

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992351 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.26

(22) Дата подачи заявки
2018.05.31

(51) Int. Cl. *A61K 38/28* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61K 33/30 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(54) БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩИЕ КОМПОЗИЦИИ ИНСУЛИНА

(31) 62/513,645

(32) 2017.06.01

(33) US

(86) PCT/US2018/035261

(87) WO 2018/222787 2018.12.06

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Паавола Чад Дональд, Чжан Цзюнь
(US)

(74) Представитель:

Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Лыу Т.Н., Строкова О.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение представляет собой композицию инсулина или аналога инсулина, которая характеризуется более быстрым фармакокинетическим действием, чем промышленные лекарственные формы быстродействующих препаратов - аналогов инсулина.

A1

201992351

201992351

A1

БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩИЕ КОМПОЗИЦИИ ИНСУЛИНА

Настоящее изобретение представляет собой фармацевтическую композицию инсулина для парентеральной инъекции, предназначенную для противодействия прандиальным и постпрандиальным всплескам уровня глюкозы в крови. Предложенная композиция содержит инсулин и полифосфатное соединение, и характеризуется более быстрым усвоением инсулина из очагов инъекции, чем существующие промышленные композиции инсулина. Предложенная композиция подходит для быстрого обеспечения активности инсулина при необходимости в инсулине, например, при употреблении пищи.

Сахарный диабет представляет собой хроническое расстройство, характеризующееся гипергликемией, обусловленной нарушением секреции инсулина, действия инсулина или обоих вариантов. Сахарный диабет 1 типа характеризуется незначительной секрецией или отсутствием секреторной способности к выработке инсулина, и пациенты с диабетом 1 типа нуждаются в инсулине для выживания. Сахарный диабет 2 типа, характеризующийся совокупным действием нарушенной секреции инсулина и инсулинорезистентности, приводит к повышенному содержанию глюкозы в крови. По меньшей мере у трети пациентов с сахарным диабетом 2 типа заболевание прогрессирует до абсолютной необходимости в инсулинотерапии.

Временной профиль действия инсулина важен для регулирования постпрандиальных уровней глюкозы в крови. У здоровых индивидуумов поджелудочная железа резко увеличивает секрецию инсулина в ответ на усвоенную пищу, что приводит к повышенному уровню инсулина в крови в течение нескольких минут. У индивидуумов с диабетом 1 типа и у некоторых индивидуумов с диабетом 2 типа необходимо специально вводить инсулин. Однако введенный инсулин поступает в кровь медленнее, чем эндогенно вырабатываемый инсулин, и медленное начало его действия может приводить к гипергликемии в течение раннего постпрандиального периода. Слишком продолжительное действие может приводить к избыточному содержанию инсулина между приемами пищи, что приводит к поздней постпрандиальной гипогликемии и/или увеличению массы тела.

Ранее были предприняты попытки ускорения действия инсулиновых препаратов. «Быстродействующие» аналоги инсулина стали доступны в 1990-х и в начале 2000-х. Даже при применении так называемых «быстродействующих» аналогов инсулина, таких как инсулин лизпро (HUMALOG®), инсулин аспарт (NOVOLOG®) и инсулин глулизин (APIDRA®), максимальная концентрация циркулирующего инсулина не достигается до

истечения 50-90 минут после инъекции. Это не является достаточно быстрым для совпадения с профилями усвоения углеводов.

Позже было проведено исследование в попытке разработать продукт с более быстрым профилем действия, чем описано выше. Например, в US2014/0378383 описаны композиции инсулина, содержащие комбинацию замещенного анионного соединения, состоящего из сахаридного скелета, образованного из 1 – гексозных сахаридных звеньев, содержащего частично замещенные карбоксильные функциональные группы, с полианионным соединением, и указано, что такая комбинация обеспечивает возможность ускорения поступления инсулина в кровь. Аналогично, в US2015/0231160 описаны композиции инсулина, содержащие комбинацию олигосахарида и полианионного соединения, и указано, что такая комбинация обеспечивает возможность существенного сокращения до начала действия лекарственной формы быстродействующего аналога инсулина. В указанных документах описан ряд полианионных соединений, включая полифосфорные кислоты, такие как трифосфат, но не описана ни одна композиция, содержащая трифосфат, но не содержащая при этом замещенное анионное соединение, как описано в US2014/0378373, или олигосахарид, как описано US2015/0231160, и не приведены никакие данные о фармакокинетике или фармакодинамике композиций, содержащих трифосфат или любую другую полифосфорную кислоту. В US2014357554 и US2015273022 описаны композиции, которые, как заявлено, характеризуются быстрым началом действия инсулина, которые содержат ЭДТК, цитрат и магнийсодержащие соединения, одним из примером которых является пиррофосфат магния. Соединение магния, как заявлено, минимизирует раздражение очага инъекции, «но не изменяет скорость подкожной абсорбции», и отсутствуют данные о композициях, содержащих пиррофосфат магния. См.

