

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **027744**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.08.31

(21) Номер заявки
201490913

(22) Дата подачи заявки
2012.10.31

(51) Int. Cl. *A61K 9/19* (2006.01)
A61K 47/14 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/20 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)

(54) ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА

(31) 61/553,388; 61/609,123

(32) 2011.10.31; 2012.03.09

(33) US

(43) 2014.09.30

(86) PCT/US2012/062816

(87) WO 2013/067022 2013.05.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КСЕРИС ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Престрелски Стивен, Скотт Ненси
(US)**

(74) Представитель:
**Льу Т.Н., Угрюмов В.М., Кондакова
Е.В., Соболев А.Ю. (RU)**

(56) GB-A-2119248
US-A1-2010120660
BROMBERG L.E. ET AL.: "TRANSPORT OF
PROTEINS DISSOLVED IN ORGANIC SOLVENTS
ACROSS BIOMIMETIC MEMBRANES",
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY
OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF
SCIENCES, US, vol. 92, no. 5, 1 February
1995 (1995-02-01), pages 1262-1266, XP000651685,
ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.92.5.1262
table 1

US-A1-2008248999
EP-A1-2060268
US-A-5932547

(57) В изобретении представлена лекарственная форма для парентерального введения, включающая инсулин, который включает память рН между 1 и 4 или между 6 и 8, и апротонный полярный растворитель, отличающаяся тем, что солюбилизированный инсулин включает стабильные мономерные или димерные формы инсулина или их смесь, и где содержание воды в лекарственной форме равно или меньше чем 15% мас./об.

B1

027744

**027744
B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США 61/609123, поданной 9 марта 2012, и предварительной заявке США 61/553388, поданной 31 октября 2011. Информация, содержащаяся в вышеупомянутых заявках, включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Изобретение относится к лекарственным формам инсулина для парентерального введения. Данные лекарственные формы могут включать стабильные мономерные и димерные формы инсулина, тем самым ускоряя скорость всасывания инсулина в кровоток субъекта.

Уровень техники

Пациенты, страдающие диабетом 1 типа, практически не вырабатывают инсулин, и поэтому первичным лечением для диабета 1 типа является экзогенная инсулинотерапия. Кроме того, в связи с ограничениями без лечения инсулином многие пациенты, страдающие диабетом 2 типа, со временем нуждаются в инсулинотерапии. По имеющимся сведениям инсулин используется уже более чем 90 лет для лечения диабета. Стандартные схемы включают введение нескольких инъекций инсулина каждый день: базальный инсулин длительного действия один или два раза в день и быстродействующий инсулин во время еды. Несмотря на то что данная схема лечения принята как эффективная, она имеет ограничения. Во-первых, пациенты, как правило, не любят делать инъекцию инсулина самим себе из-за неудобства и боли от игл. В результате, пациенты имеют тенденцию к не выполнению правильно предписанных схем лечения. Более того, даже при правильном введении не во время принятия пищи продукты инъекционного инсулина в достаточной степени воспроизводят естественные физиологические воздействия человеческого инсулина. В частности, первый фазовый ответ у не больного диабетом состоит из массивного выброса инсулина с уровнем инсулина в крови, увеличивающимся в течение нескольких минут при поступлении глюкозы в кровь из еды. Уровень инсулина в крови после этого достигает максимума между 30 и 60 мин после начала действия. В отличие от этого инъекцируемый инсулин поступает в кровь медленно с наблюдаемой максимальной концентрацией (C_{max}), происходящей через 90 мин и больше после введения регулярного человеческого инсулина.

Различные классы терапевтического инсулина и инсулиновых аналогов были обнаружены для достижения различных фармакокинетических (PK) профилей, таких как соотношение начала действия и времени для достижения максимума инсулина в плазме с длительным действием. Ключевое усовершенствование в лечении инсулином было введение быстродействующих аналогов инсулина, включая Humalog®, Novolog® и Apidra®. Однако, даже при этих аналогах достижение максимальных уровней инсулина обычно происходило через ~60 мин после введения. Неэффективность в настоящее время представленных на рынке продуктов инсулина для достаточной имитации первой фазы секреции инсулина приводит к недостатку уровней инсулина в начале приема пищи и повышенные уровни инсулина между приемами пищи, что может иметь физиологическое действие гипергликемии в начале приема пищи и гипогликемии позднее после приема пищи. Обе этих ситуации показывают значительные трудности для обеспечения технологии замкнутой системы искусственной поджелудочной железы, в том, что требуются сложные алгоритмы для управления обоим латентных периодов.

Для пациентов, страдающих диабетом, получающих лечение инсулином, основным способом введения экзогенного инсулина является подкожный, а основные параметры PK профиля зависят от подкожного всасывания. Количество переменных влияет на всасывание подкожно введенного инсулина (например, кровоток, скорость диффузии и связанное состояние). Когда скорость тока крови достаточная, факторы, ограничивающие скорость для всасывания растворимого инсулина, являются (i) промежуточным транспортом к капиллярам путем диффузии и (ii) ограничением транспорта через мембрану капилляра, оба из которых регулируются размерами молекул (т.е. связанного состояния инсулина).

Как правило, лекарственные формы инсулина на водной основе. Одной из причин для этого является то, что большая часть человеческого тела состоит из воды, включая плазму крови, которая представляет собой водную среду. В связи с этим существует естественная тенденция к введению лекарственных форм, которые соответствуют окружающей среде, чтобы лекарственная форма была предназначена для проникновения. При этом мономерные и димерные формы инсулина более легко всасываются в кровоток в связи с их небольшими размерами по сравнению с гексамерной формой инсулина, инсулин обычно присутствует в фармацевтических композициях в виде стабилизированных цинк-связанных гексамеров. Мономерный инсулин в водном растворе является нестабильным, образуя амилоидные фибриллы и распадается через водно-опосредованные пути. Хотя структура гексамера способствует стабильности в растворе (pH 5-8), она также препятствует диффузии и последующему всасыванию. Кроме того, объем вводимого депо также оказывает влияние на диффузию, таким образом, чем больше объем, тем медленнее скорость диффузии. Именно эта комбинация факторов отвечает за задержку в начале действия и достижения максимальных уровней инсулина в плазме.

Для предотвращения фибрилляции и разрушения инсулина в водном растворе, в тоже время способствования подкожного всасывания, разработаны аналоги инсулина, в которых аминокислотная последовательность была изменена для уменьшения способности к самоассоциации при сохранении рецептор-связывающей активности. Эти классы инсулина часто называют как "мономерный" инсулин, но они фак-

тически встречаются как слабосвязанные гексамеры. Всасывание таких препаратов будет все еще замедленным, потому что это зависит от диффузии и последующего снижения подкожной концентрации, необходимой для диссоциации гексамера до димера/мономера. Аналоги инсулина с равновесием в пользу мономерного состояния (например, аналог инсулина Lispro) показывают большую скорость всасывания и более короткую продолжительность действия. Однако эти молекулы аналогов являются менее стабильными и более предрасположены к необратимой агрегации при термическом и механическом воздействии по сравнению с гексамерным инсулином. Кроме того, эти агрегаты снижают не только дозу доступного инсулина, но могут также вызвать раздражение или иммунные реакции у пациентов. Беспокойства также появились в экспериментальных и эпидемиологических исследованиях относительно длительной сигнализации рецепторного механизма и стимулирования опухолевой пролиферации с помощью некоторых новых аналогов инсулина. Независимо от их нехватки аналоги инсулина являются дорогостоящими - приблизительно в два раза больше, чем регулярный человеческий инсулин.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает решение для существующих проблем перед лекарственными формами инсулина. Изобретение заключается в сушке инсулина в буфере для создания сухой формы инсулина с сохранением желаемого рН после его восстановления и солиubilизации в апротонном полярном растворителе. Полученная лекарственная форма включает солиubilизированные и стабилизированные мономерные и димерные формы инсулина. В частности, лекарственные формы могут иметь относительно низкое количество воды (20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1% или меньше) или могут быть безводными, которые дополнительно предусматривают повышенное содержание инсулина, присутствующего в лекарственной форме, тем самым снижая объем лекарственной формы, вводимой субъекту, содержащей инсулин. Кроме того, изобретение предусматривает как немодифицированные, так и природные и модифицированные или аналоговые формы инсулина для применения. Другими словами, хотя аналоги инсулина могут применяться с настоящим изобретением, немодифицированный/природный инсулин может также применяться и оставаться стабильным как в его мономерной, так и димерной форме.

В одном аспекте настоящего изобретения раскрыта лекарственная форма, включающая инсулин, который имеет память рН между 1 и 4 (или между 1 и 3, или приблизительно 2) или между 6 и 8 (или между 6.5 и 7.5, или приблизительно 7), и апротонный полярный растворитель, в которой инсулин может быть солиubilизированным в апротонном полярном растворителе, где солиubilизированный инсулин может включать мономерные или димерные формы инсулина или их смесь, и где содержание воды в лекарственной форме может быть равно или меньше чем 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1% мас./об. или мас./мас. или меньше (например, безводные). Лекарственная форма может применяться для парентерального введения. В некоторых аспектах апротонным полярным растворителем может быть диметилсульфоксид (DMSO), п-метилпирролидон (NMP), этилацетат, диметилформамид (DMF), диметилацетамид (DMA) или пропиленкарботан или их смесь. В определенных аспектах апротонным полярным растворителем может быть диметилсульфоксид (DMSO). В некоторых аспектах лекарственная форма включает от 3 до 50 мг/мл, от 3 до 10 мг/мл или от 10 до 50 мг/мл инсулина. В других аспектах она может включать 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100 мг/мл или больше, или в необходимом количестве, или любой диапазон в нем. В некоторых аспектах большая часть инсулина в лекарственной форме представляет собой мономерную форму или димерную форму или сочетание мономерной и димерной форм. Лекарственная форма может дополнительно включать ингредиенты, которые способны снижать агрегацию мономерных и димерных форм инсулина. Неограничивающие примеры таких ингредиентов включают мочевины, гуанидин хлорид, аминокислоту, сахар, полиол, полимер, кислоту или сурфактант или их смесь.

