban maradó V8-GLP-1 tartalmat 280 nm-es hullámhosszon spektroszkópiásan mennyiségileg határoztuk meg, felhasználva az 1,0 mg/ml V8-GLP-1 oldat extinkciós koefficiensét, mely egy 1 cm-es cellában 2,015. A kristálykitermelés mértékét úgy határoztuk meg, hogy a kiindulási oldatban lévő V8-GLP-1 mennyiségéből a felülúszóban talált V8-GLP-1 mennyiségét kivontuk. Ebben a mintában a kristályok kitermelési szintje 92,4 %-nak adódott.

### 15. Példa

#### pH = 8,3 10,0 % etanollal és cinkkel

A V8-GLP-1-et 7 mg/ml-es koncentrációban 100 mM glicin pufferben felvettük (pH = 10,5), majd 0,2 µm szűrőn (Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan) átengedtük. Az oldat 0,5 ml-éhez 0,4 ml vizet adtunk. Ezután 100 µl etanolt adtunk hozzá, majd 6 µl vízben készített 20,86 mg/ml-es koncentrációjú cink-klorid oldatot. Az oldat pH-ját kis mennyiségű 0,1 N HCl-lel 8,33-ra állítottuk. Miután a fenti oldatot gyengén forgattuk egy 3 ml-es üvegfiolába zárva környezeti hőmérsékleten egy napig tároltuk. A mikroszkópos megfigyelés kis, egyedi tetragonális lemezeket és néhány csoportot mutatott. A tiszta felülúszóban maradó V8-GLP-1 tartalmat 280 nm-es hullámhosszon spektroszkópiásan mennyiségileg meghatároztuk, felhasználva az 1,0 mg/ml V8-

GLP-1 oldat extinkciós koefficiensét, mely egy 1 cm-es cellában 2,015. A kristálykitermelés mértékét úgy határoztuk meg, hogy a kiindulási oldatban lévő V8-GLP-1 mennyiségéből a felülúszóban talált V8-GLP-1 mennyiségét kivontuk. Ebben a mintában a kristályok kitermelési szintje 92,4 %-nak adódott.

#### 16. Példa

##### pH = 7,4 8,6 % etanollal és cinkkel

A V8-GLP-1-et 4 mg/ml-es koncentrációban 50 mM glicin pufferben felvettük (pH = 9,0), majd 0,2  $\mu$ m szűrőn (Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan) átengedtük. Az oldat 5 ml-éhez 500  $\mu$ l abszolút etanolt adtunk és ezután 300  $\mu$ l vízben készített 2,08 mg/ml-es koncentrációjú cink-klorid oldatot. Az oldat pH-ját kis mennyiségű 0,1 mol/l HCl-lel 7,40-ra állítottuk. Miután a fenti oldatot gyengén forgattuk egy 10 ml-es üvegfiolába zárva környezeti hőmérsékleten két napig tároltuk. A mikroszkópos megfigyelés közepes méretű, egyedi tetragonális kristályokat mutatott. A tiszta felülúszóban maradó V8-GLP-1 tartalmat 280 nm-es hullámhosszon spektroszkópiásan mennyiségileg meghatároztuk, felhasználva az 1,0 mg/ml V8-GLP-1 oldat extinkciós koefficiensét, mely egy 1 cm-es cellában 2,015. A kristálykitermelés mértékét úgy határoztuk meg, hogy a kiindulási oldatban lévő V8-GLP-1 mennyiségéből a felülúszóban talált V8-GLP-1 mennyiségét kivontuk. Ebben a mintában a kristályok kitermelési szintje 85,0 %-nak adódott.

