

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 721 214**

②1 N° d'enregistrement national : **95 07094**

⑤1 Int Cl<sup>®</sup> : A 61 K 38/28

①2

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 14.06.95.

③0 Priorité : 16.06.94 US 260634.

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 22.12.95 Bulletin 95/51.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : ELI LILLY AND COMPANY — US.

⑦2 Inventeur(s) : Bakaysa Diane Lee, Brems David Nettleship, Frank Bruce Hill, Havel Henry Acken et Pekar Allen Howard.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Harle & Phelip.

⑤4 Formulations d'analogues de l'insuline.

⑤7 La présente invention révèle un complexe hexamère d'analogues de l'insuline humaine et des formulations de celui-ci. Plus spécifiquement, la présente invention concerne diverses formulations parentérales, qui comprennent: des analogues de l'insuline humaine dans une conformation hexamère, des ions de zinc et au moins trois molécules d'un dérivé phénolique choisi parmi le groupe constitué du m-crésol, du phénol ou d'un mélange de m-crésol et de phénol. La formulation fournit un départ rapide d'action.

**FR 2 721 214 - A1**



La présente invention concerne des analogues monomères de l'insuline humaine. Plus spécifiquement, la présente invention concerne un complexe hexamère comprenant un analogue de l'insuline, du zinc et un dérivé phénolique.

5 Depuis l'introduction de l'insuline dans les années 1920, des progrès continus ont été réalisés de manière à améliorer le traitement du diabète sucré. Des avancées majeures ont été réalisées du point de vue de la pureté de l'insuline de même que du point de vue de sa disponibilité. Différentes formulations avec des modes d'actions différents dans le temps ont également été développées. Malgré ces améliorations, la thérapeutique d'injection  
10 souscutanée ne réussit toujours pas à fournir au patient une régulation pratique et un contrôle normalisé de la glycémie. Les écarts fréquents des niveaux normaux de glycémie au cours de la vie d'un patient mènent à une hyperglycémie ou à une hypoglycémie, il y a des complications à long terme, y compris la rétinopathie, la neuropathie, la néphropathie et la micro- et la macroangiopathie.

15 Pour aider à éviter des niveaux glycémiques extrêmes, les personnes diabétiques pratiquent souvent une thérapeutique par injections multiples, l'insuline étant administrée après chaque repas. Cependant, cette thérapeutique n'a pas encore été optimisée. L'insuline présentant l'action la plus rapide qui est disponible dans le commerce présente son pic trop tard après l'injection et dure trop longtemps pour contrôler de manière  
20 optimale les taux de glucose. Récemment, un effort considérable a été consenti pour créer des formulations d'insuline et des formulations d'analogues de l'insuline qui altèrent la cinétique du procédé d'absorption souscutanée.

Puisque toutes les formulations pharmaceutiques commerciales de l'insuline contiennent l'insuline dans son état d'auto-association et surtout sous forme d'hexamère du  
25 zinc, on pense que l'étape limitative de la vitesse pour l'absorption de l'insuline à partir du dépôt d'injections souscutanées dans la circulation sanguine est la dissociation de l'hexamère auto-agrégé de l'insuline. Brange et coll. dans Diabetes Care 13 : 923 - 954 (1990). De façon à accélérer ce procédé d'absorption, des analogues monomères de l'insuline ont été développés. Ces analogues monomères présentent un départ d'activité  
30 relativement rapide par comparaison à l'insuline tout en maintenant l'activité biologique de l'insuline humaine native. Ils fournissent une absorption rapide de manière à ramener le

temps d'injection et l'action maximale de l'insuline plus près de l'écart du glucose après le repas en réponse à celui-ci. La préparation des différents analogues monomères est révélée dans Chance et coll., demande de brevet européen EP 0 383 472, et Brange et coll., demande de brevet européen EP 0 214 826.

5 Malheureusement, les modifications de l'insuline qui rendent ces analogues monomères, entraînent également un taux élevé de formation de polymères dans les formulations parentérales. Puisque l'expiration des préparations d'insuline se produit lorsque des taux de 1 % de polymères sont atteints (U.S. Pharmacopoeia, 1990), la minimisation de ce type de dégradation est extrêmement importante dans la réduction  
10 d'effets secondaires non-souhaitable. Pour cette raison, il était souhaitable de formuler les analogues monomères de telle manière à provoquer l'auto-association de l'analogue pour former une conformation stable, tout en maintenant son absorption rapide.

L'addition de certains ions métalliques, principalement du zinc, augmente la stabilité chimique en forçant l'insuline à s'associer et à former des hexamères,  
15 spécifiquement la conformation Zn(II) - T<sub>6</sub>. En outre, les composés phénoliques se sont avérés se lier spécifiquement à l'hexamère de l'insuline et d'induire un changement de conformation allostérique par lequel les huit acides aminés N-terminaux de la chaîne B sont convertis de la conformation étendue en hélice alpha. Derewenda et coll., Nature,  
338 : 594 - 596 (1989). Cet état de conformation lié à un composé phénolique est connu  
20 sous le nom d'état Zn(II)-R.