Сохраняется потребность в композициях инсулина, предназначенных для применения во время приема пищи, которые характеризуются более быстрым усвоением инсулина из очага инъекции и более быстрым началом действия, чем существующие промышленные инсулиновые продукты.

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение указанных потребностей посредством обеспечения фармацевтически приемлемых лекарственных форм инсулина, которые характеризуются более быстрым поступлением инсулина в кровь и более быстрым началом действия, чем существующие промышленные инсулиновые продукты.

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, предложена фармацевтическая композиция, содержащая инсулин и полифосфатное соединение,

выбранное из группы, состоящей из пирофосфата, триметафосфата, трифосфата и тетрафосфата, при условии, что указанная композиция не содержит ни сахаридный мультимер, ни ЭДТК.

5 В некоторых вариантах реализации концентрация полифосфата составляет от примерно 5 до примерно 50 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация полифосфата составляет от примерно 10 до примерно 30 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация полифосфата составляет от примерно 20 до примерно 25 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация полифосфата выбрана из группы, состоящей из 5, 10, 15, 20, 25 или 30 мМ.

10 В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно содержит цинк. В некоторых вариантах реализации концентрация цинка составляет от примерно 0,2 до примерно 5 мМ.

15 В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно содержит агент тоничности. В некоторых вариантах реализации агент тоничности представляет собой глицерин.

В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно содержит один или более консервантов. В некоторых вариантах реализации один или более консервантов выбраны из группы, состоящей из фенола, мета-крезола и бензилового спирта.

20 В некоторых вариантах реализации инсулин выбран из группы, состоящей из человеческого инсулина, инсулина лизпро, инсулина аспарта и инсулина глулизина. В некоторых вариантах реализации концентрация инсулина составляет от примерно 40 до примерно 500 МЕ/мл. В некоторых вариантах реализации концентрация инсулина составляет от примерно 100 до примерно 200 МЕ/мл.

25 В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предложен способ лечения диабета, включающий введение человеку, нуждающемуся в этом, эффективной дозы одной из вышеописанных композиций.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предложена одна из вышеописанных композиций для применения в качестве лекарственного средства.

30 В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предложена одна из вышеописанных композиций для применения при лечении диабета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предложено изделие промышленного производства, содержащее одну из вышеописанных композиций. В некоторых вариантах реализации изделие промышленного производства представляет собой многоразовый флакон. В некоторых вариантах реализации изделие промышленного

производства представляет собой предварительно наполненную одноразовую шприц-ручку. В некоторых вариантах реализации изделие промышленного производства представляет собой многоразовую шприц-ручку. В некоторых вариантах реализации изделие промышленного производства представляет собой автоинъектор. В некоторых вариантах реализации изделие промышленного производства представляет собой помпу для непрерывной подкожной инфузии инсулина (CSII).

В данном контексте «сахаридный мультимер» означает любое соединение, содержащее более одного сахаридного звена, которые связаны друг с другом, включая, например, замещенные анионные соединения, описанные в US2014/0378383, и олигосахариды, описанные в US2015/0231160.

В данном контексте термин «не содержит сахаридный мультимер или ЭДТК» означает, что композиция не содержит сахаридные мультимеры или ЭДТК, или содержит только *de minimis* количество сахаридных мультимеров или ЭДТК, которое не влияет на временной профиль действия инсулина.

В данном контексте «инсулин» означает человеческий инсулин или структурный вариант, мутант или аналог человеческого инсулина, который обладает функциональной активностью человеческого инсулина. Аналоги человеческого инсулина включают, но не ограничиваются этим, инсулин лизпро, инсулин аспарт и инсулин глулизин, или другие «быстродействующие» аналоги инсулина. Инсулин для промышленных продуктов можно получать с использованием методом рекомбинантной ДНК или химическим синтезом. Рекомбинантные методы хорошо известны и весьма предпочтительны. Молекула человеческого инсулина (CAS № 11061-68-0) состоит из двух аминокислотных цепей, А и В, последовательности которых хорошо изучены. Цепи соединены друг с другом двумя дисульфидными связями: CysA7-CysB7 и CysA20-CysB19. А-Цепь имеет внутрицепочечную дисульфидную связь в положении CysA6-CysA11.