В определенных аспектах кислотой может быть уксусная кислота, аскорбиновая кислота, лимонная кислота, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, янтарная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота или адипиновая кислота или их смесь. Лекарственная форма может включать соразстворитель. Одним из неограничивающих примеров соразстворителя является вода. В некоторых аспектах лекарственная форма не включает в себя цинк, включает в себя небольшие количества цинка и/или включает цинк, который является связанным с хелатирующим веществом для снижения вероятности образования гексамера. В определенных аспектах инсулин может быть предварительно высушен в нелетучем буфере, указанный буфер может иметь диапазон рН между 1 и 4, или между 1 и 3, или приблизительно 2, или между 6 и 8, или между 6.5 и 7.5, или приблизительно 7. Примерами нелетучих буферов может быть глициновый буфер, цитратный буфер или фосфатный буфер или их смесь. В некоторых аспектах буфер может включать хелатирующее вещество. Неограничивающие примеры хелатирующих веществ включают этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), этиленгликольтетрауксусную кислоту (EGTA), винную кислоту, глицерин или лимонную кислоту или любое их сочетание. Лекарственная форма может включать ингредиент, который способен понизить температуру точки замерзания апротонного полярного растворителя до приблизительно 0°C, и неограничивающие примеры такого ингредиента включают воду, сахар, сахарный спирт или их смесь. В отдельных случаях инсулин может быть немодифицированным, или природным, или природным человеческим инсулином. В других аспектах композиция может дополнительно включать адьювант инсулина, такой как аналог амилина. Аналог амилина может быть

солюбилизированным в лекарственной форме. Неограничивающим примером аналога амилина является прамлинтид. Прамлинтид может быть обработан так, что бы он имел память рН между 1 и 5, или 2, 3, или 4, или приблизительно 2. В некоторых конкретных случаях совместной лекарственной формы, память рН инсулина может быть приблизительно 2 и память рН прамлинтида может быть приблизительно 2. В некоторых аспекта, обработка прамлинтида может включать сушку указанного прамлинтида в нелетучем буфере, указанный буфер имеет диапазон рН между 1 и 5, или 2, 3, или 4, или приблизительно 2. В лекарственных формах, которые включают инсулин и прамлинтид, содержание воды может быть между 5 и 20% мас./об. или мас./мас., или между 5 до 15% мас./об. или мас./мас., или между 7 и 12% мас./об. или мас./мас., или между 8 и 10% мас./об. или мас./мас., или приблизительно 9% мас./об. или мас./мас. Лекарственная форма может быть в жидкой форме. Лекарственная форма может быть раствором. В определенных аспектах по меньше мере 50, 60, 70, 80 или 90% или больше инсулина в лекарственной форме может оставаться химически и физически стабильным, когда лекарственная форма хранится при комнатной температуре в течение одного месяца. В некоторых аспектах лекарственная форма может содержаться в контейнере. Контейнером может быть шприц, шприц-ручка, устройства автоматического инжектора, насос или перфузионный мешок. В определенных аспектах апротонный полярный растворитель может быть непрерывной фазой лекарственной формы. Лекарственная форма может включать в себя по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% мас./об. или мас./мас. апротонного полярного растворителя. Инсулин в лекарственной форме может быть метастабильным.

Также раскрыт способ снижения уровня глюкозы в крови, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из лекарственных форм по настоящему изобретению в количестве, эффективном для снижения уровня глюкозы в крови у субъекта. Субъектом может быть человек (взрослый или ребенок), животное (например, шимпанзе, лошадь, корова, свинья, кролик, крыса, мышь, др.). В определенных аспектах уровень глюкозы в крови у субъекта снижается в течение 10, 20, 30, 60 или 90 мин после введения. В некоторых случаях начальный уровень инсулина в крови $1/2$ Тmax у субъекта наблюдается в течение 10, 20, 30, 40, 50 или 60 мин после введения или в течение от 30 до 60 мин после введения. Субъект может уже иметь диагноз диабет типа-I или типа-II или может быть подвержен развитию диабета типа-I или II. В некоторых случаях лекарственная форма может быть введена в течение 30, 20, 15, 10, 5 или 1 мин до приема пищи субъектом или в течение 1, 5, 10, 15, 20 или 30 мин после приема пищи субъектом. Также раскрыт способ изготовления лекарственных форм по настоящему изобретению. Способ может включать высушивание смеси, включающей инсулин и нелетучий буфер, для получения высушенного инсулина, в котором сухой инсулин может иметь память рН между 1 и 4 (или 2 до 3, или приблизительно 2) или между 6 и 8 (или 6.5 до 7.5, или приблизительно 7), а затем восстановление сухого инсулина в апротонном полярном растворителе, где инсулин может быть солюбилизован в апротонном полярном растворителе, где солюбилизованный инсулин может включать стабильные мономерные или димерные формы инсулина или их смесь, и в котором содержание воды в лекарственной форме может быть равным или меньше чем 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1% мас./об. или мас./мас. или меньше (например, безводная). Способ может дополнительно включать высушивание смеси, включающей аналог амилина и второй нелетучий буфер, для получения сухого аналога амилина и восстановление сухого аналога амилина в апротонном полярном растворителе вместе с сухим инсулином, где сухой аналог амилина может быть солюбилизован в апротонном полярном растворителе. Как отмечалось выше, аналогом амилина может быть прамлинтид и может быть обработан, чтобы иметь память рН между 1 и 5, или 2, 3, или 4, или в конкретных случаях приблизительно 2. В некоторых конкретных случаях совместной лекарственной формы память рН инсулина может быть приблизительно 2 и память рН прамлинтида может быть приблизительно 2. Второй нелетучий буфер может иметь диапазон рН между 1 и 5 или приблизительно 2, 3, или 4, или в частности приблизительно 2. Этот способ может дополнительно включать добавление соразстворителя, такого как вода, к лекарственной форме в количестве от 5 до 20% мас./об. или мас./мас., или 5 до 15% мас./об. или мас./мас., или 7 до 12% мас./об. или мас./мас., или 8 до 10% мас./об. или мас./мас., или приблизительно 9% мас./об. или мас./мас.

Другим уникальным аспектом заявленной лекарственной формы является, что она может содержаться в контейнере, храниться и быть непосредственно готова к парентеральному введению по мере необходимости без необходимости восстановления или разбавления лекарственной формы. Таким образом, контейнером, который может хранить лекарственную форму, может быть шприц, шприц-ручка, устройства автоматического инжектора, насос или перфузионный мешок. Также рассматриваются для применения в лекарственной форме дополнительные ингредиенты/фармацевтические наполнители, неограничивающий пример которых включает антиоксиданты (примеры включают аскорбиновую кислоту, цистеин, метионин, тиоглицерин, тиосульфат натрия, сульфиты, ВНТ, ВНА, аскорбилпальмиат, пропилгаллат или витамин Е); хелатирующие вещества (примеры включают в себя EDTA, EGTA, винную кислоту, глицерин или лимонную кислоту); или консерванты (примеры включают алкиловые спирты, бензиловый спирт, метилпарабен или пропилпарабен или их смесь). Лекарственная форма может быть в жидкой форме, полутвердой форме или гелеобразной форме. Как описано ниже, лекарственная форма может иметь желательные пределы вязкости (в одном неограничивающем примере такой диапазон может быть между 0.5 и 15 сП).

Предполагается, что любой вариант осуществления, рассматриваемый в данном описании, может быть реализован в отношении любого способа или композиции по изобретению и наоборот. Кроме того, композиции по изобретению можно будет применять для достижения способов по изобретению.

"Инсулин" означает человеческий, нечеловеческий, рекомбинантный, очищенный и/или синтетический (например, модифицированный инсулин или аналоги инсулина) инсулин. "Человеческий инсулин" означает человеческий пептидный гормон инсулина, который секретируется поджелудочной железой - он может быть выделен от природного источника, изготовлен из генетически измененного организма, изготовлен посредством синтетической химии, приобретенным и т.д. "Нечеловеческий инсулин" представляет собой инсулин, полученный от животного (например, свиньи, коровы и т.д.). "Модифицированный инсулин" или "аналог инсулина" представляет собой измененную форму инсулина, отличную от таковой в природе (например, химическая модификация, отличное строение, отличная аминокислотная последовательность), но по-прежнему доступные субъекту (например, человеку) для осуществления такой же самой функции как и природный/немодифицированный инсулин. Например, посредством генной инженерии, кодирующей ДНК, аминокислотная последовательность инсулина может быть изменена для изменения ее ADME (всасывания, распределения, метаболизма и/или выведения) характеристик. Примеры модифицированного инсулина или аналогов инсулина включают в себя Lispro®, Aspart®, Glulisine®, Detemir®, Degludec® и т.д. Немодифицированный или природный инсулин включает нативную или природного происхождения аминокислотную последовательность.

"Стабильный инсулин" означает инсулин в лекарственной форме не является необратимым комплексом в лекарственной форме или иной форме, теряющей свою активность после того, как лекарственная форма введена. Инсулин сохраняет свою активность, как только всасывается в кровь. Не желая быть связанным теорией, можно полагать, что инсулин в лекарственной форме по настоящему изобретению является "метастабильным" в том, что хотя конформация солюбилизованного инсулина может изменяться, инсулин снова превращается в свою естественную конформацию как только вводится и всасывается в кровь. Кроме того, можно полагать, что изменения конформации инсулина в лекарственной форме снижают вероятность агрегации с другими мономерами и димерами инсулина или адьювантами, такими как аналоги амилина, присутствующие в лекарственной форме. Мономерная форма инсулина означает инсулин в его мономерной форме. Димерная форма инсулина означает инсулин в его димерной форме (например, два мономера, связанных или соединенных друг с другом). Гексамерная форма инсулина означает инсулин в его гексамерной форме (например, три димерных формы, связанные или соединенные друг с другом). "Не содержат цинк" или "с низким содержанием цинка" означает, что лекарственная форма включает приблизительно 0.6% или меньше (например, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0%) цинка относительно содержания инсулина или 3 иона цинка на 6 мономеров инсулина или меньше (например, 2, 1, 0).

"Апротонный полярный растворитель" означает полярный растворитель, который не содержит замещаемый водород карбоксильной группы и не выполняет функцию донора водородной связи. Как уже отмечалось, неограничивающие примеры включают диметилсульфоксид (DMSO), диметилформамид (DMF), этилацетат, п-метилпирролидон (NMP), диметилацетамид (DMA) и пропиленкарбонат.

"Парентеральное введение" относится к введению лекарственной формы под или через один или несколько слоев кожи или слизистой оболочки животному, такому как человек. Стандартное парентеральное введение делают в подкожную или внутримышечную область животного организма, например больному человеку. Эти глубокие места являются желаемыми, потому что ткань растягивается легче по сравнению с неглубокими участками кожи для размещения вводимого объема для доставки лекарственной формы инсулина. Введение может быть с иглой, насосом, инъекционным устройством, катетером и т.д.

"Фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее вещество или наполнитель для доставляемого инсулина к млекопитающему, такому как животное или человек.

"Фармацевтически приемлемый" ингредиент, эксципиент или компонент, который является стабильным для применения людьми и/или животными без нежелательных вредных побочных действий (таких как токсичность, раздражение или аллергическая реакция), соразмерных с приемлемым соотношением польза/риск.

"Биосовместимый" означает, что он является пригодным для применения людьми или животными без нежелательных вредных побочных действий (таких как токсичность, раздражение или аллергическая реакция), соразмерных с приемлемым соотношением польза/риск.

"Биодоступный" относится к степени, в которой инсулин всасывается из лекарственной формы субъекту.

"Системный" означает усредненное по доставке или введению инсулина субъекту, что терапевтическое средство обнаруживалось в биологически значительном уровне в плазме крови субъекта.

"Пациент", "субъект" или "индивидуум" относится к млекопитающему (например, человек, примат, собака, кошка, жвачное животное, овца, свинья, лошадь, мышь, крыса, хомяк, кролики или морская свинка).

"Ингибирование", или "снижение", или любой вариант этих терминов при применении в формуле изобретения и/или описании включают любое значительное снижение или полное ингибирование для достижения желательного результата.

"Эффективный", или "лечащий", или "предотвращающий", или любой вариант этих терминов при применении в формуле изобретения и/или описании означают достаточный для достижения желательного, предполагаемого или преднамеренного результата.

Термин "приблизительно" или "около" определяется как близко к понятному любому среднему специалисту и в одном неограничивающем примере термины определяются в пределах 10%, предпочтительно в пределах 5%, более предпочтительно в пределах 1% и наиболее предпочтительно в пределах 0.5%, кроме того, "по существу безводный" относится к меньше чем 5, 4, 3, 2, 1% или меньше по весу или объему воды.