En contraste flagrant avec ces observations bien établies que l'insuline s'agrège facilement en présence de zinc pour former une structure hexamère de Zn stable bien définie, des études réalisées très tôt avec des analogues monomères de l'insuline ont révélé que toute agrégation entre le zinc et l'analogue de l'insuline est distincte de celle observée  
25 avec l'insuline. B. H. Frank, copies du texte et des diapositives de la conférence donnée à la Conference of Insulin "Self-Association and Conformational Studies on Human Proinsulin and Insulin Analogs", University of York, (29 août - 1 septembre 1989). En outre, le complexe Zn-hexamère très stable tel qu'il est observé avec l'insuline n'est pas observé avec les analogues monomères. Id. Brems et coll., Protein Engineering, 5 : 6,  
30 527 - 533 (1992), révèlent que la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI monomère est moins enclin à la dimérisation et à l'auto-association aux formes de poids moléculaires élevés que l'insuline

humaine. Brems et coll. continuent à conclure que la Asp<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI, Ala<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI, et la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI ne montrent que peu ou pas d'association induite par Zn et que la Pro<sup>B29</sup> insuline, la Lys<sup>B28</sup> insuline, l'Asp<sup>B28</sup> insuline et l'Ala<sup>B28</sup> insuline montrent une association induite par Zn, mais moins que la Zn-insuline. Des observations expérimentales ultérieures non-publiées par les présents inventeurs suggèrent que l'association avec le zinc est observée; cependant, une telle association entre l'analogue et le zinc diffère de celle de l'insuline. L'association qui est observée avec ces analogues est due pour la plupart à des formes de poids moléculaires plus élevés et elle est différente de celle des hexamères de la Zn-insuline prédominante et bien définie. Pour cette raison, il est clair que les analogues monomères de l'insuline ne forment pas la conformation Zn(II)-T<sub>6</sub> d'une manière analogue à l'insuline.

Après examen de la littérature publiée, il est surprenant que la présente invention fournisse des analogues monomères de l'insuline sous forme d'un complexe hexamère zinc-phénol stable et bien défini. Ce complexe hexamère présente un caractère unique et différent du complexe observé avec l'insuline dans des conditions identiques. Les complexes de l'insuline avec le zinc et le phénol se trouvent dans une conformation Zn(II)-R<sub>6</sub>. Le complexe hexamère de la présente invention n'est pas identique à cette conformation. De même de façon assez remarquable, le complexe hexamère d'analogue de l'insuline présente une tendance beaucoup plus grande à se dissocier que l'insuline. Cette tendance à la dissociation se traduit dans une propriété d'action rapide souhaitée.

Brange et coll. dans Current Opinion in Structural Biology 1 : 934 - 940 (1991) révèlent différents monomères stables de l'insuline à action rapide et ils affirment que la voie évidente pour créer une insuline à action rapide est d'empêcher la formation de dimères ou d'hexamères. De la même manière, Brange et coll. dans Diabetes Care 13 : 923 - 954 (1990) révèlent que lorsque l'insuline est administrée sous forme d'hexamères, outre sa diffusion libre plus lente, l'hexamère doit être plus empêché d'un point de vue stérique qu'un monomère pendant le transport par diffusion dans le tissu sous-cutané et/ou pendant son passage à travers la membrane capillaire. En outre lorsqu'elle est injectée par voie sous-cutanée, la conformation Zn(II)-R<sub>6</sub> ne se dissocie pas directement mais doit se transformer en passant par la conformation Zn(II)-T<sub>6</sub>. Ces changements de conformations et la dissociation de celles-ci retarde le départ de l'activité. Pour cette raison, l'homme de

métier au moment de la présente invention pensait que les efforts pour stabiliser de manière chimique l'analogue monomère de l'insuline avec du zinc en formant un complexe hexamère bien défini ne serait pas couronné de succès, ou s'ils étaient couronnés de succès, ils sacrifieraient le départ rapide d'action souhaitée.

5           La présente formulation est un complexe hexamère induit de type zinc-phénol qui est absorbé rapidement. Le taux d'absorption pour le complexe hexamère vaut au moins deux fois celui observé avec l'insuline. En outre, lorsque le complexe hexamère est formulé, il est tout aussi stable par comparaison à l'insuline contre la dégradation chimique. Pour cette raison, il est surprenant que la présente invention convertisse un analogue  
10 monomère de l'insuline en un complexe hexamère zinc-phénol stable bien défini. D'une manière étonnante, lorsqu'il est formulé, ce complexe hexamère conserve les propriétés d'action rapide associées à l'analogue monomère de l'insuline. Par conséquent, la présente invention fournit les formulations parentérales du complexe hexamère d'analogues de l'insuline qui est stable et qui présente une action rapide.