А-Цепь человеческого инсулина имеет следующую последовательность аминокислот:

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Asn Tyr Cys Asn (SEQ ID NO:1)

В-Цепь человеческого инсулина имеет следующую последовательность аминокислот:

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr (SEQ ID NO: 2).

Показано, что инсулин лизпро (CAS № 133107-64-9), действующее вещество в препарате HUMALOG®, является равноэффективным с человеческим инсулином в молярном выражении, но его эффект после подкожной инъекции наступает быстрее и является менее продолжительным, чем эффект от инъекции растворимого человеческого инсулина. Для инсулина лизпро наблюдали соответствующий профиль кинетики с меньшим значением T_{max} и периода полувыведения и с более высоким значением C_{max}, по сравнению с человеческим инсулином. Инсулин лизпро биологически эквивалентен инсулину в некоторых *in vitro* испытаниях, включая связывание инсулинового рецептора в выращенных лимфоцитах, плаценте человека и печени человека, а также транспорт глюкозы в адипоцитах. HUMALOG® содержит м-крезол в качестве консерванта и стабилизатора, модификатор тоничности (глицерин), буферный агент (двухосновной фосфат натрия), стабилизатор (оксид цинка) и агент для регуляции pH носителя.

Молекула инсулина лизпро состоит из А-цепи человеческого инсулина, сшитой с В-цепью инсулина лизпро, аминокислотная последовательность которой представлена последовательностью SEQ ID NO:3, ниже:

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr (SEQ ID NO: 3).

Одна единица инсулина лизпро эквивалентна 0,0347 мг инсулина лизпро.

Инсулин аспарт (CAS № 116094-23-6), действующее вещество в препарате NOVLOG®, представляет собой другой быстродействующий аналог инсулина. Его структура состоит из А-цепи человеческого инсулина и аналога В-цепи, представленного в следующей аминокислотной последовательности:

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr (SEQ ID NO: 4).

Одна единица инсулина аспарта соответствует 6 нмоль, что соответствует 0,035 мг бессолевого безводного инсулина аспарта.

Инсулин глулизин (CAS № 207748-29-6), действующее вещество в препарате APIDRA®, представляет собой еще один быстродействующий аналог инсулина. Молекула инсулина глулизина состоит из А-цепи человеческого инсулина и модифицированной В-цепи относительно человеческого инсулина, как показано в следующей аминокислотной последовательности:

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr (SEQ ID NO: 5).

Одна единица инсулина глулизина соответствует примерно 0,0349 мг инсулина глулизина.

Композиции согласно настоящему изобретению имеют концентрации инсулина от 0,24 до 3 мМ (40 – 500 МЕ/мл; 1,4 мг/мл – 17,5 мг/мл). Композиции согласно настоящему изобретению в большинстве случаев имеют удельные концентрации 40, 100, 200, 300, 400 и 500 МЕ/мл (1,4, 3,5, 7, 10,5, 14 и 17,5 мг/мл). Предпочтительные концентрации составляют 100 и 200 МЕ/мл.

Полифосфаты представляют собой неорганические многозарядные поливалентные анионы, состоящие из 2 или более фосфатных групп, ковалентно связанных связями Р-О-Р. Их широко используют в моющих средствах, пищевых продуктах, косметике и биомедицине (в качестве хелатообразующих агентов, буферов и сшивающих агентов, среди прочих направлений применения. Многие полифосфаты «признаны полностью безвредными» Управлением США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов для применения в пищевых продуктах («GRAS»), включая, например, полифосфаты, перечисленные ниже в таблице 1.

Таблица 1. Примеры GRAS полифосфатов.