Употребление слова в единственном числе, когда используют совместно с термином "включающий" в формуле изобретения и/или описания может означать "один", но оно также согласуется со значением "один или несколько", "по меньшей мере один" и "один или более чем один".

Слова "включающий" (и любая форма включающего, такая как "включает" и "включать"), "имеющий" (и любая форма имеющего, такая как "иметь" и "имел"), "включающий в себя" (и любая форма включающего, такая как "включает в себя" и "включать в себя") или "содержащий" (и любая форма содержащего, такая как "содержит" и "содержать") включительно или неограничивающие и не исключают дополнительные неуказанные элементы или стадии способа.

Композиции и способы их применения могут "включать", "состоять по существу из" или "состоять из" любого из ингредиентов или стадий, раскрытых в данном описании.

Что касается переходной фразы "состоящей по существу из" в одном неограничивающем аспекте основная и новая характеристика лекарственных форм и способов, раскрытых в данном описании, включают стабильность и растворимость мономерных и/или димерных форм инсулина в указанных лекарственных формах.

Таким образом, ингредиенты, которые могут влиять на стабильность или растворимость мономерных и/или димерных форм инсулина в лекарственных формах, будут исключены из указанных лекарственных форм в случаях, когда в формуле изобретения применяют переходную фразу "состоящий по существу из". Другие объекты, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из последующего подробного описания. Следует понимать, однако, что подробное описание и примеры, показывающие конкретные варианты осуществления изобретения, даются только в качестве иллюстрации. Кроме того, предполагается, что изменения и модификации в пределах объема и сущности изобретения будут очевидны специалисту в данной области техники из данного подробного описания.

Краткое описание чертежей

Следующие чертежи входят в состав настоящего описания и включены для дополнительной иллюстрации некоторых аспектов настоящего изобретения, изобретение может быть лучше понято с помощью ссылки на один или несколько из этих чертежей в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных ниже.

Фиг. 1 - ИК-спектры на основе преобразования Фурье лекарственных форм DMSO/инсулин и водный раствор/инсулин.

Фиг. 2 - средняя молекулярная масса лекарственных форм DMSO/инсулин и водный раствор/инсулин.

Фиг. 3 - гидродинамический радиус распределения для Ins-E при 50 мг/мл в DMSO. Ось по горизонтали является логарифмически-распределенной сеткой значений гидродинамического радиуса (с примыкающими точками, отличающимися в ~1.3). Анализ охватывает диапазон радиусов от ~0.01 нм до ~20 мкм. Пики при 0.01-0.1 нм, которые являются артефактами, возникающими после импульсного фотодетектора, были подавлены.

Фиг. 4 - гидродинамический радиус распределения для Ins-E при 30 мг/мл в DMSO (см. выше фиг. 3 для интерпретации графика).

Фиг. 5 - гидродинамический радиус распределения для Ins-E при 10 мг/мл в DMSO (см. выше фиг. 3 для интерпретации графика).

Фиг. 6 - гидродинамический радиус распределения для Ins-E при 3 мг/мл в DMSO (см. выше фиг. 3 для интерпретации графика).

Фиг. 7 - гидродинамический радиус распределения для Ins-H₂O при 10 мг/мл в буфере E (см. выше фиг. 3 для интерпретации графика).

Фиг. 8 - гидродинамический радиус распределения для Ins-H₂O при 10 мг/мл в буфере F (см. выше фиг. 3 для интерпретации графика).

Подробное описание изобретения

Как описано выше, трудности, связанные с изготовлением лекарственной формы инсулина в его мономерной или димерной формах для парентерального введения, хорошо описаны. Текущие решения для таких трудностей также хорошо описаны и приняты в качестве стандартной практики в области лекарственных форм. К примеру, аналоги инсулина/модифицированный инсулин были изготовлены для

снижения его аффинности связывания с самим собой в надежде избежать образования гексамера из аналогов. Эти аналоги, как правило, вводят в водной среде, что уменьшает их стабильность и делает их более подверженными к необратимой агрегации, как только агрегация происходит. Кроме того, такие аналоги являются дорогостоящими и могут вызывать раздражение или аллергическую реакцию у пациентов.

Путем сравнения авторы изобретения нашли решения для вышеуказанных проблем. Решение заключается в изготовлении инсулина, который обладает конкретной памятью рН и восстановленный и солюбилизированный в апротонном полярном растворителе. Полученная лекарственная форма, которая имеет небольшое количество воды, включает солюбилизованные и стабилизированные мономерные и димерные формы инсулина. Кроме того, повышенная солюбилизация инсулина в апротонных полярных растворителях приводит к небольшому объему лекарственной формы, которая имеет большое количество мономерных и димерных форм инсулина. Следует отметить, что лекарственные формы могут применяться для как модифицированного, так и немодифицированного инсулина. В случае немодифицированного инсулина, можно избежать проблем, связанных с использованием молекул модифицированного/аналога инсулина, таких как раздражение, иммунногенный ответ и затраты.

Эти и другие неограничивающие аспекты настоящего изобретения рассмотрены ниже.

А. Инсулин.

Инсулин помогает организму использовать или запастись глюкозой в крови, которую получают из пищи. У людей с диабетом 1 типа панкреатическая железа больше не вырабатывает инсулин. В то время как люди с диабетом 2 типа вырабатывают инсулин, реакция их организма на него не эффективна или недостаточна, а именно называется как инсулинорезистентность.

Инсулин представляет собой пептидный гормон, который хорошо известен и охарактеризован. Мономерная форма человеческого инсулина состоит из 51 аминокислоты, которые дополнительно охарактеризованы в двух пептидных цепях, называемых как цепь А и цепь В, которые связаны с помощью дисульфидных связей. У большинства видов цепь А состоит из 21 аминокислоты, а цепь В - из 30 аминокислот. Хотя аминокислотная последовательность инсулина отличается у видов, некоторые сегменты молекулы являются высококонсервативными. Эти сходства в аминокислотной последовательности инсулина приводят к трехмерной конформации инсулина, которая очень схожа среди видов, и инсулин от одного животного может быть биологически активным у других видов. Например, инсулин свиньи широко применяется для лечения больных людей. Мономерная форма инсулина может связываться вместе для образования димеров. Димеры могут связываться для образования гексамеров, которые происходят обычно в присутствии цинка. Как мономерная, так и димерная формы инсулина распространяются в крови. Для сравнения, гексамеры распространяются плохо в существенной степени в связи с их значительно большими размерами. Как уже отмечалось, это приводит к получению модифицированного инсулина или аналогов инсулина (например, Lispro®, Aspart®, Glulisine®, Detemir®, Degludec® и т.д.), которые являются коммерчески доступными и пригодны в контексте настоящего изобретения. Кроме того, обычный немодифицированный инсулин является также легко коммерчески доступным (например, Humulin® R, Humulin® N, Humulin® 70/30, Novolin® и т.д.) и также используется в контексте настоящего изобретения. В некоторых аспектах обычная/немодифицированная форма инсулина может применяться вместо модифицированной формы для снижения аллергических или иммунногенных расходов или для снижения затрат на лекарственную форму. Инсулин в настоящее время производится многими производителями, включая фармацевтические компании и контрактных производителей лекарственных средств. Фармацевтические изготовители включают Eli Lilly и Co., Novo Nordisk and Sanofi. Контрактные производители включают Sigma-Aldrich, Lonza и Biocon. Инсулин, используемый в примерах настоящего описания, был рекомбинантным немодифицированным человеческим инсулином, приобретенным от Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO).

В. Память рН.

Авторы изобретения также раскрыли стадию обработки, которую можно использовать для дополнительной стабилизации солюбилизованного инсулина в лекарственной форме. Эта стадия включает смешивание инсулина с нелетучим буфером в водном растворе и затем высушивание смеси для получения сухого инсулина. До сушки водный раствор имел диапазон рН между 1 и 4 или между 6 и 8, который является оптимальным диапазоном рН для стабильности инсулина в водной среде. Таким образом, после того как смесь высохнет, производят сухой инсулин, имеющий "память рН" между 1 и 4 или между 6 и 8, такой, что память рН сохраняется после сушки инсулина, солюбилизованного в апротонном полярном растворителе. В некоторых конкретных случаях, когда дополнительно включен прамлинтид, память рН инсулина может быть приблизительно 2, а память рН прамлинтида может быть приблизительно 2.

В частности, "память рН" инсулина является результатом профиля заряда (состояние протонирования) после сушки инсулина из буферизированного водного раствора (например, из нелетучего буфера). Состояние протонирования и, таким образом, растворимости и стабильности инсулина в апротонных полярных растворителях зависит от рН водной смеси инсулина или раствора до сушки. Когда инсулин сушат в буферных видах, в которых как кислотный, так и основной компоненты являются нелетучими, память рН сухого инсулина будет приблизительно равна рН водной смеси инсулина или раствора (см.,

например, *Enzymatic Reactions in Organic Media*, Koskinen, A.M.P., and Klibanov, A.M., eds., Springer (1996). Кроме того, рН буферизированного водного раствора (например, нелетучий буфер), в котором сушили инсулин, может быть оптимизирован для получения памяти рН для инсулина, которая приводит к оптимальной растворимости и минимальному разрушению, где сухой инсулин затем восстанавливают в апротонном полярном растворителе. Таким образом, когда высушенный инсулин является восстановленным в таком растворителе, инсулин в восстановленной лекарственной форме сохраняет характеристики растворимости и стабильности оптимальной памяти рН.

Память рН можно измерить несколькими путями. В одном способе память рН измеряли путем восстановления инсулина в безбуферной воде и измерением рН восстановленной смеси инсулина или раствора с рН-метром, таким как рН-бумага или градуированный рН-электрод. Кроме того, память рН можно определить путем добавления по меньшей мере 20% воды к инсулин/апротонному полярному растворителю лекарственной формы и измерением рН лекарственной формы с рН-метром (см., например, Baughman and Kreevoy, "Determination of Acidity in 80% Dimethyl Sulfoxide-20% Water," *Journal of Physical Chemistry*, 78(4):421-23 (1974). Измерение рН в апротонном полярном растворителе-водном растворе может потребовать небольшую поправку (т.е. не более чем 0.2 единицы рН согласно Baughman и Kreevoy, см. выше). На основании вышеизложенного нелетучий буфер, который используют в лекарственных формах, описанных в настоящем изобретении, тот, который полезен в установлении рН максимальной стабильности/минимального разрушения, а также тот, который полезен в удалении остаточной влажности или содержания жидкости из инсулина. Нелетучие буферы включают в себя те буферы, которые не испаряются аналогично воде при сушке/лиофилизации. Подходящие нелетучие буферы включают, например, глициновый буфер, цитратный буфер, фосфатный буфер и тому подобное. В конкретных случаях нелетучий буфер представляет собой глициновый буфер или цитратный буфер.

Сушка инсулина с нелетучим буфером может осуществляться с использованием методов сушки распылением, методов сублимационной сушки, способов лиофилизации, методов вакуумного центрифугирования, и т.д. Методы сушки распылением хорошо известны специалистам в данной области техники. Сушка распылением включает стадии распыления раствора, содержащего один или несколько сухих остатков (например, терапевтическое вещество) через носик вращающегося диска или другого устройства с последующим выпариванием растворителя из капель. Свойства порошка, которые приводят к функции нескольких переменных, включая начальную концентрацию раствора, распределение по размеру полученных капель и скорость удаления растворителя. Полученные частицы могут содержать агрегаты первичных частиц, которые состоят из кристаллов и/или аморфных веществ в зависимости от скорости и условий удаления растворителя. Процесс сушки распылением для получения сверхтонких порошков лекарственных средств описаны, например, в патенте США № 6051256. Процесс сублимационной сушки хорошо известен из уровня техники и описан, например, в патентах США № 4608764 и № 4848094. Процесс лиофильной сушки описан, например, в патенте США № 5208998. Другие способы сушки распылением описаны в патентах США №№ 6253463; 6001336; 5260306 и международных публикациях РСТ №№ WO 91/16882 и WO 96/09814.