## 17. Példa

### pH = 6,4 5 % etanollal és 1,0 % ammónium-szulfáttal

A V8-GLP-1-et (12,5 mg) egy 20 ml-es üvegfiolába mértük. 2,0 ml 150 mM NaCl-ot tartalmazó 10 mM ammónium-acetát puffert adtunk hozzá (pH = 6,4). A zavaros oldat pH-ját 5 mol/l NaOH oldattal 9,5-re állítottuk, így az kitisztult, majd 2 mol/l HCl-lel 6,4-re csökkentettük. A tiszta oldatot 0,22 µm-es Millex GV 13 fecskendőszűrőn (Millipore, Bedford, MA) egy új 20 ml-es üvegfiolába szűrtük. A V8-GLP-1 törzsoldat koncentrációját 280 nm-es abszorbanciájából meghatároztuk, felhasználtuk ehhez az 1,0 mg/ml V8-GLP-1 oldat extinkciós koefficiensét, mely egy 1 cm-es cellában 2,015. A fehérje koncentrációját 5,0 mg/ml-re állítottuk. Elkészítettük a pH = 6,4-es precipitáló oldat, mely 10 mM ammónium-acetátot, 150 mM NaCl-ot, 2 % ammónium-szulfátot és 10 % etanolt tartalmazott, majd egy 0,22 µm Millex GV13 fecskendőszűrőn átszűrtük. A precipitáló oldat 2 ml-ét egy üvegfiolában lévő 2 ml V8-GLP-1 törzsoldathoz lassan hozzáadtuk. A fiolát gyengén forgattuk és szobahőmérsékleten két napig inkubáltuk. A megfigyelt tetragonális lemezes kristályok kitermelése 92 % volt.

A kristályos szuszpenzió pH-ját 1 mol/l HCl-lel 5,5-re állítottuk és 0,15 mg/ml végkoncentrációig cink-kloridot adtunk hozzá. Az egy éjszakán át szobahőmérsékleten végzett cinkes átítatás után a szuszpenzió pH-ját 1 mol/l NaOH-val 7,5-re állítottuk és tartósító szerként 3,16 mg/ml koncentrációban meta-krezolt adtunk hozzá. Ez a példa azt mutatja, ha



szükséges, akkor a GLP-1 kristályok tartósított kiserelése a gyógyszerészeti felhasználáshoz közvetlenül elkészíthetők anélkül, hogy a kristályok centrifugálásos vagy szűrési izolálását köztes lépésként be kellene iktatni.

### 18. Példa

pH = 7,6 8,5 % etanollal és cinkkel

A V8-GLP-1-et 4 mg/ml-es koncentrációban 50 mM glicin pufferben felvettük (pH = 9,0), majd 0,2 µm szűrőn (Acrodisc a Gelman Sciences-től, Ann Arbor, Michigan) átengedtük. Az oldat 10 ml-éhez 1 ml abszolút etanolt adtunk és ezután 600 µl vízben készített 6,7 mg/ml-es koncentrációjú cink-acetát (két-vizes) oldatot. A pH körülbelül 7,6-ra állítása érdekében 100 µl ecetsavat adtunk hozzá. Miután a fenti oldatot gyengén forgattuk, egy 20 ml-es üvegfiolába zárva környezeti hőmérsékleten 24 óráig tároltuk. A mikroszkópos megfigyelés közepes méretű, egyedi tetragonális kristályokat mutatott. A teljes oldathoz ezután 3,555 ml oldatot adtunk, mely 3,5 ml vízben elkészített 14 mg/ml koncentrációjú m-krezol és 55 µl 2 % ecetsavat tartalmazott, így az eredményül kapott szuszpenzió pH-ja körülbelül 7,2 volt. Miután a szuszpenziót gyengén forgattuk egy 20 ml-es üvegfiolába zárva környezeti hőmérsékleten 24 óráig tároltuk. A mikroszkópos megfigyelés ismételten közepes méretű, egyedi tetragonális kristályokat mutatott.

Egy alikvót 5 perces környezeti hőmérsékleten végzett centrifugálása után a tiszta felülúszóban megmaradó V8-GLP-1 tar-



talmát a hígított minták HPLC analízisével meghatároztuk és a V8-GLP-1 standard oldatainak HPLC mérésével összehasonlítottuk. A kristálykitermelés mértékét úgy határoztuk meg, hogy a kiindulási oldatban lévő V8-GLP-1 mennyiségéből a felülúszóban talált V8-GLP-1 mennyiségét kivontuk. Ebben a mintában a kristályok kitermelési szintje 97,7 %-nak adódott.