GRAS вещество	Формула (ММ)	CAS №	21 CFR
Пирофосфат кальция	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (254,1)	7790-76-3	182.8223
Пирофосфат калия	$\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (330,3)	7320-34-5	нет
Триполифосфат калия	$\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (453,5)	13845-36-8	нет
Гидропирофосфат натрия	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (221,9)	7758-16-9	182.1087
Пирофосфат натрия	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (265,9)	7722-88-5	182.6760
Тетрафосфат натрия	$\text{Na}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ (469,8)	14986-84-6	нет
Триметафосфат натрия	$\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ (305,9)	7785-84-4	нет
Триполифосфат натрия	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (367,9)	7758-29-4	182.1810 182.1610

Трифосфат используют в качестве сшивающего агента в полимерных наноносителях, в частности, в хитозановых наноносителях, для пероральной, назальной, парентеральной или трансдермальной доставки широкого ряда важных с медицинской точки зрения полезных грузов, таких как антигены, противораковые препараты, генетические материалы и белки, включая инсулины. Kouchak, *et al.*, “Effect of different molecular weights of chitosan on preparation and characterization of insulin loaded nanoparticles by ion gelation method,” 4 Internat’l J. Drug Dev. & Res. 271 (2012). Однако в отличие от

настоящего изобретения, такие носители не предназначены для ускорения профиля действия введенного инсулина.

Полифосфаты, представленные в настоящем документе, которые подходят для увеличения скорости абсорбции инсулина из очага инъекции, представляют собой пиррофосфат (дифосфат $[O_3-P-O-P-O_3]^{-4}$, P_2O_7) и трифосфат ($[O_3-P-O-(PO_2)-O-P-O_3]^{-5}$, P_3O_{10}). Влияние на абсорбцию инсулина предположительно обусловлено указанными полифосфатами, а также триметафосфатом (P_3O_9)⁻ и тетрафосфатом (P_4O_{13})⁻⁶. Конкретное используемое полифосфатное соединение может представлять собой кислотную форму или различные солевые формы, в частности, соли щелочных металлов (например, натрия и калия). Согласно настоящему изобретению можно использовать пиррофосфат, трифосфат, триметафосфат и тетрафосфат, а также их различные соли, в частности, их соли с щелочными металлами (например, натрием и калием) и щелочноземельными металлами (например, кальцием и магнием). Среди них предпочтителен трифосфат и его соли. Концентрация полифосфата в композициях варьируется от 5 мМ до 50 мМ, в частности, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 50 мМ. Некоторые композиции имеют концентрации полифосфата в диапазоне от 10 мМ до 30 мМ. Некоторые композиции имеют концентрации полифосфата в диапазоне от 15 мМ до 25 мМ.

Промышленные композиции инсулина содержат примерно 2,4 атома цинка на шесть молекул инсулина (HUMULIN® R U-500), а некоторые содержат примерно 3,0 атома цинка на шесть молекул инсулина (HUMALOG®, NOVOLAG®). Некоторые варианты реализации настоящего изобретения содержат цинк в концентрации, достаточной для обеспечения примерно 2-4 атомов цинка на шесть молекул инсулина. Другие варианты реализации содержат цинк в концентрации до примерно 5 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация цинка варьируется от примерно 0,2 до примерно 5 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация цинка варьируется от примерно 0,5 до примерно 2 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация цинка выбрана из группы, состоящей из 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,3 и 2 мМ.

Предложенные композиции стерильны при первоначальном изготовлении. При поставке в виде многоразового флакона или картриджа, обычно добавляют противомикробное консервирующее соединение или смесь соединений, которые совместимы с другими компонентами лекарственной формы, в эффективной концентрации, достаточной для удовлетворения нормативных и фармакопейных требований к противомикробным консервантам. См. статьи Фармакопеи США. Insulin lispro injection. USP29-NF24; статьи Британской Фармакопеи, 2008, том III: Insulin aspart injection; статьи

Фармакопеи США. Insulin assays; и общие разделы Фармакопеи США. USP29-NF24. Роквилл, штат Мэриленд: Фармакопейная конвенция США; 2005. Antimicrobial effectiveness testing; сс. 2499–2500. Предпочтительными консервантами являются ариловые кислоты и фенольные соединения или смеси таких соединений. Консерванты, чаще всего
5 используемые в инсулиновых продуктах, представляют собой фенол, м-крезол и бензиловый спирт. Эффективные концентрации можно без труда определить способами, упомянутыми выше. Например, современные промышленные композиции содержат 3,15 мг/мл м-крезола (HUMALOG® и APIDRA®), 1,72 мг/мл м-крезола и 1,50 мг/мл фенола (NOVOLOG®) и 2,5 мг/мл м-крезола (HUMULIN® R U-500).