15           La présente invention fournit un complexe d'analogues de l'insuline humaine qui comprend : six molécules d'un analogue de l'insuline humaine, deux ions de zinc et au moins trois molécules d'un dérivé phénolique choisi parmi le groupe constitué du m-crésol, du phénol ou d'un mélange de m-crésol et de phénol; de telle façon que le complexe d'analogue est un hexamère. La présente invention fournit en outre des formulations  
20 parentérales comprenant le complexe hexamère.

La FIGURE 1 est une représentation graphique du profil d'action de la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI et de l'insuline humaine. Le graphe représente le taux moyen de réponse à l'infusion de glucose. La Figure démontre les avantages de la présente invention.

25           La FIGURE 2 est une représentation graphique de la stabilité de la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-insuline humaine. Le graphe représente la stabilité par la mesure de la formation de polymères de l'analogue de l'insuline dans l'association hexamère par comparaison à la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-insuline humaine monomère et à l'insuline. La Figure démontre les avantages de la présente invention.

30           La FIGURE 3 est une représentation graphique de la dissociation de la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-insuline humaine dans un complexe hexamère. Le graphe représente la dissociation in vitro de l'insuline formulée (O) ; la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI formulée sous forme

d'un complexe hexamère ( $\Delta$ ); l'insuline non-formulé ( $\square$ ); et la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI (\*) suivi par la diffraction statique de la lumière 488 nm à un angle de 90 °. Les échantillons formulés contenaient 0,5 mole de Zn par mole de protéines, avec 1,25 mg/ml de m-crésol et 1,09 mg/ml de phénol, 7 mM de phosphate de sodium et 16 mg/ml de glycérol. Les échantillons non-formulés et monomères ne contenaient pas d'excipients supplémentaires. La Figure démontre les avantages de la présente invention.

Tel que noté ci-dessus, l'invention fournit un complexe d'analogue de l'insuline humaine monomère sous forme hexamère. Les termes "analogue monomère de l'insuline" ou "analogue de l'insuline humaine" tels qu'ils sont utilisés ici représentent l'insuline humaine dans laquelle :

Pro à la position B28 est substituée par Asp, Lys, Leu, Val ou Ala; et Lys à la position B29 représente la lysine ou est substituée par la proline; dés(B28 - B30); ou dés(B27).

Les analogues monomères de l'insuline sont décrits dans Chance et coll., demande de brevet européen EP 0 383 472, et dans Brange et coll., demande de brevet européen EP 0 214 826, et sont introduits ici à titre de référence. Les analogues monomères de l'insuline ont moins tendance à la dimérisation ou à l'auto-association que l'insuline.

L'homme de métier admettrait que d'autres modifications sont possibles. Ces modifications sont largement acceptées dans le domaine et comprennent le remplacement du résidu d'histidine à la position B10 par l'acide aspartique; le remplacement du résidu de phénylalanine à la position B1 par l'acide aspartique; le remplacement du résidu thréonine à la position B30 par l'alanine; le remplacement du résidu de sérine à la position B9 par l'acide aspartique; la délétion des acides aminés à la position B1 seule ou en combinaison avec une délétion à la position B2; et la délétion de la thréonine de la position B30.

Toutes les abréviations d'acides aminés utilisées dans la présente révélation sont celles acceptées par l'office de brevet et de marques des États-Unis d'Amérique telles que présentées dans 37 C.F.R. § 1.822 (b) (2). Un analogue monomère de l'insuline particulièrement préféré est la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-insuline humaine (B28 est Lys; B29 est Pro).

Le terme "traitement", tel qu'il est utilisé ici, décrit la direction et les soins d'un patient dans un but de combattre la maladie, la condition ou le désordre et comprend

l'administration d'un composé de la présente invention de façon à empêcher le départ des symptômes ou des complications, pour alléger les symptômes ou les complications ou pour éliminer la maladie, la condition ou le désordre.

5 Le terme "agent d'isotonicité" fait référence à un agent qui est toléré physiologiquement et qui entraîne une tonicité appropriée à la formulation de façon à empêcher un flux net d'eau à travers la membrane cellulaire. Des composés, tels que la glycérine, sont communément employés dans un tel but à des concentrations connues.

10 Le terme "dérivé phénolique" ou "composé phénolique" représente le m-crésol, le phénol ou un mélange de m-crésol et de phénol. De préférence, le composé phénolique représente le m-crésol.