## 19. Példa

### A kristályok stabilitása

Az egyedi tetragonális V8-GLP-1 kristályokat 10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -t, 1 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -t, 10 % etanolt tartalmazó pufferben (pH = 6,4) 18 °C-on a 8. példában leírtaknak megfelelően elkészítettük. A kristályokat az anyalúgból alacsony fordulatszámú centrifugálással eltávolítottuk és a következő összetételű pufferben felvettük: 10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , 16 mg/ml glicerin (pH = 5,5), így a V8-GLP-1 koncentrációja körülbelül 4,9 mg/ml volt.

Ebből a szuszpenzióból 2 ml-t alacsony fordulatszámon centrifugáltunk és a felülúszót pipettával eltávolítottuk. Az üledéket 4 ml 10 mM ammónium-acetátot, 16 mg/ml glicerint, pH = 5,5, valamint 0,1 mg/ml cinket tartalmazó pufferben felvettük. Ezt a kristályos szuszpenziót cink oldatban egy éjszakán át 4 °C-on átitattuk.

A cinkkel átitatott kristályos szuszpenziót négy 1-ml-es alikvótra osztottuk. Ezeket a szuszpenziókat alacsony fordulatszámon centrifugáltuk és a felülúszókat pipettával eltávolítottuk. A négy kristályos szuszpenziót 10 mM ammónium-acetátot, 16

mg/ml glicerint, 0,1 mg/ml cinket tartalmazó pH = 6,0 pufferben készítettük el. A pH további állítását 7,4-re 0,1 mol/l NaOH és/vagy 3,16 mg/ml végkoncentrációjú meta-krezol hozzáadásával végeztük, így a 2. táblázatban bemutatott mintákat kaptuk. Mindegyik szuszpenziót két részre osztottuk, az egyik részt szobahőmérsékleten (körülbelül 22 °C), míg a másik részt 4 °C-on tároltuk, így kaptuk meg a 2. táblázatban bemutatott 9 tesztmintát.

10 nap elteltével a kristály-szuszenziókat mikroszkóppal vizsgáltuk meg. A szuszpenziók szűrletét a kristályos szuszpenziókban oldódó V8-GLP-1 mennyiségi meghatározásához HPLC-vel vizsgáltuk. A HPLC eredményekről a 2. táblázatban számoltunk be.

## 2. Táblázat

A kristályos szuszpenzióban lévő oldott V8-GLP-1 mennyisége 10 napos tárolás után

Minta	pH	Tárolási hőmérséklet	mg/ml meta-krezol	oldódott VS-GLP-1 HPLC-vel
A	6,0	4 °C	0	0,19 %
B	7,4	4 °C	0	0,10 %
C	6,0	4 °C	3,16	0,05 %
D	7,4	4 °C	3,16	0,06 %
E	6,0	22 °C	0	0,16
F	7,4	22 °C	0	0,08 %
G	6,0	22 °C	3,16	0,03 %
H	7,4	22 °C	3,16	0,04 %

Ez a kísérlet azt mutatja, hogy 10 nap alatt mind az eltett (4 °C), mind a szobahőmérsékleten tárolt (22 °C) kristályos kiszerezésekben a V8-GLP-1 peptid kevesebb mint 0,2 %-a oldódott be.

Mikroszkopikusan a kristályos szuszpenzióknál az egyedi vagy tetragonális agglomerációkból vagy összetapadásokból kevesebbet találtunk pH = 7,4-en mint pH = 6,0-en , és 4 °C-on kevesebbet mint 22 °C-on. Láthatóan a meta-krezol a kristályok agglomerációjára jelentősen nem hat. A további vizsgálatok azt mutatták, hogy több mint 3 % etanol jelenlétében a kristályos szuszpenzióban, akár az eredeti kristályosítási anyalúgból, akár a rákövetkező hozzáadásokból, a kristályok összetapadási kézsége nagymértékben csökkent mind a tartósított, mind a nem tartósi-



tott kizserelésekben. A további vizsgálatok felfedték, hogy a meta-krezol jelenlétében a kristályok viszonylag stabilabbak mint az 5 % fenol jelenlétében, melyben lassan amorf anyaggá alakulnak.