Способы лиофилизации хорошо известны специалистам в данной области техники. Лиофилизация представляет собой технику сушки, которая протекает, когда продукт находится в замороженном состоянии и под вакуумом (сублимация льда под вакуумом) и сушат путем умеренного нагревания. Эти условия стабилизируют продукт и минимизируют окисление и другие процессы разрушения. Условия сублимационной сушки позволяют проводить процесс при низких температурах, тем самым термически неустойчивые продукты могут быть сохранены. Стадии в сублимационной сушке включают предварительную обработку, замораживание, первичную сушку и вторичную сушку. Предварительная обработка включает любой способ обработки продукта до заморозки. Это может включать концентрирование продукта, исправление лекарственной формы (т.е. добавление компонентов для увеличения стабильности и/или улучшения обработки), снижение высокого давления пара растворителя или увеличение площади поверхности. Способы предварительной обработки включают концентрирование замораживанием, концентрирование жидкой фазы и приготовление лекарственной формы, в частности, для сохранения свойств продукта или для обеспечения защиты лиофилизата для реакционноспособных продуктов, и описаны, например, в патенте США No. 6199297. "Стандартные" условия лиофилизации описаны, например, в патенте США No. 5031336, и в "Freeze Drying of Pharmaceuticals" (DeLuca, Patrick P., *J. Vac. Sci. Technol.*, vol. 14, No. 1, January/February 1977); и "The Lyophilization of Pharmaceuticals: A Literature Review" (Williams N.A. and G.P. Polli, *Journal of Parenteral Science and Technology*, vol. 38, No. 2, March/April 1984). В некоторых аспектах цикл лиофилизации может быть частично осуществлен выше температуры стеклования (T_g) инсулина, чтобы вызвать разрушение массы для образования густого сгустка, содержащего остаточную влагу. В других вариантах осуществления цикл лиофилизации осуществлялся ниже температуры стеклования инсулина в целях недопущения разрушения для достижения полного высухания частиц инсулина.

С. Апротонный полярный растворитель.

После сушки получают инсулин, имеющий свою выбранную память рН, сухой инсулин может затем быть восстановлен и солюбилизирован в апротонном полярном растворителе. Апротонные полярные

растворители включают в себя те растворители, которые не содержат замещаемый водород карбоксильной группы. Это свойство полезно в поддержании памяти рН сухого инсулина. Неограничивающие примеры апротонных полярных растворителей включают диметилсульфоксид (DMSO), диметилформамид (DMF), этилацетат, n-метилпирролидон (NMP), диметилацетамид (DMA), пропиленкарбонат и их смесь. Каждый из этих растворителей хорошо известен и коммерчески доступен от большого числа источников.

Как показано в примерах, сольubilизация инсулина приводит к стабильным мономерным и димерным формам инсулина, которые могут привести к сверхбыстрому и быстродействующему продукту инсулина. Кроме того, и, как уже отмечалось, и, не желая быть связанной теорией, полагают, что сольubilизированный инсулин является "метастабильным" в апротонном полярном растворителе. Считается, что эта метастабильность происходит из сочетания памяти рН инсулина и растворимости инсулина в апротонном полярном растворителе.

D. Ингредиенты для снижения агрегации инсулина.

Дополнительные ингредиенты могут быть добавлены к лекарственной форме, чтобы дополнительно снизить вероятность агрегации мономерных и/или димерных форм инсулина. Эти ингредиенты могут применяться для снижения такой агрегации в лекарственной форме до введения (например, при хранении) или после введения (например, после введения и до всасывания в кровоток субъекта). Такие ингредиенты, которые могут применяться, включают мочевины, хлорид гуанидина, аминокислоты, сахара, полиолы, полимеры, кислоты, сурфактанты или их смесь. Такие ингредиенты являются коммерчески доступными от различных источников.

E. Содержание воды в лекарственных формах.

Лекарственные формы по настоящему изобретению могут иметь низкое содержание влаги или содержание воды посредством использования относительно высокого количества апротонных полярных растворителей. Это может обеспечить дополнительную стабильность для мономерных и димерных форм инсулина, присутствующих в лекарственной форме, снижением вероятности агрегации указанных мономеров и димеров. Например, лекарственные формы по настоящему изобретению могут иметь содержание влаги или содержание воды, которая составляет 20, 19, 18, 17, 16, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025, 0.01, до 0 % по весу или объему лекарственной формы. В некоторых случаях, однако, вода может также применяться как соразтворитель, как например, когда лекарственная форма по настоящему изобретению включает в себя инсулин и прамлинтид.

F. Совместная лекарственная форма инсулина/прамлинтида.

Амилин, β -клеточный гормон, который обычно совместно секретируется с инсулином в ответ на поступление глюкозы, также полностью отсутствует у пациентов с сахарным диабетом 1 типа. Амилин проявляет некоторые глюкорегуляторные эффекты, которые дополняют те инсулина, регулирующие глюкозу после приема пищи. Нативный человеческий амилин не пригоден для клинического или фармацевтического применения из-за некоторых физико-химических свойств, включая недостаточную растворимость, аутоагрегацию и образование амилоидных фибрилл и амилоидных бляшек.

Прамлинтид является аналогом человеческого амилина, полученный селективной заменой пролина на Ala-25, Ser-28 и Ser-29. В нем проявляются неоптимальные физико-химические свойства человеческого амилина, сохраняющего важные метаболические действия. Прамлинтид является широко доступным от различных коммерческих источников (например, Symlin® от Amylin Pharmaceuticals). Прамлинтид обычно вводят через отдельные подкожные инъекции в дополнение к инсулину. Эта практика принята некоторыми субпопуляциями пациентов, но с учетом дополнительных инъекций создает значительную нагрузку на пациентов, ранее вводимых инсулин несколько раз в день. Также не исключено, что некоторые пациенты случайно или преднамеренно смешивают прамлинтид и инсулин в одном шприце перед инъекцией, что приведет к неблагоприятному или нежелательному результату.

Одной из причин отдельного введения прамлинтида и инсулина является то, что эти лекарственные препараты конфликтуют в их системах буферизации, делая совместимость смешанной лекарственной формы затруднительной. К примеру, некоторые инсулины и аналоги инсулина обладают изоэлектрической точкой в диапазоне 5-6 и, таким образом, их изготавливают при рН около 7. Прамлинтид имеет изоэлектрическую точку >10.5 , является оптимально стабильным при низком рН и изготавливается при рН, как правило, около 4. Взаимодействие лекарственных форм прамлинтида и инсулина при различных рН и различной буферизирующей емкости часто приводит к преципитации растворимых компонентов инсулина или сольubilизации кристаллических компонентов инсулина. Исследования *in vitro* с лекарственными формами прамлинтида и инсулина короткого и длительного действия выявили значительную изменчивость в растворимости инсулина, когда различные количества инсулина смешивали с постоянными количествами прамлинтида.

Эти проблемы разработки совместной лекарственной формы решены настоящим изобретением. К примеру, прамлинтид можно высушить в такой буферной системе, которая имеет память рН между 1 и 5, или 2, 3, или 4, или, конкретнее, около 2. Инсулин можно высушить в той же или отдельной буферной системе, которая имеет память рН около 1 до 4, 1 до 3, или около 2, или 6 до 8 или около 7. Высушенный прамлинтид и инсулин могут затем быть восстановлены и сольubilизованы в одном апротонном по-

лярном растворителе и сохранять свои соответствующие свойства растворимости и стабильности в одной лекарственной форме. Таким образом, только одна лекарственная форма необходима для введения обоих как прамлингида, так и инсулина субъекту. Такая совместная лекарственная форма снижает резистентность у субъектов к терапии, которая более подробно имитирует естественную физиологическую реакцию к повышению уровня глюкозы в крови после приема пищи. В некоторых конкретных случаях совместной лекарственной формы память рН инсулина может быть приблизительно 2, а память рН прамлингида может быть приблизительно 2.

Наряду с прамлингидом другие агонисты амилина могут применяться в контексте настоящего изобретения. Такие агонисты могут быть рекомбинантными или очищенными от природного источника. Агонисты амилина могут быть человеческими или нечеловеческими. Агонист амилина может также быть аналогом амилина, который может быть на основе аминокислотной последовательности человеческого амилина, но имеющего одно или несколько аминокислотных различий, или химически модифицированный амилин или аналог амилина. Доза агониста амилина зависит от его биодоступности и пациента, подвергающегося лечению. "Человеческий амилин" включает человеческий пептидный гормон, секретруемый поджелудочной железой, либо выделенный из природного источника, приготовленный посредством химии синтетических пептидов или полученные с помощью генетически измененных микроорганизмов. "Аналог амилина" представляет собой измененный амилин, отличный от амилина, секретруемого поджелудочной железой, но все равно доступных для организма для осуществления таких же действий как природный амилин.

G. Режим дозирования.

Любая подходящая доза инсулина, прамлингида или сочетания обоих можно вводить с использованием лекарственных форм по настоящему изобретению. Вводимая доза будет, конечно, изменяться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного лекарственного препарата, соли или их сочетания; возраста, состояния здоровья или массы тела субъекта; характер и степень проявления симптомов; метаболические характеристики терапевтического вещества и пациента, вид сопутствующего лечения; частота лечения или желательные эффекты. Как правило, инсулин может присутствовать в лекарственной форме в количестве, изменяющемся от приблизительно 0.5 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения, инсулин присутствует в лекарственной форме в количестве, изменяющемся от приблизительно 3 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл, от 3 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл, от 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл или от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл. В определенных аспектах количество инсулина с лекарственной формой изменяется от приблизительно 3 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл, которое может привести к значительной доле инсулина, присутствующей в мономерной форме (см. данные в примерах). В других случаях количество инсулина с лекарственной формой изменяется от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, которое может привести к большей части инсулина, присутствующего в димерной форме (см. данные в примерах). В некоторых вариантах осуществления прамлингид присутствует в лекарственной форме в количестве, изменяющемся от 0.1 до 10 мг/мл, или 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, или 9 мг/мл или по мере необходимости. Кроме того, это будет очевидно для специалиста в данной области техники, что режим дозирования лекарственного вещества может быть изменен в зависимости от применяемого лекарственного средства и заболевания, расстройства или состояния, подвергающегося лечению, и концентрация лекарственного вещества в лекарственной форме будет изменяться в зависимости от растворимости лекарственного вещества, дозы и способа введения.