15 Le terme "tampon toléré physiologiquement" est connu dans le domaine. Un tampon toléré physiologiquement représente de préférence un tampon de phosphate, tel que le phosphate de sodium. D'autres tampons tolérés physiologiquement comprennent le TRIS, l'acétate de sodium ou le citrate de sodium. La sélection et la concentration du tampon sont connues dans le domaine.

20 Les analogues de l'insuline de la présente invention se complexent avec les ions de zinc et avec un dérivé phénolique de façon à former une conformation hexamère stable. Tant le zinc que le dérivé phénolique sont cruciaux pour obtenir un complexe qui est stable et qui est capable d'une dissociation rapide et d'un départ rapide de l'action. Le complexe hexamère est constitué de deux ions de zinc par hexamère d'analogues de l'insuline humaine et d'au moins trois molécules d'un dérivé phénolique choisi parmi le groupe constitué du m-crésol, du phénol ou d'un mélange de m-crésol et de phénol.

25 L'analogue monomère soluble est transformé en complexe hexamère par dissolution de l'analogue monomère dans un diluant contenant les dérivés phénoliques à un pH d'environ 7,5 et en ajoutant du zinc. Le zinc est de préférence ajouté sous forme de sel. Des exemples représentatifs de sels de zinc comprennent l'acétate de zinc, le bromure de zinc, le chlorure de zinc, le fluorure de zinc, l'iodure de zinc et le sulfate de zinc. L'homme de métier reconnaîtra qu'il existe de nombreux autres sels de zinc qui pourraient également être utilisés dans le procédé de la présente invention. De préférence, l'acétate de zinc ou le chlorure de zinc est utilisé parce que ces sels n'ajoutent pas de nouveaux ions chimiques aux procédés acceptés commercialement.

30

La dissolution de l'analogue peut être facilitée par ce qu'on appelle communément une dissolution acide, c'est-à-dire, le pH est abaissé à environ 3,0 à 3,5 avec un acide toléré physiologiquement, de préférence l'HCl, de façon à aider la dissolution de l'analogue monomère. D'autres acides tolérés physiologiquement comprennent l'acide acétique, l'acide citrique et l'acide phosphorique. Le pH est ensuite ajusté avec une base tolérée physiologiquement, de préférence l'hydroxyde de sodium à environ 7,4 à 7,5. D'autres bases tolérées physiologiquement comprennent l'hydroxyde de potassium et l'hydroxyde d'ammonium.

Le complexe hexamère peut être formulé en formulations parentérales stables et à action rapide. La concentration de l'analogue de l'insuline dans la formulation est d'environ 0,5 mg/ml à environ 20 mg/ml; de préférence d'environ 1,2 mg/ml à environ 17,5 mg/ml; de la manière la plus préférée, d'environ 3,5 mg/ml. En général, la concentration de zinc est d'environ 10 µg/ml à environ 50 µg/ml. La concentration optimale de zinc dans la formulation est d'environ 14 µg/ml à environ 35 µg/ml, dont deux ions de zinc sont liés à chaque hexamère. Lorsqu'il est formulé, le complexe hexamère lie jusqu'à sept composés phénoliques. En général, lorsqu'il est formulé, six composés phénoliques sont liés à l'hexamère. Par conséquent, un excès de composé phénolique est de préférence ajouté à la formulation. Le composé phénolique agit également comme agent conservateur. Pour cette raison, la concentration préférée est d'environ 23 mM à 35 mM, de la manière la plus préférée de 29 mM. Le composé phénolique est de préférence le m-crésol.

Un agent d'isotonicité, de préférence la glycérine, peut être ajouté à la formulation. La concentration de l'agent d'isotonicité se situe dans la gamme connue dans le domaine pour des formulations de l'insuline, de préférence environ 16 mg/ml. Le pH de la formulation peut être tamponné au moyen d'un tampon toléré physiologiquement, de préférence un tampon de phosphate, tel que le phosphate de sodium.

Au moment de l'invention, la littérature publiée suggérait qu'un homme de métier dût éliminer l'agrégation de façon à obtenir une absorption rapide. Pour cette raison, il est assez surprenant que l'analogue hexamère formulé apporte un départ rapide d'action. Contrairement à l'insuline la formation d'un complexe hexamère d'analogues de l'insuline n'affecte pas négativement le temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale



d'analogues de l'insuline dans le sérum. La Figure I démontre, chez les patients humains, la réponse moyenne au taux d'infusion de glucose à une formulation contenant la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI monomère (formulé sans zinc); un hexamère formulé Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI; et l'insuline humaine normale. Le complexe hexamère formulé concerne l'action rapide de la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI monomère. Le taux d'absorption est significativement plus rapide que dans le cas de l'insuline humaine normale. Par conséquent, les résultats présentés à la Figure I illustre : premièrement, la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI hexamère et la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI monomère présentent des taux d'absorption similaires; deuxièmement, tant la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI hexamère que la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI monomère présentent des taux plus élevés d'absorption que l'insuline.