A további kristálystabilitási vizsgálatok azt mutatták, hogy a pH = 6,4-en készített V8-GLP-1 kristályok kémiaailag nagyon stabilisak, 5 °C-on vagy szobahőmérsékleten két hónapos tárolás után HPLC analízissel lebomlási csúcsokat nem tudtunk megfigyelni.

A glicinpufferben készített kristályok stabilitási tesztje, melyet a 16. példában írtunk le, azt mutatta, hogy az eredeti anyagban tárolt V8-GLP-1 kristályok nem voltak stabilak, ha a meta-krezolt 3,16 mg/ml koncentrációban alkalmazzuk. Ez a vizsgálat a kristályok feloldását mutatta már egynapos tárolás után is. Ebben az összetételben a kristályos instabilitása cink adásával (azaz cink-klorid oldattal) hatásosan blokkolható a tartósító hozzáadása előtt.

Az alábbiakban ismertetjük a leírásban említett szekvenciákat.

#### A SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE

<110> Eli Lilly and Company

<120> Glukagonszerű peptid-1 kristályok

<130> X-10242 PCT

<140> PCT/US98/26480

<141> 1998-12-14

<150> US 60/069728

<151> 1997-12-16

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

HisAlaGluGlyThrPheThrSerAspValSerSerTyrLeuGluGly

1            5            10            15

GlnAlaAlaLysGluPheIleAlaTrpLeuValLysGlyArgGly

          20            25            30

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: szintetikusan mutált humán szekvencia.

<220>

<223> A 13. helyzetben Xaa jelentése Glu, Gln, Ala, Thr, Ser vagy Gly; a 19. helyzetben Xaa jelentése Glu, Gln, Ala, Thr, Ser vagy Gly; és a 29. helyzetben Xaa jelentése Gly vagy hiányzik.

<400> 2

GluGlyThrPheThrSerAspValSerSerTyrLeuXaaGlyGlnAla

1            5            10            15

AlaLysXaaPheIleAlaTrpLeuValLysGlyArgXaa

          20            25

<210> 3

<211> 29

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: szintetikus mutált humán szekvencia.

<220>

<223> A 28. helyzetben az Xaa jelentése Lys vagy hiányzik; a 29. helyzetben az Xaa jelentése Gly vagy hiányzik; és ha Xaa a 28. helyzetben hiányzik, akkor az Xaa a 29. helyzetben szintén hiányzik.

<400> 3

HisAlaGluGlyThrPheThrSerAspValSerSerTyrLeuGluGly

1            5            10            15

GlnAlaAlaLysGluPheIleAlaTrpLeuValXaaXaa

          20            25

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: szintetikusan mutált humán szekvencia:

<220>

<223> A 19. helyzetben az Xaa jelentése Lys vagy Arg; a 30. helyzetben az Xaa jelentése Gly vagy hiányzik; és a 28. helyzetben a Lys acilezett lehet.

<400> 4

AlaGluGlyThrPheThrSerAspValSerSerTyrLeuGluGlyGln

1            5            10            15

AlaAlaXaaGluPheIleAlaTrpLeuValLysGlyArgXaa

20            25            30

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás glukagonszerű peptid-1 rokon molekulák (GLP) egyedi pálcika alakú vagy lemezes kristályainak előállítására, azzal jellemezve, hogy magában foglalja egy kristályosítási oldat elkészítését, amely GLP-t, pufferelő szert, alkoholt vagy mono- vagy diszacharidot és szabadon megválaszthatóan ammónium-szulfátot vagy cinket tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a GLP végkoncentrációja körülbelül 1-10 mg/ml és a következőket tartalmazó csoportból választjuk ki: GLP-1 analóg, GLP-1 származék, dipeptidil-peptidáz-IV (DPP-IV) védett GLP, GLP-1 peptidanalóg, vagy egy bioszintetikus GLP-1 analóg, és ahol a pufferelő szer körülbelül 10-50 mM és a pH körülbelül 6-7, és ahol a puffert a következő csoportból választjuk ki: TRISZ, ammónium-acetát, nátrium-acetát vagy bisz-TRISZ, és ahol az alkoholt vagy a mono- vagy diszacharidot a következő csoportból választjuk ki: metanol, etanol, propanol vagy glicerin, trehalóz, mannit, glükóz, eritróz, ribóz, galaktóz, fruktóz, maltóz, szukróz, és laktóz, és szabadon megválaszthatóan 1 % ammónium-szulfát lehet jelen.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a teljes cink mennyisége a GLP moláris mennyiségéhez viszonyítva körülbelül 0,5 - 1,7, ami végkoncentrációban 1-20 mg/ml-nek felel meg, és amelyet a következő csoportból választunk ki: GLP-1 analóg, GLP-1 származék, DPP-IV védett GLP, GLP-1