10 pH инсулиновых композиций согласно настоящему изобретению обычно составляет от 7,0 до 7,8, и его регулируют физиологически пригодными кислотами и основаниями, обычно 10% хлористоводородной кислотой и 10% гидроксидом натрия. pH промышленных препаратов инсулина обычно составляет от 7,2 до 7,6, при этом значение $7,4 \pm 0,1$ является обычным требуемым значением pH.

15 Желательно, чтобы композиция по возможности приблизительно соответствовала тоничности (т.е. осмоляльности) физиологических жидкостей в очаге инъекции при введении композиции, поскольку растворы, которые не являются примерно изотоничными с физиологическими жидкостями, могут вызывать болезненное ощущение жжения при введении. Таким образом, желательно, чтобы композиции были примерно изотоничны с
20 физиологическими жидкостями в очаге инъекции. Если осмоляльность композиции в отсутствие агента тоничности достаточно ниже осмоляльности ткани (для крови – примерно 300 мОсмоль/кг; требование Европейской Фармакопеи к осмоляльности: > 240 мОсмоль/кг), то обычно необходимо добавлять агент тоничности для повышения тоничности композиции до значения примерно 300 мОсмоль/кг. Типичные агенты
25 тоничности представляют собой глицерол (глицерин) и хлорид натрия. Добавляемое количество агента тоничности можно без труда определить стандартными способами. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, David B. Troy и Paul Beringer, ред., Lippincott Williams & Wilkins, 2006, сс. 257-259; Remington: Essentials of Pharmaceutics, Linda Ed Felton, Pharmaceutical Press, 2013, сс. 277-300.

30 Композиции согласно настоящему изобретению обычно вводят подкожно, либо в виде нескольких инъекций в сутки (MDI) из предварительно наполненной одноразовой шприц-ручки, многоразовой шприц-ручки, автоматической шприц-ручки, многоразового флакона или помпы для CSII.

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения включают варианты реализации, описанные ниже:

1. Фармацевтическая композиция, содержащая инсулин и полифосфатное соединение, выбранное из группы, состоящей из пирофосфата, трифосфата, 5 триметафосфата и тетрафосфата.
2. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, отличающаяся тем, что указанная композиция не содержит ни сахаридный мультимер, ни ЭДТК.
3. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов 10 реализации, отличающаяся тем, полифосфатное соединение представляет собой трифосфат.
4. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, отличающаяся тем, полифосфатное соединение представляет собой пирофосфат.
5. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов 15 реализации, отличающаяся тем, концентрация полифосфата составляет от примерно 5 до примерно 50 мМ.
6. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, отличающаяся тем, концентрация полифосфата составляет от примерно 10 до 20 примерно 30 мМ.
7. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов 20 реализации, отличающаяся тем, концентрация полифосфата выбрана из группы, состоящей из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 и 50 мМ.
8. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, дополнительно содержащая цинк.
9. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов 25 реализации, отличающаяся тем, концентрация цинка составляет от примерно 0,2 до примерно 5 мМ.
10. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, отличающаяся тем, концентрация цинка составляет от примерно 0,5 до 30 примерно 2 мМ.
11. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, отличающаяся тем, концентрация цинка выбрана из группы, состоящей из 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,3, 2 и 5 мМ.

12. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, дополнительно содержащая агент тоничности.

5 13. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, дополнительно содержащая агент тоничности, который представляет собой глицерин.

14. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, дополнительно содержащая один или более консервантов.

10 15. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, отличающаяся тем, что один или более консервантов выбраны из группы, состоящей из фенола, мета-крезола и бензилового спирта.

16. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, отличающаяся тем, что инсулин выбран из группы, состоящей из человеческого инсулина, инсулина лизпро, инсулина аспарта и инсулина глулизина.

15 17. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, отличающаяся тем, концентрация инсулина составляет от примерно 40 до примерно 500 МЕ/мл.

18. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, отличающаяся тем, концентрация инсулина составляет от примерно 100 до примерно 200 МЕ/мл.

20 19. Способ лечения диабета, включающий введение человеку, нуждающемуся в этом, эффективной дозы фармацевтической композиции по любому из предшествующих вариантов реализации.

20. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации для применения в качестве лекарственного средства.

25 21. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации для применения при лечении диабета.

22. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих вариантов реализации, содержащая смесь двух или более полифосфатных соединений, выбранных из группы, состоящей из пирофосфата, трифосфата, триметафосфата и тетрафосфата.

30 23. Изделие промышленного производства, содержащее любую из описанных выше фармацевтических композиций.

24. Многоцветный флакон, содержащий любую из описанных выше фармацевтических композиций.

25. Многодозовая шприц-ручка, содержащая любую из описанных выше фармацевтических композиций.

26. Предварительно наполненная одноразовая шприц-ручка, содержащая любую из описанных выше фармацевтических композиций.

5 27. Автоматическая шприц-ручка, содержащая любую из описанных выше фармацевтических композиций.

28. Помпа для CSII, содержащая любую из описанных выше фармацевтических композиций.

10 **Фармакокинетические (ФК) и фармакодинамические (ФД) исследования**

Исследование 1. 25 мМ пирофосфат или 25 мМ трифосфат

Использовали пятнадцать кастрированных самцов юкатанских миниатюрных свиней (возрастом 17 месяцев и со средней массой тела 40 кг) с диабетом (вызванным аллоксаном), которым предварительно устанавливали устройство для сосудистого доступа.

15 Диабетических животных содержали по отдельности, и они в любое время имели свободный доступ к питьевой воде. Их кормили два раза в сутки общим кормом S-9 и два раза в сутки вводили соответствующие поддерживающие дозы базального и прандиального инсулина для сдерживания диабетического состояния.

Составляли лекарственные формы экспериментальных препаратов (лекарственная форма А и В) и за ночь доставляли на холоду в исследовательский центр. Их хранили в холодильнике до времени введения доз, а затем возвращали в холодильник после завершения введения доз всем животным. Во время введения доз экспериментальные препараты держали в изолированной коробке, пока их не вынимали. Контрольный препарат инсулина HUMALOG® вводили из промышленного флакона.

Таблица 2. Композиции экспериментальных и контрольных препаратов.

Название препарата	Композиция препарата
HUMALOG	3,5 мг/мл инсулина лизпро 7 мМ фосфата натрия 0,3 мМ 3,15 мг/мл м-крезола 16 мг/мл глицерина рН 7,4
инсулин лизпро + 25 мМ пирофосфата (лекарственная форма А)	92 МЕ/мл инсулина лизпро (3,2 мг/мл) 7 мМ фосфата натрия 0,3 мМ цинка 3,15 мг/мл м-крезола 6,33 мг/мл глицерина 25 мМ пирофосфата натрия рН 7,4
инсулин лизпро + 25 мМ трифосфата (лекарственная форма В)	94 МЕ/мл инсулина лизпро (3,3 мг/мл) 7 мМ фосфата натрия 0,3 мМ цинка 3,15 мг/мл м-крезола 4,49 мг/мл глицерина 25 мМ трифосфата натрия рН 7,4

Дизайн исследования представлял собой трехсторонний перекрестный дизайн. Такой дизайн обеспечивает возможность введения каждому отдельному животному каждого из трех экспериментальных препаратов, вводя по одному экспериментальному препарату в каждый день исследования (3 разных дня с интервалами по 7 дней). За день до начала исследования животным давали половину суточного рациона и вводили 0,2 Е/кг инсулина Humalog Mix 75/25 в качестве утренней поддерживающей дозы. Всех экспериментальных животных выдерживали без доступа к пище в течение ночи и не

вводили им вечернюю дозу инсулина и не давали им корм до введения лекарственного средства в день исследования.

Утром дня проведения исследования всех животных помещали в стропы для ограничения подвижности и открывали доступ к точкам сосудистого доступа (предусмотренным для отбора образцов крови), и проверяли на проходимость. Животных случайным образом распределяли на экспериментальные группы (3 групп с n=5 на группу, всего n=15 на одно экспериментальное лечение).

После отбора двух образцов крови в исходном состоянии (-30 и -20 мин.) животных возвращали в загон и давали им ~300 г корма S-9. Через двадцать минут после завершения приема пищи животным вводили инъекцию экспериментального препарата подкожно в бок (0 мин.) с помощью инсулинового шприца Terumo (0,5 мл, игла 1/2"). Введение дозы включало однократную инъекцию 0,2 МЕ/кг активного инсулина. Все экспериментальные животные имели свободный доступ к чистой пресной воде в течение всего оставшегося периода сбора крови.