H. Дополнительные ингредиенты/фармацевтические наполнители.

Лекарственные формы по настоящему изобретению могут включать дополнительные ингредиенты/фармацевтические наполнители для дополнительной разработки формулы для достижения желаемых тактильных свойств, диапазона вязкости или дополнительной защиты инсулина или прамлингида. К примеру, лекарственные формы могут дополнительно включать любой из, любое сочетание из или все антиоксиданты (неограничивающие примеры которых включают аскорбиновую кислоту, цистеин, метионин, триглицерин, тиосульфат натрия, ВНТ, ВНА, аскорбил пальмиат, пропилгаллат или витамин Е или любой их сочетание); хелатирующее вещество (неограничивающие примеры которых включают EDTA, EGTA, винную кислоту и ее соли, глицерин и лимонную кислоту и ее соли); и/или консерванты (неограничивающие примеры которых включают алкиловый спирт, бензиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен или их смесь). Кроме того, лекарственные формы по настоящему изобретению могут также включать безводный протонный растворитель (неограничивающие примеры которых включают полиэтиленгликоль (PEG), пропиленгликоль (PG), поливинилпирролидон (PVP), метоксипропиленгликоль (MPEG), глицерин, гликофуrol и их смесь).

I. Наборы/контейнеры.

Наборы также предусмотрены в качестве используемых в некоторых аспектах настоящего изобретения. К примеру, лекарственная форма по настоящему изобретению может быть включена в набор. Набор может включать контейнер. В одном аспекте, к примеру, лекарственная форма может содержаться в контейнере, который подготовлен для парентерального введения субъекту без необходимости восста-

новления или разбавления лекарственной формы. То есть лекарственная форма для введения может храниться в контейнере и быть легко использована при необходимости. Контейнером для хранения может быть шприц, шприц-ручка, устройство автоматического инжектора или насос. Подходящие ручка/устройство автоматического инжектора включают, но не ограничиваются ими, такие ручка/устройство автоматического инжектора, изготовленные Becton-Dickenson, Swedish Healthcare Limited (SHL Group), YpsoMed Ag, и тому подобное. Подходящие устройства насоса включают, но не ограничиваются ими, такие устройства насоса, изготовленные Tandem Diabetes Care, Inc., Delsys Pharmaceuticals и тому подобное. Кроме того, набор по настоящему изобретению может включать несколько контейнеров или несколько отделений в контейнере. Каждый контейнер или несколько отделений могут быть использованы для хранения, к примеру, биосовместимого безводного растворителя и низкомолекулярное лекарственное средство отдельно. Затем, при необходимости, растворитель и лекарственное вещество могут быть смешаны и сразу введены или храниться в течение дальнейшего времени, по необходимости.

J. Способ изготовления лекарственной формы.

Лекарственные формы по настоящему изобретению могут быть изготовлены с помощью следующих стадий. Эти стадии были использованы для изготовления лекарственных форм в примерах описания.

1. Водный инсулин получают путем растворения порошка инсулина (например, рекомбинантного человеческого инсулина, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) в необходимом водном буфере (включающем конкретный буферный вид, концентрацию и pH; например, лимонная кислота, pH 2.0) при концентрации инсулина 10 мг/мл.

2. Прамлинтид (например, AmbioPharm, Inc., Beech Island, SC and C S Bio, Inc., Menlo Park, CA, который применяли в примерах описания) может быть получен аналогичным образом, за исключением того, что прамлинтид может быть растворен в водном буфере при концентрации 2 мг/мл.

3а. Растворы инсулина или прамлинтида распределяют в чистые флаконы для ВЭЖХ или лиофилизации и лиофилизируют согласно следующему или аналогичному циклу лиофилизации в табл. 1.

Таблица 1

Стадия	Температурные условия	Частота/Продолжительность	Вакуум (мторр)
Загрузка полки	5 °C	1 ч	N/A
Замораживание	-50 °C	1 °C/мин	N/A
Выдержка льда	-50 °C	2 ч	N/A
Интервал для отжига	-15 °C	1 °C/мин	N/A
Отжиг	-15 °C	1 ч	N/A
Первичная сушка	-15 °C	24 ч	100
Интервал для вторичной	25 °C	1 °C/мин	100
Вторичная сушка	25 °C	8 ч	100
Закупоривание	25 °C		100

3б. Кроме того, раствор водного инсулина или прамлинтида распределяют в микроцентрифужные пробирки и высушивают центрифугированием под вакуумом и умеренном нагревании (25-30°C).

4. Сухой порошок инсулина и прамлинтида при выбранной памяти pH растворяют в DMSO путем осторожного пепитирования до желаемой концентрации или концентрации допускаемой конкретной буферной системой и pH.

5. Полученные растворы оценивают визуально для наглядности и/или анализируют на рассеивание света с использованием спектроскопии в видимой области при 630 нм и применяют в различных последующих применениях.

Примеры

Настоящее изобретение будет описано более подробно с помощью конкретных примеров. Следующие примеры предложены для иллюстрации и не предназначены для ограничения изобретения любым образом. Специалисты в данной области техники будут понятны различные не критические параметры, которые могут быть изменены или модифицированы для получения, по существу, одинаковых результатов.

Пример 1.

Данный пример предоставляет сведения о том, как приготовить лекарственные формы инсулина/DMSO, в которых инсулин имеет память pH около 2. Сравнительные показатели лекарственных форм инсулина/H₂O также приведены и применяются для анализа преобразования Фурье в инфракрасной области (FTIR) и динамического рассеяния света (DLS) (рассматриваемых ниже в примерах 2 и

3 соответственно). Следует отметить, что инсулин, применяемый в примерах настоящего описания, был рекомбинантным немодифицированным человеческим инсулином, приобретенным от Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO).

Инсулин/буфер А/DMSO.

Рекомбинантный человеческий инсулин (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) растворяли в концентрации 10 мг/мл в буфере А (т.е. 10 мМ лимонная кислота+1 мМ EDTA, pH 2.0), распределяли в HPLC флаконы в 0.25 мл-аликвотах и лиофилизировали согласно способу, предусмотренному в стадиях 1-5, указанных выше в разделе "Способ изготовления лекарственной формы". Лيوфилизированный инсулин в каждом флаконе имел память pH 2.0 и был восстановлен с 100 мкл DMSO до концентрации 25 мг/мл (инсулин солибилизировали в DMSO с визуальным контролем). Аликвоты из данного исходного раствора затем дополнительно разводили с буфером А для получения растворов цитратно-буферизированного инсулина/DMSO/H₂O при желании (например, 12.5 и 5 мг/мл инсулина в DMSO или буфере А). Эти лекарственные формы называют "Ins-A/DMSO" или указаны их разведения.

Инсулин/буфер А/H₂O.

Инсулин растворяли в концентрации 10 мг/мл в дистиллированной деионизованной воде и лиофилизировали в 0.25 мл аликвотах. Источник инсулина и процесс лиофилизации были такими же, как они описаны выше. Флаконы восстанавливали с 250 мкл буфера А (т.е. H₂O+10 мМ лимонная кислота+1 мМ EDTA, pH 2.0), которые изготавливали раствор инсулин в растворе буфера А при 10 мг/мл. Аликвоты данного исходного раствора затем дополнительно разводили с буфером А для получения растворов инсулина/буфера А, как описано (например, 5 мг/мл инсулина в буфере А). Инсулин солибилизировали в буфере А под визуальным контролем. Данные лекарственные формы называются "Ins-A/H₂O." Инсулин/буфер Е/DMSO: Инсулин растворяли в концентрации 10 мг/мл в буфере Е (т.е. H₂O+10 мМ лимонная кислота+1 мМ EDTA+10 мМ NaCl, pH 2.0) и лиофилизировали в 0.5 мл аликвотах. Источник инсулина и процесс лиофилизации были такими же, как описано выше. Лيوфилизированный инсулин в каждом флаконе имел память pH 2.0 и был восстановлен с 100 мкл DMSO до концентрации 50 мг/мл. Инсулин солибилизировали в DMSO под визуальным контролем. Аликвоты данного исходного раствора затем дополнительно разводили с DMSO для получения растворов инсулина/DMSO при желании (например, 30, 25, 10, 5, и 3 мг/мл инсулина в DMSO). Данные лекарственные формы называются "Ins-E/DMSO."

Инсулин/буфер Е и F/H₂O.

Инсулин растворяли в концентрации 10 мг/мл в дистиллированной деионизованной воде, и лиофилизировали в 0.5 мл аликвотах. Источник инсулина и процесс лиофилизации были такими же, как описанные выше. Один флакон восстанавливали с 500 мкл буфера Е, которые изготавливали раствор инсулина в буфере Е при 10 мг/мл. Другие флаконы восстанавливали с 500 мкл буфера F (т.е. H₂O+10 мМ фосфатно-цитратный+1 мМ EDTA+10 мМ NaCl, pH 7.0), который изготавливали инсулина в растворе буфера F при 10 мг/мл. Растворы инсулина солибилизировали как в буфере Е, так и в F под визуальным контролем. Эти образцы называются "Ins-E/H₂O" и "Ins-F/H₂O" соответственно.

Пример 2.

Данный пример приводит данные FTIR, показывающие влияние DMSO на конформацию инсулина. BioTools Inc. (Jupiter, Florida USA) осуществляли анализ FTIR и предоставили соответствующие данные (см. ниже).

Материалы и методы для анализа FTIR.

Следующие лекарственные формы были приготовлены для анализа FTIR:

Формула 1 (F1):	Ins-A/DMSO растворяли в 1 части буфера А до 12.5 мг/мл.
Формула 2 (F2):	Ins-A/H ₂ O растворяли до 5 мг/мл с буфером А.
Formula 3 (F3):	Ins-A/H ₂ O восстанавливали до 10 мг/мл с буфером А.
Formula 4 (F4):	Ins-A/DMSO при 25 мг/мл.
Formula 5 (F5):	Ins-A/DMSO растворяли с 4 частями буфера А до 5 мг/мл.

ИК-спектры на основе преобразования Фурье были собраны на ИК-спектрометре Фурье PROTA (BioTools, Inc), снабженном детектором DTGS при 4 см-1 разрешением с временем собирания 20 мин для каждого образца и буфера. Образцы растворяли, как описано, и помещали в 6 мкм BioCell с окном CaF₂ для образцов на водной основе и 75-мкм для образцов на основе DMSO. Все спектральные анализы (вычитание буфера и идентификация структуры) осуществляли с использованием комплекта программного обеспечения PROTA.

Результаты.

На фиг. 1 показаны ИК-спектры на основе преобразования Фурье в конформационно-чувствительном амид 1 участке. Эти данные подтверждают, что инсулин не необратимо разворачивается в DMSO, так как профиль инсулина остается относительно постоянным в отношении формул 1-5, которые были изучены. В частности, формула 3 показывает обычный спектр инсулина, свидетельствующий о

смешанных белках со структурой α -спирали и β -листа. Формула 4 показывает переход к более высокой частоте, при этом сохраняет свой профиль. Это может быть результатом конформационного изменения или более сильным характером водородной связи растворителя DMSO. Формула 5 является по сути идентичной спектру водного раствора инсулина. Эти данные в фиг. 1 подтверждают, что инсулин не необратимо развернулся в DMSO.

Пример 3.

Этот пример представляет DLS анализ для подтверждения связанного состояния инсулина (т.е. мономерная форма, димерная форма, гексамерная форма) в DMSO с сопоставлением с контрольными образцами. Лаборатория Alliance Protein Laboratories (Thousand Oaks, California USA) осуществляла DLS анализ и предоставила соответствующие данные (см. ниже). Следует отметить, что системы буфера E и буфера F применяли в связи с присутствием NaCl, который необходим для выполнения DLS анализа.

Материалы и методы для DLS анализа.

Следующие лекарственные формы получали для DLS анализа:

Формула 6 (F6): Ins-E/DMSO при 50 мг/мл.

Формула 7 (F7): Ins-E/DMSO при 30 мг/мл.