peptidanalóg, vagy egy bioszintetikus GLP-1 analóg, és ahol a pufferelő szer körülbelül 10-100 mM és a pH körülbelül 7-10, és ahol a puffert a következő csoportból választjuk ki: glicin, aszparaginsav vagy TRISZ, és ahol az alkoholt vagy a mono- vagy a diszacharidot a következő csoportból választjuk ki: metanol, etanol, propanol, glicerin, trehalóz, mannit, glükóz, eritróz, ribóz, galaktóz, fruktóz, maltóz, szukróz és laktóz.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a GLP-t a következőket tartalmazó csoportból választjuk ki: DPP-IV védett GLP vagy bioszintetikus GLP.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a GLP egy DPP-IV-védett GLP, melyet a következőket tartalmazó csoportból választunk ki: Val-8-GLP-1(7-37)OH, Thr-8-GLP-1(7-37)OH, Gly-8-GLP-1(7-37)OH vagy Met-8-GLP-1(7-37)OH.

6. Az 1-től az 5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy további lépésben a GLP kristályok cinktartalmú oldatban történő átítatási lépését tartalmazza.

7. Tetragonális lapos pálcika alakú vagy lemezes morfológiával rendelkező GLP kristályok, melyeket a következőket tartalmazó csoportból választunk ki: GLP-1 analóg, GLP-1 származék, DPP-IV védett GLP, GLP-1 peptidanalóg, vagy egy bioszintetikus GLP-1 analóg.

8. A 7. igénypont szerinti kristályok, ahol a GLP-t a következőket tartalmazó csoportból választjuk ki: DPP-IV védett GLP vagy bioszintetikus GLP.



17. Eljárás cukorbetegség, a kövérség vagy rokon állapotok kezelésére az arra rászoruló emlősben, azzal jellemezve, hogy a 7-10. igénypontok bármelyike szerinti GLP kristály szóban forgó emlősbe történő beadását tartalmazza.

18. Eljárás cukorbetegség, a kövérség vagy rokon állapotok kezelésére az arra rászoruló emlősben, azzal jellemezve, hogy a 11-14. igénypontok bármelyike szerinti összetétel szóban forgó emlősbe történő beadását tartalmazza.

19. Eljárás cukorbetegség, a kövérség vagy rokon állapotok kezelésére az arra rászoruló emlősben, azzal jellemezve, hogy a 15-16. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerészeti kiserelés szóban forgó emlősbe történő beadását tartalmazza.

20. A 7-10. igénypontok bármelyike szerinti GLP kristályok használata a cukorbetegség, a kövérség vagy rokon állapotok kezelésében.

21. A 11-14. igénypontok bármelyike szerinti GLP kristályok alapvetően homogén összetételének használata a cukorbetegség, a kövérség vagy rokon állapotok kezelésében.

22. A példák bármelyikére hivatkozó, itt alapjában leírt GLP kristály.

23. A példák bármelyikére hivatkozó, itt alapjában leírt GLP kristályok lényegileg homogén összetétele.

*45 oldal 7 példával*

*[Handwritten signature]*

*2001.02.07.*

ifj. Szentpéteri Ádám  
szabadalmi ügyvivő  
az EPO & Y. Nemzetközi  
szabadalmi Pro-Juris  
H-1062 Budapest, Andrássy út 117.  
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-923

*[Handwritten signature]*