La formulation comprenant des complexes d'analogues de l'insuline sous forme hexamère est stable. Dans des études comparatives, la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI monomère présente le taux le plus élevé de dégradation avec une augmentation de 1,63 % par semaine dans la formation de polymères au cours de l'étude de six semaines. L'insuline humaine non-formulée subit un taux plus lent de formation de polymères de 0,61 % par semaine. Suite à la formulation, cependant, le taux de formation de polymères à poids moléculaire élevé est réduit à 0,095 % par semaine pour l'insuline. La Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI formulée sous forme d'un complexe hexamère, présente un taux diminué de formation de polymères à poids moléculaire élevé de 0,11 % par semaine, ce qui est comparable au taux observé pour l'insuline formulée. Ces études sont illustrées à l'Exemple 1 et elles sont illustrées à la FIGURE 2.

L'analogue de l'insuline de la présente invention peut être préparé par n'importe laquelle d'une grande variété de techniques de synthèse reconnues de peptides, y compris les méthodes classiques (en solution), les méthodes en phase solide, les méthodes semi-synthétiques et les méthodes plus récentes d'ADN recombinant. Par exemple, Chance et coll., demande de brevet européen EP 0 383 472, et Brange et coll., demande de brevet européen EP 0 214 826, révèlent la préparation de divers analogues monomères.

Les exemples et les préparations suivants sont fournis uniquement pour illustrer davantage la préparation des analogues de l'insuline et l'invention. L'étendue de la présente invention n'est pas censée être constituée uniquement des exemples suivants.

### Préparation 1

#### Préparation de solutions-mères de protéines

Des échantillons non-formulés d'insuline et de Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI ont été préparés avec une concentration de 3,5 mg/ml dans du phosphate de sodium 7 mM, et avec ou sans  
5 1,25 mg/ml de m-crésol, 1,09 mg/ml de phénol et 16 mg/ml de glycérol, en fonction de l'expérience réalisée. Des échantillons de Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI sous forme d'un complexe hexamère ont été préparés d'une manière identique sauf que l'on a ajouté 19,7 µg/ml de zinc. Tous les échantillons ont été passés à travers une étape d'écart acide à pH 3,0, moment auquel on a ajouté du zinc dans les lots de formulation. Le pH a ensuite été ajusté  
10 à 7,4. Les concentrations en protéines ont été déterminées avant l'addition des composés phénoliques par spectroscopie d'absorption d'U.V. en utilisant un spectrophotomètre à double faisceau de type AVTV modèle 14 DS. Les concentrations en protéines ont été calculées de la manière décrite dans Frank, B. H., Pekar, A. H. et Veros, A. J. (1972) Diabetes, 21 (suppl. 2), 486 - 491.

15

### Exemple 1

#### Stabilité chimique

La dégradation est initiée en incubant des préparations formulées et non-formulées d'insuline et de Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI monomère et hexamère à 30 °C. L'insuline et la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI hexamère formulées contenaient : 3,5 mg/ml de protéines, 16 mg/ml de  
20 glycérol, de l'heptahydrate de phosphate de sodium dibasique 7 mM, 1,25 mg/ml de m-crésol, 1,09 mg/ml de phénol et 0,0245 mg/ml d'oxyde de zinc à un pH de 7,3 à 7,4. L'insuline et la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI monomère non-formulées contenaient : 3,5 mg/ml de protéines, 16 mg/ml de glycérol, de l'heptahydrate de phosphate de sodium dibasique 7 mM, 1,25 mg/ml de m-crésol et 1,09 mg/ml de phénol à un pH de 7,3 à 7,4. A des  
25 intervalles de sept jours, les échantillons ont été enlevés de l'incubation à 30 °C et dosés quant à la formation d'espèces à poids moléculaire élevé en utilisant une HPLC d'exclusion stérique. L'analyse est effectuée en injectant des échantillons de 20 µl dans une colonne de type Dupont Zorbax GF-250 Special (9,4 x 250 mm) en utilisant un mélange de

bicarbonate d'ammonium 0,4 M et d'acétonitrile comme solution d'élution (débit de 0,5 ml/min à température ambiante et détection à 214 nm). Le pourcentage de formation de polymère est déterminé à partir du rapport du pic de poids moléculaire élevé par rapport à la surface totale des pics du monomère et des poids moléculaires élevés. Les résultats sont  
5 illustrés à la FIGURE 2.

### Exemple 2

#### Diffraction statique de la lumière

Les propriétés de dissociation in vitro de la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI monomère, de la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI sous forme de complexe hexamère et de l'insuline sont dosées en utilisant  
10 la diffraction statique de la lumière.