Формула 8 (F8): Ins-E/DMSO при 10 мг/мл.

Формула 9 (F9): Ins-E/DMSO при 3 мг/мл.

Формула 10 (F10): Ins-E/H₂O при 10 мг/мл.

Формула 11 (F11): Ins-F/H₂O при 10 мг/мл.

В DLS (также известном как квазиупругое рассеяние света или фотонно-корреляционная спектроскопия) измеряли времязависимые колебания в рассеянном свете. Эти колебания зависели от броуновского движения молекул и, тем самым, могли быть использованы для определения коэффициента диффузии. Этот коэффициент диффузии обычно преобразуется в гидродинамический (Стокса) радиус, R_h , посредством соотношения Стокса-Эйнштейна

$$R_h = k_B T / 6\pi\eta D$$

где k_B представляет собой постоянную Больцмана, T представляет собой абсолютную температуру, η представляет собой вязкость растворителя, и D представляет собой коэффициент диффузии.

Данные были собраны при регулируемой температуре 25°C с использованием растворов Protein Solutions (с настоящее время Wyatt Technology) DynaPro MS/X инструментом с использованием 12 мкл кварцевых рассеивающихся клеток. Образцы центрифугировали в течение 10 мин в микроцентрифуге (модель Fisher 235 A) для удаления пыли и крупных частиц до загрузки в аналитическую кювету. Как правило, 25 десятисекундных сбор данных регистрировались и усреднялись для улучшения сигнала/шума. Полученные данные анализировали с программным обеспечением Dynamics version 6.12.0.3, обеспеченным производителем. Средние (z -усредненные) размеры основывались на методе кумулянтов. Распределение по размерам подсчитывалось с использованием метода анализа Dynals. Массовая доля подсчитывалась с использованием модели шара Ralleigh. Калибровка измерительных приборов является точной, основанной на единице времени и расстоянии (с расстоянием измеряется длина волны источника света). Кроме того, что калибровку измерительных приборов подтверждают ежегодно с использованием точно измеренных латексных гранул стандартных размеров (диаметр 21 ± 1.5 нм, продукт 3020A lot 35266 от Thermo Scientific). Индекс вязкости DMSO назначали как 1.991 ср и 1.4768.

Общие результаты.

Состояние агрегации инсулина в DMSO исследовали с использованием динамического рассеяния света (DLS). Истинная MW мономерного инсулина приблизительно 6 кДа. Следовательно, димерный инсулин должен был иметь истинную MW 12 кДа, а гексамерный инсулин 36 кДа. На фиг. 2 суммирована средняя молекулярная масса (MW) инсулина, измеренная в приготовленном DMSO и водных растворах (т.е. формулы 6-10). Средняя MW инсулина в водных лекарственных формах при pH 7.0 и концентрации 10 мг/мл (формула 10) составляла 53 кДа. При этой высокой концентрации раствор являлся, вероятно, неидеальным, с межмолекулярными эффектами, приводящими к средней MW, которая больше, чем истинная MW. Несмотря на это измеренная средняя MW указывала на инсулин в гексамерном состоянии.

Что касается лекарственных форм инсулина/DMSO при 10 мг/мл (формула 7), средняя MW составляла 16 кДа, приблизительно одну треть MW водного инсулина при 10 мг/мл (формула 10), указывая, что инсулин в DMSO связывался как димер при этой концентрации. Это также проявлялось в случае концентраций выше 50 мг/мл (формулы 8-9), как приблизительная линейная разница средней MW, наблюдаемая с увеличением концентрации, являлась, вероятно, артефактом эффекта исключенного объема, типичного для данного способа. Кроме того, снижение в средней MW до 13 кДа при 3 мг/мл (формула 6) отклонялось от этого направления и указывало, что обратимая диссоциация до мономера сохранялась при этой концентрации.

Эти DLS исследования показали, что в отношении интервала применения подходящих концентраций, максимальным мультимерным состоянием INS-2E в DMSO являлся димер, а на низших точках ин-

тервала концентрации сохранялось равновесие мономер-димер. Это результаты в отличие от водных лекарственных форм инсулина, где преобладал гексомер - даже в отсутствие цинка - и мономера является нестабильным и быстро свертывался. Исходя из текущих кинетических моделей связывания и всасывания инсулина, предполагалось, что лекарственная форма инсулина, лишенная гексамерного инсулина, приводила к кинетике поглощения более быстрой, чем у существующих быстродействующих инсулинов (например, Lispro®, Aspart® и т.д.), которые до сих пор содержали значительные количества гексамерного инсулина. В совокупности эти физико-химические исследования показали, что подход с использованием нелетучего растворителя для разработки сверхбыстродействующей лекарственной формы инсулина наиболее вероятно будут иметь успех, чем водный подход. В водном растворе, включающем быстродействующие лекарственные формы, мономерный инсулин являлся нестабильным и преобладала гексамерная форма, тогда как в DMSO более быстро всасывающийся мономер/димер инсулина являлся термодинамически предпочтительным, даже при относительно высоких концентрациях. Кроме того, эти данные (включающие данные DLS- и ИК-спектров на основе преобразования Фурье) показали, что любые конформационные изменения, которые появлялись индукцией с помощью DMSO, являлись обратимыми при восстановлении в водной среде.

Конкретные результаты для формулы 6 (Ins-E/DMSO при 50 мг/мл).

Распределение по размеру (гистограмма интенсивности рассеянного излучения против гидродинамического радиуса) для Ins-E при 50 мг/мл в DMSO показано на фиг. 3. Основной пик (по весу) являлся первым пиком, который имел средний радиус 2.12 нм и представлял 34.7% от общей интенсивности рассеянного излучения. Такой радиус соответствовал молярной массе приблизительно 20 кДа на основе водных стандартов глобулярных белков. В дополнении к основному пику определены три пика при наибольших радиусах при среднем значении радиусов 110 нм, 2.29 и 9.85 мкм. Хотя эти 3 других пика способствовали около 2/3 от общей интенсивности рассеянного излучения, они фактически представляли собой незначительную долю на процентное отношение к основной массе, как оценено в табл. 2 ниже. Это, к сожалению, невозможно для получения полноценной доли путем весовой нагрузки для видов больше чем 1 мкм, потому что 1) рассеяние от таких больших частиц очень зависело от подробной формы частиц (в связи с внутренним отражением), и 2) почти весь рассеянный свет излучался в прямом направлении, только очень маленькая доля под углом 90°, наблюдаемая здесь. Некоторые или все эти другие виды могли быть контаминацией или не полностью растворенными компонентами буфера, а не агрегатами инсулина.

Таблица 2*

Обобщенные результаты для Ins-E при 50 мг/мл в DMSO

Пик #	Средний радиус (нм)	Предполагаемая молярная масса	Доля интенсивности	Доля по весу (%)
1	2.12	20 кДа	34.7	99.970
2	110	200 МДа	54.5	0.030
3	2,290	250 гДа	5.6	**
4	9,850	7.4 ТДа	5.2	**

*z - средний радиус 24.5 нм; средняя интенсивность 182 kcnt/c,

** - массовая доля для видов этих больших не могут быть достоверно оценены, таким образом, этот пик был исключен из этого расчета.

Конкретные результаты для формулы 7 (Ins-E/DMSO при 30 мг/мл).

Распределение по размеру, полученное для INS-E при 30 мг/мл в DMSO, показано на фиг. 4. При этой концентрации основной пик переходил к несколько более низкому радиусу 2.02 нм (расчетная масса 17 кДа). В частности, виды при 2.29 и 9.85 мкм больше не определялись, что давало веские основания предполагать, что это были компоненты буфера, которые уже растворились. Относительная интенсивность видов около 100 нм также существенно снизилась. При этой концентрации определялись новые виды при 17.7 нм. В связи с тем, что виды представляли только 1.9% от общего рассеянного света, возможно, что эти виды присутствовали на том же уровне в образце при 50 мг/мл, но не определялись, потому что они растерялись в ярком свете (сильное рассеивание света от видов при 100 нм и больше). Исходные данные от DLS (автокорреляционная функция) имели ограниченный динамический интервал, и это значило, что виды, которые представляли меньше чем ~1% от общего рассеянного света, часто выпадали ниже порога обнаружения. Обобщенные результаты этих данных приведены в табл. 3 для формулы 7.

Таблица 3*

Обобщенные результаты для Ins-E при 30 мг/мл в DMSO

Пик #	Средний радиус (нм)	Предполагаемая молярная масса	Доля интенсивности	Доля по весу (%)
1	2.02	17 кДа	76.7	99.9932
2	17.7	2.8 МДа	1.9	0.0037
3	102	170 МДа	21.4	0.0031

*z - средний радиус 2.12 нм; средняя интенсивность 77.9 kcnt/c.

Конкретные результаты для формулы 8 (Ins-E/DMSO при 10 мг/мл).

Распределение по размеру при 10 мг/мл в DMSO показано на фиг. 5. Разведение дополнительно смещало основной пик вплоть до 1.94 нм (расчетная масса 16 кДа). При этой концентрации пик при 17.7 нм не определялся, и относительная интенсивность видов около 100 нм понижалась дополнительно. Остатки крупных частиц при 5.45 мкм также присутствовали (но удаление таких видов путем центрифугирования иногда не полное). В табл. 4 приведена краткая информация данных для формулы 8.

Таблица 4*

Обобщенные результаты для Ins-E при 10 мг/мл в DMSO

Пик #	Средний радиус (нм)	Предполагаемая молярная масса	Доля интенсивности	Доля по весу (%)
1	1.94	16 кДа	87.1	99.9975
2	115	220 кДа	12.2	0.0025
3	5450	1.9 ТДа	0.7	**

*z - средний радиус 1.07 нм; средняя интенсивность 43.1 kcnt/c.

** - массовая доля для видов этих больших не могут быть достоверно оценены, таким образом, этот пик был исключен из этого расчета.

Конкретные результаты для формулы 9 (Ins-E/DMSO при 3 мг/мл).

Распределение по размеру при 3 мг/мл в DMSO показано на фиг. 6. При этой концентрации пик приходился на 1.79 нм (расчетная масса 13 кДа). При этой концентрации определялся новый пик при 6.34 нм, который мог представлять небольшое количество агрегатов инсулина (возможно, полученные путем лиофилизации). Пик встречался в этом образце при 60.8 нм, возможно, такого же материала, измерялся как 100-110 нм при высоких концентрациях - кажущийся сдвиг мог быть связан либо с низким сигналом/шумом при этой концентрации или мог быть результатом разрешения нового пика при 6.34 нм. В табл. 5 приведены суммарные данные для формулы 9.

Таблица 5*

Обобщенные результаты для Ins-E при 3 мг/мл в DMSO

Пик #	Средний радиус (нм)	Предполагаемая молярная масса	Доля интенсивности	Доля по весу (%)
1	1.79	13 кДа	84.7	99.9393
2	6.34	250 кДа	2.2	0.060
3	60.8	50 МДа	13.1	0.0009

*z - средний радиус 0.24 нм, средняя интенсивность 31.4 kcnt/c.

Конкретные результаты для формулы 10 (Ins-E/H₂O).