Trois solutions-mères de protéines formulées et non-formulées sont préparées de la manière décrite sauf que les solutions-mères de protéines non-formulées ne contenaient pas de zinc, de glycérol ou d'agents conservateurs. En utilisant ces solutions-mères de 3.5 mg/ml, une série de dilutions est préparée tant pour l'insuline que pour la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI couvrant la gamme des concentrations en protéines de 3,5 mg/ml à 0,2 mg/ml. Toutes  
15 les dilutions sont effectuées jusqu'à un volume final de 10 ml avec du tampon de phosphate de sodium 7 mM, pH 7,4, de façon à imiter le site souscutané après l'injection. Toutes les solutions ont été filtrées à travers des filtres à faible liaison de protéines de type Gelman 0,2 µg avant d'effectuer les mesures de SLS. La concentration en protéines pour ces  
20 échantillons est déterminée en utilisant une HPLC en phase inverse.

Pour l'analyse des échantillons formulés, des blancs de solvant sans protéines ont été préparés pour chaque jeu d'échantillons de protéines. Ces blancs contenaient les excipients à la même concentration que les jeux d'échantillons de protéines correspondants. Pour l'analyse des échantillons non-formulés, un seul blanc de phosphate  
25 de sodium 7mM est utilisé. L'utilisation de ces blancs de solvants appropriés garantit que les données reflètent uniquement la diffraction due aux solutés et non une contribution supplémentaire due au changement de solvant.

Les expériences de diffraction de la lumière (static light scattering, SLS) sont réalisées en utilisant un autocorrélateur et un goniomètre de type Brookhaven Instruments

2030AT. Toutes les mesures ont été réalisées avec un trou de 1 mm à un angle de diffraction de 90 ° en utilisant un laser ionique à argon de type Lexel modèle 3500 fixé à 488 nm. La température est maintenue à 25 °C par un bain de température de type Neslab RTE-110. Le signal du tube photomultiplicateur est calibré en utilisant du toluène filtré à 0,1 µm.

Les poids moléculaires pondérés sont calculés en utilisant les équations décrites dans Cantor, C. R. et Schimmel, P. R., Biophysical Chemistry, W. H. Freeman and Company, New York, pages 838 - 843 (1982). La FIGURE 3 révèle les résultats de l'étude de la diffraction de la lumière. Les profils de dissociation in vitro de la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI sous forme d'un complexe hexamère et de l'insuline sont assez différents. Les résultats de l'analogue de l'insuline démontrent une dissociation rapide, ce qui permet une absorption plus rapide que dans le cas de l'insuline humaine. Bien que les deux préparations contiennent des états d'associations hexamères et que les formulations sont toutes aussi stables face une dégradation chimique, la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI hexamère présente une tendance plus grande à la dissociation que l'insuline.

REVENDICATIONS

1. Complexe d'analogues de l'insuline humaine, qui comprend : six molécules d'un analogue de l'insuline humaine, deux ions de zinc et au moins trois molécules d'un dérivé phénolique choisi parmi le groupe constitué du m-crésol, du phénol ou d'un mélange de m-crésol et de phénol; de telle façon que le complexe de l'analogue est un hexamère.  
5
2. Formulation pharmaceutique parentérale comprenant le complexe de l'analogue de l'insuline humaine selon la revendication 1.
3. Formulation pharmaceutique parentérale selon la revendication 2, qui comprend en outre un agent d'isotonicité et un tampon toléré physiologiquement.  
10
4. Formulation pharmaceutique parentérale selon la revendication 3, dans laquelle l'analogue de l'insuline humaine est la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-insuline humaine.
5. Formulation pharmaceutique parentérale selon la revendication 4, qui comprend : environ 3,5 mg/ml de Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-insuline humaine, environ 19,7 µg/ml de zinc, environ 7 mM de phosphate de sodium, environ 16 mg/ml de glycérine et environ 29 mM de m-crésol.  
15
6. Complexe d'analogues de l'insuline humaine selon la revendication 1, dans lequel l'analogue de l'insuline humaine est la Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-insuline humaine.
7. Complexe d'analogues de l'insuline humaine selon la revendication 1, dans lequel l'analogue de l'insuline humaine est l'Asp<sup>B28</sup>-insuline humaine.  
20