Распределение по размеру для Ins-H₂O в буфере E (pH 2.0) показано на фиг. 7. Основной пик возник при радиусе 3.08 нм. Данный радиус соответствовал расчетной массе 47 кДа, предполагая, что образцы все еще преобладал гексамер (или больше) при таком низком pH. Следует отметить, что при концентрации раствора 10 мг/мл неидеальные ("молекулярный краудинг") воздействия могли быть вызваны некоторыми искажениями размера, но было ли это искажение в большую или меньшую сторону зависело от того, будут ли преобладать электростатические или эффекты исключенного объема. Остатки крупных видов были также определены при 27 и 165 нм, но являлось ли это агрегатами инсулина или контаминирующими частицами не совсем ясно. В табл. 6 представлены суммарные данные для формулы 10.

Таблица 6*

Обобщенные результаты для Ins-H₂O при 10 мг/мл в буфере E

Пик #	Средний радиус (нм)	Предполагаемая молярная масса	Доля интенсивности	Доля по весу (%)
1	3.08	47 кДа	67.5	99.894
2	27.0	7.5 МДа	20.5	0.053
3	165	520 МДа	12.0	0.053

*z - средний радиус 4.06 нм; средняя интенсивность 375 kcnt/c.

Конкретные результаты для формулы 11 (Ins-F/H₂O).

Распределение по размеру для Ins-H₂O в буфере F (pH 7.0) показано на фиг. 8. Основной пик возник при радиусе 3.26 нм. Данный радиус соответствовал расчетной массе 53 кДа. И в этом случае при 10 мг/мл раствора неидеальное влияние могло быть вызвано некоторыми искажениями размера, но нижний заряд при нейтральном pH, вероятно, означал, что исключенный объем преобладал, а значит кажущийся размер был немного больше, чем точный размер. Остатки крупных видов были также обнаружены при 35 и 238 нм. В табл. 7 представлены суммарные данные для формулы 11.

Таблица 7*

Обобщенные результаты для Ins-H₂O при 10 мг/мл в буфере F

Пик #	Средний радиус (нм)	Предполагаемая молярная масса	Доля интенсивности	Доля по весу (%)
1	3.26	53 кДа	77.2	99.9688
2	35.0	14 МДа	18.2	0.023
3	238	1.2 ГДа	4.6	0.0078

*z - средний радиус 3.80 нм; средняя интенсивность 447 kcnt/c.

Пример 4.

Этот пример предоставляет данные в отношении совместных композиций инсулина/прамлинтида в контексте лекарственных форм по настоящему изобретению. Растворимость прамлинтида в DMSO и со-растворителе DMSO-вода: Растворы прамлинтида приготавливали в концентрации 2 мг/мл в 10 мМ лимонной кислоте, pH 2.0 или 10 мМ лимонной кислоте, pH 4.0, каждый с использованием или без 2 мг/мл трегалозы. Растворы высушивали путем центрифугирования под вакуумом в течение приблизительно 3.5 ч при 25-30°C, или лиофилизировали, как описано выше. Сухой цитратно-буферизированный прамлинтид с памятью pH 2.0 (с использованием или без трегалозы) полностью растворяли в чистом DMSO в течение нескольких минут с периодическим осторожным пепитированием при 20 мг/мл (изучали самую высокую концентрацию). Полученный раствор был жидкотекучим и полностью чистым при визуальной проверке.

Сухой цитратно-буферизированный прамлинтид с памятью pH 4.0 был несколько устойчивым к восстановлению к исходной концентрации 2 мг/мл в чистом DMSO, и эффективно не растворим в воде. Добавление между 6 и 10% воды к прамлинтиду в DMSO при заданных концентрациях прамлинтида между 2 и 5 мг/мл приводило к улучшению или почти полной растворимости пептида, как измерено при визуальной проверке.

Совместная лекарственная форма инсулина и прамлинтида.

Совместную лекарственную форму инсулина и прамлинтида приготавливали следующим образом: рекомбинантный человеческий инсулин растворяли в концентрации 10 мг/мл в буфере 10 мМ лимонная кислота/1.0 мМ EDTA, pH 2. Прамлинтид растворяли в концентрации 2 мг/мл в 10 мМ лимонной кислоте, pH 2.0, с использованием или без 2 мг/мл трегалозы. Растворы высушивали путем центрифугирования под вакуумом в 0.5-мл аликвотах, как описано выше. Инсулин восстанавливали с 50 мкл DMSO до концентрации 100 мг/мл, а прамлинтид восстанавливали с 50 мкл DMSO до концентрации 20 мг/мл. Равные объемы растворов пептида-DMSO смешивали для получения комбинированного раствора 50 мг/мл инсулина и 10 мг/мл прамлинтида с использованием или без 10 мг/мл трегалозы. Растворы были жидкотекучими и полностью чистыми при визуальной проверке. Соотношение 5:1 (мас./мас.) инсулина:прамлинтида являлось одним из возможных представлений соотношения терапевтической дозы, и пептиды сохраняли стабильность в одном высококонцентрированном растворе в течение 6 ч при визуальной проверке. С уже существующими технологиями лекарственных форм эти пептиды требовали отдельных и несмешиваемых буферных систем, которые, в свою очередь, вводились через отдельные инъекции в разные участки тела - существенный барьер для выполнения этого полезного лечения.

Пример 5.

Это является примером возможного использования для определения биологической активности, фармакологической и фармакокинетической возможностей лекарственных форм по настоящему изобретению по сравнению с существующими быстродействующими продуктами инсулина (например, Aspart®, Glulisine®, Lispro®).

Биологическая активность.

Действие инсулина на клеточном уровне включает связывание с рецептором инсулина (IR), рецептором аутофосфорилирования, IR-опосредованное фосфорилирование субстратов рецептора инсулина и последующую активацию каскада PI3 киназный-Akt. Рецепторное связывание определяется, частично, путем связанного состояния молекулы инсулина, и, следовательно, может измерять не только общую биологическую активность лекарственной формы инсулина, но также мульти- (или моно-) мерное состояние пептида. Биологическая активность лекарственных форм по настоящему изобретению может быть измерена и сравнена путем их способности вызывать IR фосфорилирование в мышечных зародышевых фибробластах, которые сверхэкспрессируют IR-B изоформу (основной вариант находится в инсулин-чувствительной ткани), с использованием набора твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) от R&D Systems. Поскольку IR связывание отдельно не обязательно определяло нисходящие сигналы, более близкие к конечной биологической реакции, такой как регулирование глюкозы и усвоение жирных кислот и липолиз, клеточный лизат мог аналогично количественно оценен на фосфорилированный Akt (см. Marks A.G., et al. (2011), "Plasma distribution and signaling activities of IGF-II precursors. *Endocrinology*," 152:922-930; Denley A., et al. (2007), "Differential activation of insulin receptor substrates (IRS)-1 and 2 by IGF-activated insulin receptors," *Mol. Cell. Biol.* 27:3569-3577 and Denley A., et al. (2006), "Differential activation of insulin receptor isoforms by insulin-like growth factors is determined by the C do-

main," Endocrinology, 147:1029-1036, все из которых включены посредством ссылки).

Фармакология.

Фармакологические исследования могут быть выполнены с использованием модели бодрствующей свиньи, которой вливали октреотид с подкожным постоянным портом сосудистого доступа (VAP). Бодрствующая модель йоркширской свиньи, не страдающая диабетом, могла быть использована исходя из а) углеводов, физиологически похожих на человеческие, б) крупных вен, подходящих для установки катетера IV, с) бодрствующая модель исключает осложнения длительной анестезии (ателектаз, пневмония, затруднительная интубация/экстубация), и d) одна свинья могла применяться для нескольких исследований. Исследование может быть выполнено с возможностью изучения лекарственных форм по настоящему изобретению, имеющих подходящую дозу инсулина (напр., 0.2 мг/кг) с использованием временных точек 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, и 240 мин.

Фармакокинетика. Образцы крови могут быть исследованы с использованием валидированного анализа для природного и аналога инсулина в сыворотке свиньи при OHSU (см. Mercodia Iso-Insulin ELISA, Product number 10-1128-01, manufactured by Mercodia AB Uppsala, Sweden). Уровни человеческого инсулина в крови (например, лекарственных форм по настоящему изобретению и относительно водосохраняющих лекарственных форм), а также аналоги инсулина могут быть количественно проанализированы в течение указанного периода времени и сравнены по площади под кривой зависимости концентрации от времени, T_{max} , ранняя $1/2 T_{max}$ и поздняя $1/2 T_{max}$. Первичными конечными точками могут быть ранние и поздние значения $1/2 T_{max}$, которые значительно более чувствительны к изменениям в PK, чем T_{max} . T_{max} часто происходило на длинном плато, которое могло быть затруднительным для измерения и давать неверные результаты, тогда как ранние и поздние значения быстро поднимались и опускались и, тем самым, более надежные.

Все ингредиенты, композиции или способы, раскрытые или заявленные в настоящем описании, могут быть сделаны и осуществлены без лишних экспериментов в свете настоящего раскрытия. Тогда как, ингредиенты, композиции и способы данного изобретения были описаны с учетом конкретных вариантов осуществления, очевидно специалисту в данной области техники, что изменения могут применяться для активных ингредиентов, композиций или способов и в стадиях или в последовательности стадий способа, описанного в настоящей заявке, без отступления от концепции, существа и объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лекарственная форма для парентерального введения, содержащая:
 - а) инсулин, который включает память рН между 1 и 4 или между 6 и 8 и который был предварительно высушен из нелетучего буфера; и
 - б) апротонный полярный растворитель,
 где инсулин является солюбилизованным в апротонном полярном растворителе, где большая часть солюбилизованного инсулина включает стабильные мономерные или димерные формы инсулина или их смесь, и

где содержание воды в лекарственной форме равно или меньше чем 15% мас./об.
2. Лекарственная форма по п.1, где память рН инсулина составляет между 1 и 4, или между 1 и 3, или равна 2.
3. Лекарственная форма по п.1, где память рН инсулина составляет между 6 и 8 или равна 7.
4. Лекарственная форма по любому из пп.1-3, где апротонный полярный растворитель представляет собой диметилсульфоксид (DMSO), n-метилпирролидон (NMP), этилацетат, диметилформамид (DMF), диметилацетамид (DMA) или пропиленкарбонат или их смесь.
5. Лекарственная форма по п.4, где апротонный полярный растворитель представляет собой диметилсульфоксид (DMSO).
6. Лекарственная форма по любому из пп.1-5, где лекарственная форма включает от 3 до 50 мг/мл, от 3 до 10 мг/мл или от 10 до 50 мг/мл инсулина.
7. Лекарственная форма по любому из пп.1-6, где солюбилизованный инсулин представляет собой мономерную форму.
8. Лекарственная форма по любому из пп.1-6, где большая часть солюбилизованного инсулина представляет собой димерную форму.
9. Лекарственная форма по любому из пп.1-8, дополнительно включающая первый ингредиент, который способен снижать агрегацию мономерных или димерных форм инсулина.
10. Лекарственная форма по п.9, где первый ингредиент представляет собой мочевины, гуанидин хлорид, аминокислоту, сахар, полиол, полимер, кислоту или сурфактант или их смесь.
11. Лекарственная форма по п.10, где кислотой является уксусная кислота, аскорбиновая кислота, лимонная кислота, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, янтарная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота или адипиновая кислота или их смесь.
12. Лекарственная форма по любому из пп.1-10, дополнительно включающая соразтворитель.

13. Лекарственная форма по п.12, где соразстворителем является вода.
14. Лекарственная форма по любому из пп.1-13, где лекарственная форма не включает цинк или где цинк присутствует в лекарственной форме связанным с хелатирующим веществом.
15. Лекарственная форма по п.14, где нелетучим буфером является глициновый буфер, цитратный буфер или фосфатный буфер или их смесь.
16. Лекарственная форма по п.15, где буфер включает хелатирующее вещество.
17. Лекарственная форма по любому из пп.14 или 16, где хелатирующим веществом является этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), этиленгликольтетрауксусная кислота (EGTA), винная кислота, глицерин или лимонная кислота.
18. Лекарственная форма по любому из пп.1-17, дополнительно включающая второй ингредиент, способный понизить точку замерзания апротонного полярного растворителя до 0°C.
19. Лекарственная форма по п.18, где второй ингредиент является водой, сахаром, сахарным спиртом или их смесью.
20. Лекарственная форма по любому из пп.1-19, где инсулин представляет собой немодифицированный человеческий инсулин.
21. Лекарственная форма по любому из пп.1-20, дополнительно включающая аналог амилина, который является солюбилизованным в лекарственной форме.
22. Лекарственная форма по п.21, где аналогом амилина является прамлинтид.
23. Лекарственная форма по п.22, где прамлинтид имеет память рН 2 или где прамлинтид имеет память рН 2 и инсулин имеет память рН 2.
24. Лекарственная форма по п.23, где прамлинтид предварительно сушили в нелетучем буфере, указанный буфер имеет рН 2.
25. Лекарственная форма по любому из пп.22-24, где содержание воды в лекарственной форме составляет между 5 и 15% мас./об., между 7 и 12% мас./об., или между 8 и 10% мас./об., или 9% мас./об.
26. Лекарственная форма по любому из пп.1-25, где лекарственная форма находится в жидкой форме.
27. Лекарственная форма по п.26, где лекарственная форма представляет собой раствор.
28. Лекарственная форма по любому из пп.1-27, где по меньшей мере 90% инсулина в лекарственной форме остается химически и физически стабильным, когда лекарственная форма хранится при комнатной температуре в течение одного месяца.
29. Лекарственная форма по любому из пп.1-28, где лекарственная форма содержится в контейнере.
30. Лекарственная форма по п.29, где контейнером является шприц, шприц-ручка, устройство автоматического инъектора, насос или перфузионный мешок.
31. Лекарственная форма по любому из пп.1-30, где апротонный полярный растворитель является непрерывной фазой для лекарственной формы.
32. Лекарственная форма по любому из пп.1-31, где лекарственная форма включает по меньшей мере 75, 80, 85, 90 или 95% мас./об. апротонного полярного растворителя.
33. Лекарственная форма по любому из пп.1-32, где солюбилизованный инсулин является метастабильным.
34. Способ снижения уровня глюкозы в крови, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из лекарственных форм по пп.1-33 в количестве, эффективном для снижения уровня глюкозы в крови у субъекта.
35. Способ по п.34, отличающийся тем, что уровень глюкозы в крови у субъекта снижается в течение 30, 60 или 90 мин после введения.
36. Способ по любому из пп.34 и 35, отличающийся тем, что ранний уровень инсулина в крови $1/2 T_{max}$ происходит в течение от 30 до 60 мин после введения.
37. Способ по любому из пп.34-36, отличающийся тем, что субъект имеет диагноз диабета типа-I или типа-II.
38. Способ по любому из пп.34-37, отличающийся тем, что лекарственную форму вводят в течение 10, 5 или 1 мин до приема пищи субъектом или в течение 1, 5 или 10 мин после приема пищи субъектом.
39. Способ приготовления лекарственной формы по любому из пп.1-33, включающий:
 - а) высушивание смеси, включающей инсулин и нелетучий буфер, для получения сухого инсулина, где сухой инсулин имеет память рН между 1 и 4 или 6 и 8; и
 - б) восстановление сухого инсулина в апротонном полярном растворителе, где инсулин солюбилизован в апротонном полярном растворителе, где солюбилизованный инсулин включает стабильные мономерные или димерные формы инсулина или их смесь, и где содержание воды в лекарственных формах равно или меньше чем 15% мас./об.
40. Способ по п.39, отличающийся тем, что память рН инсулина составляет между 1 и 4, или между 1 и 3, или 2.
41. Способ по п.39, отличающийся тем, что память рН инсулина составляет между 6 и 8 или 7.
42. Способ по любому из пп.39-41, отличающийся тем, что апротонный полярный растворитель представляет собой диметилсульфоксид (DMSO), n-метилпирролидон (NMP), этилацетат, диметилфор-

мамид (DMF), диметилацетамид (DMA) или пропиленкарбонат или их смесь.

43. Способ по п.42, отличающийся тем, что апротонный полярный растворитель представляет собой диметилсульфоксид (DMSO).

44. Способ по любому из пп.39-43, отличающийся тем, что лекарственная форма включает от 3 до 50 мг/мл, от 3 до 10 мг/мл, или от 10 до 50 мг/мл, или от 50 до 100 мг/мл инсулина.

45. Способ по любому из пп.39-44, отличающийся тем, что солубилизированный инсулин находится в мономерной форме или в димерной форме.

46. Способ по любому из пп.39-45, дополнительно включающий:

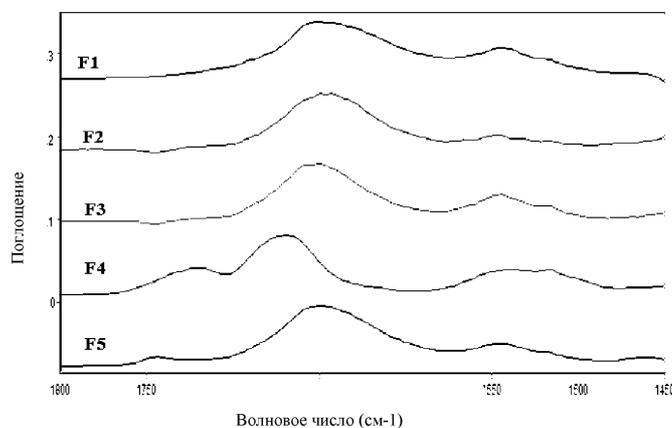
с) высушивание смеси, включающей аналог амилина и такой же нелетучий буфер в стадии а) или второй нелетучий буфер для получения высушенного аналога амилина; и

б) восстановление высушенного аналога амилина в апротонном полярном растворителе совместно с сухим инсулином, где сухой аналог амилина солубилизирован в апротонном полярном растворителе.

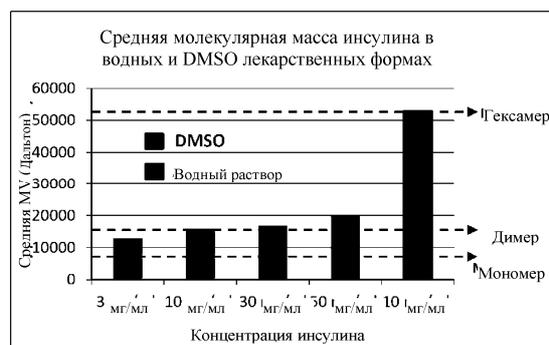
47. Способ по п.46, отличающийся тем, что аналог амилина представляет собой прамлинтид, и где прамлинтид имеет память рН 2 или где прамлинтид имеет память рН 2 и память рН инсулина 2.

48. Способ по любому из пп.46 и 47, отличающийся тем, что нелетучий буфер имеет рН 2.

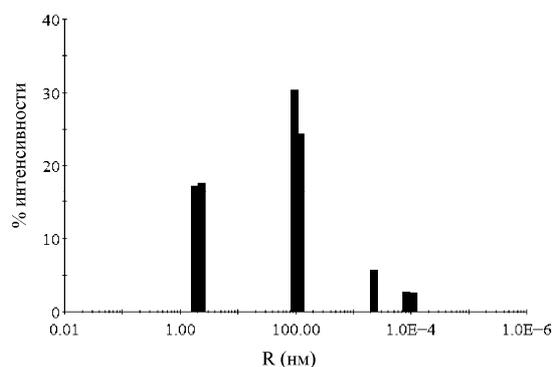
49. Способ по любому из пп.45-48, дополнительно включающий добавление от 5 до 15% мас./об. от лекарственной формы воды как соразтворителя.



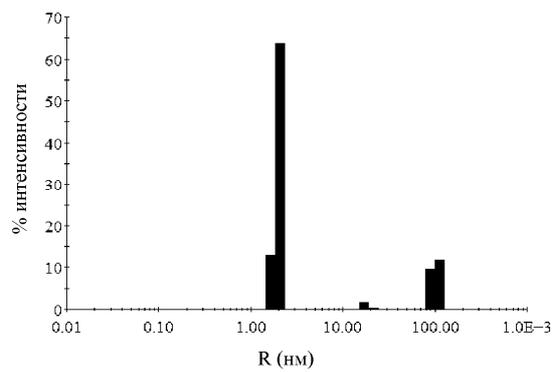
Фиг. 1



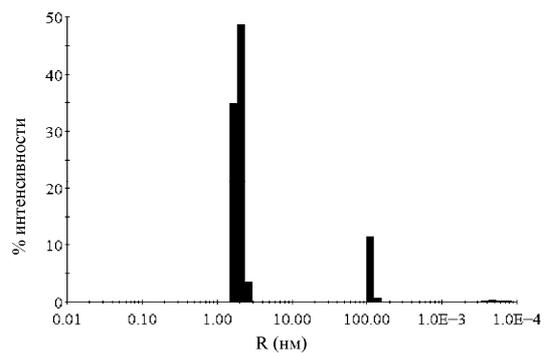
Фиг. 2



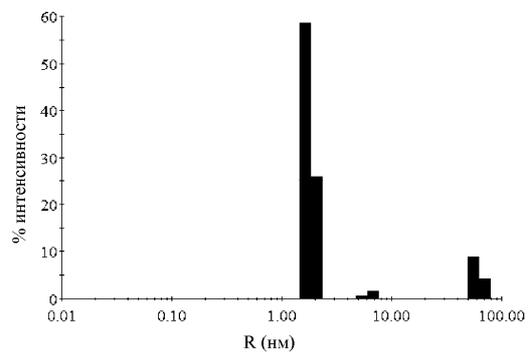
Фиг. 3



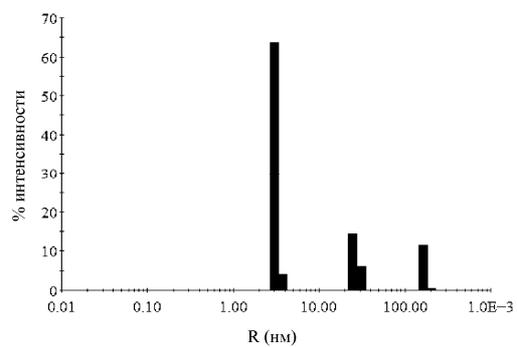
Фиг. 4



Фиг. 5

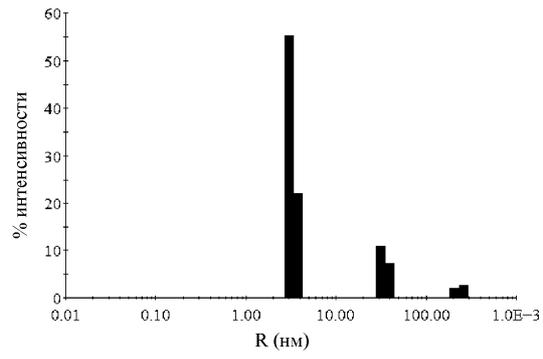


Фиг. 6



Фиг. 7

027744



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