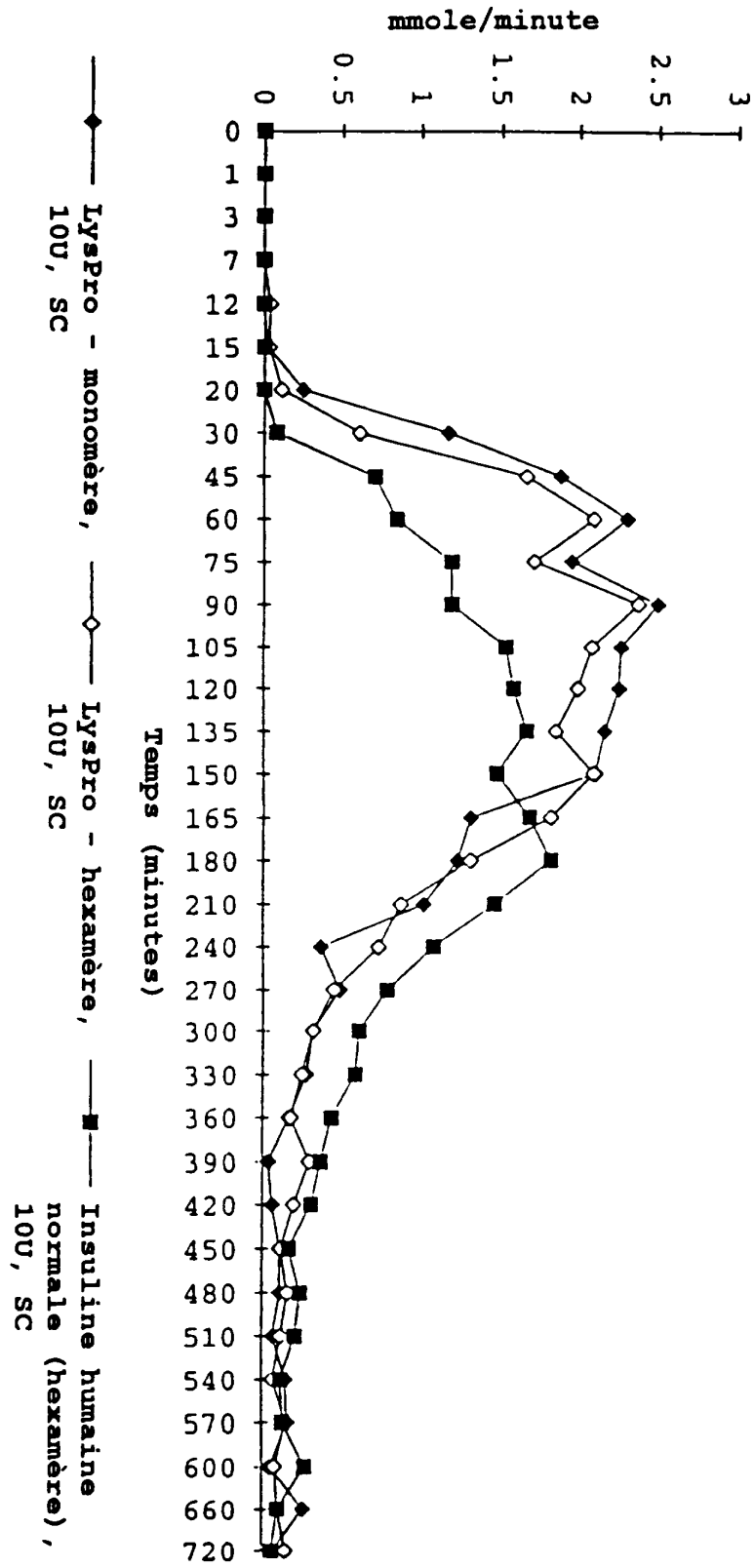


FIG. 1

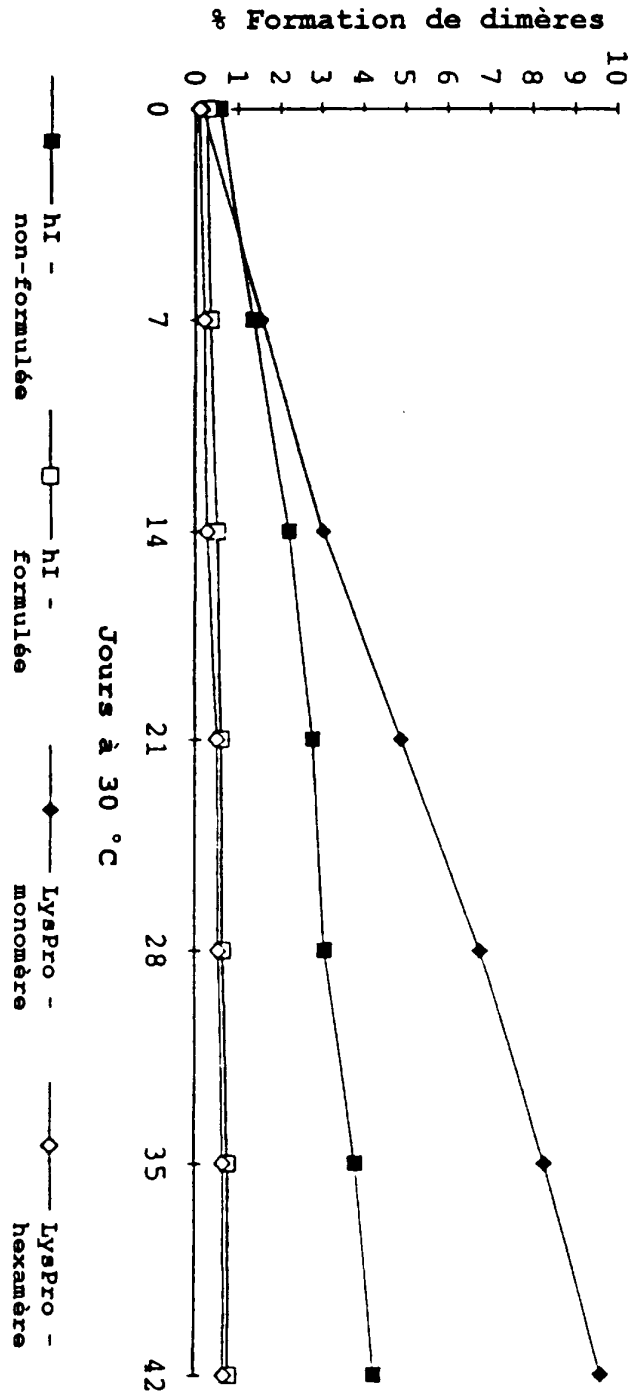


FIG. 2

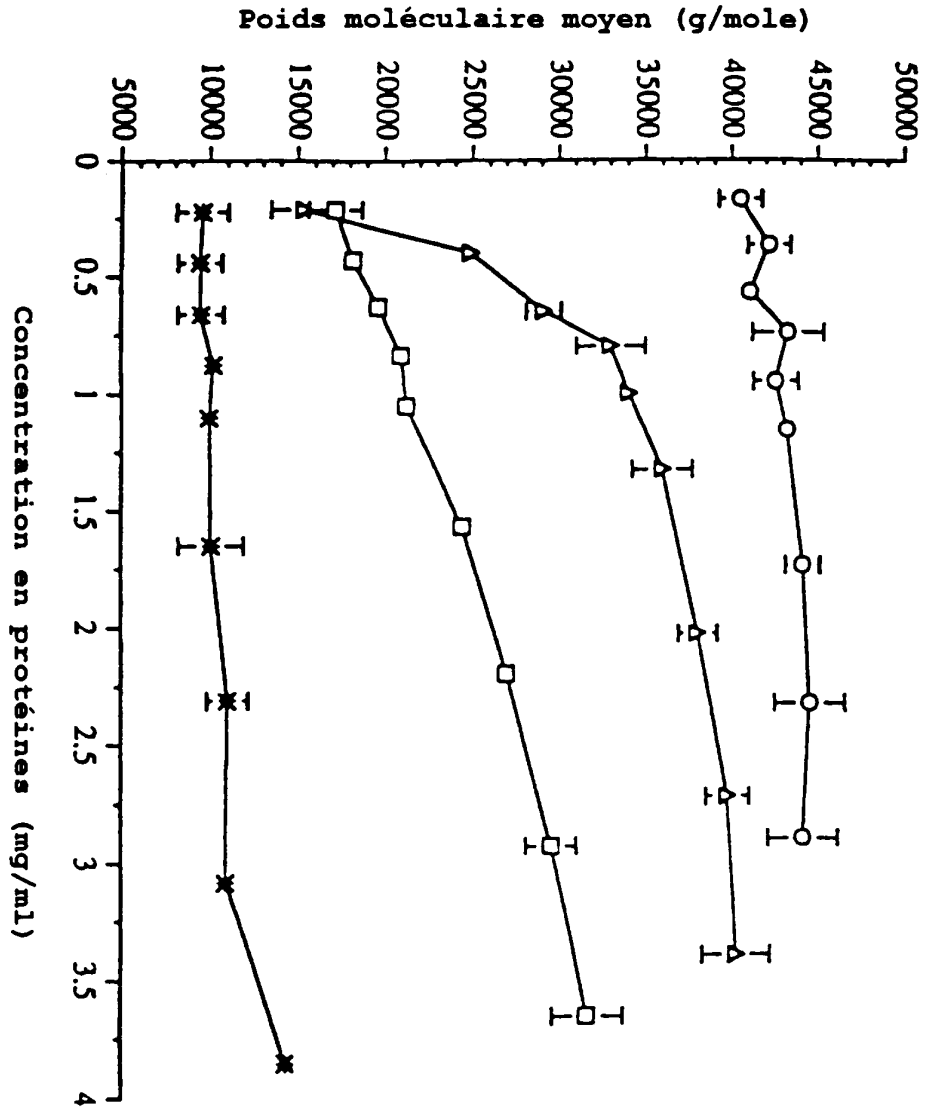


FIG. 3