Собирали серийные образцы крови (по 2,0 мл каждый) у каждого животного в следующие моменты времени: -30, -20 (затем сразу кормили), 0 (непосредственно перед введением дозы), через 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 240 и 360 минут после SC введения дозы. Образцы крови (антикоагулянт: нет [сыворотка]) выдерживали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 минут, но не более 2 часов для обеспечения свертывания. Затем сыворотку отделяли центрифугированием и делили на две аликвоты, и хранили в замороженном состоянии примерно при -70 °C.

Определяли концентрации глюкозы в сыворотке с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава Cobas c311 (Roche Diagnostics, Индианаполис). Двух животных исключали из экспериментальной группы с Humalog, с получением n=13 для данного экспериментального препарата. Одно животное исключали, поскольку оно не соответствовало критерию исходного уровня глюкозы >200 мг/дл, а другое животное не принимало участие в эксперименте вследствие проблем с проходимостью порта. Концентрации глюкозы в сыворотке (мг/дл) после введения лекарственных форм, содержащих инсулин лизпро (0,2 МЕ/кг во время 0), представлены ниже в таблице 3.

Таблица 3. Концентрации глюкозы в сыворотке (мг/дл).

Время (мин.)	Humalog (n=13)		Лекарственная форма А (n=15) 25 мМ пирофосфата		Лекарственная форма В (n=15) 25 мМ трифосфата	
	Среднее	Ст.от кл.	Среднее	Ст.от кл.	Среднее	Ст.от кл.
-30	293	46	270	77	292	43
-20	297	47	293	40	299	46
0	322	52	304	48	306	45
5	325	45	312	52	309	48
10	313	51	245	48	238	50
15	285	60	201	47	189	53
30	216	80	133	56	108	56
45	165	80	99	63	70	51
60	131	87	70	45	52	54
75	104	80	57	39	44	52
90	83	70	44	35	35	42
105	68	62	40	33	34	36
120	58	52	37	34	35	38
150	49	43	38	38	38	27
180	48	40	47	48	44	33
240	69	44	70	73	74	59
360	143	73	113	87	151	106

Концентрации инсулина в сыворотке определяли с помощью конкурентного радиоиммуноанализа (RIA). В анализе RIA, в котором измеряли и эндогенный инсулин свиней, и экзогенный инсулин, сывороточный инсулин заменяли на ¹²⁵I-инсулин для связывания с антикрысиным инсулином морских свинок. Комплекс антитела осаждали с помощью козьего сывороточного реагента против IgG морских свинок. Верхний и нижний пределы количественного определения в RIA составляли 5000 и 20 пМ, соответственно, в термически обработанной и очищенной на активированном угле сыворотке.

Некомпартментный фармакокинетический анализ проводили с помощью Phoenix

WinNonLin 6.3. Для значений ниже нижнего предела количественного определения присваивали значение 20 пМ для проведения расчетов. Образцы со значениями выше верхнего предела количественного обнаружения либо разбавляли и анализировали повторно, либо игнорировали. Как указано выше, одно животных из группы введения HUMALOG не принимало участие в исследовании вследствие проблем с проходимостью порта, поэтому n=14 для данного экспериментального препарата.

Таблица 4. Данные ФК.

Лекарственная форма		Tmax (мин.)	Cmax (нМ)	AUC ∞ (мин.*нМ)	CL/F (мл/мин./кг)
Humalog (n=14)	Среднее $\pm$ СО	61,1 $\pm$ 11,1	1,30 $\pm$ 0,25	141 $\pm$ 21,2	12,1 $\pm$ 1,97
	Медиана	45,0	1,08	142	8,43
Лекарственная форма А (n=15) 25 мМ пирофосфата	Среднее $\pm$ СО	32,3 $\pm$ 7,6	1,29 $\pm$ 0,12	113 $\pm$ 10,7	10,6 $\pm$ 1,12
	Медиана	30,0	1,30	107	11,1
Лекарственная форма В (n=15) 25 мМ трифосфата	Среднее $\pm$ СО	14,3 $\pm$ 1,88	2,93 $\pm$ 0,34	220 $\pm$ 31,4	6,88 $\pm$ 0,764
	Медиана	15,0	2,53	159	7,56

Сокращения = Tmax – время при максимальной концентрации, Cmax – максимальная концентрация, AUC_{беск.} – площадь под кривой от 0 до бесконечности, CL/F – клиренс/биодоступность.

Данные ФК/ФД демонстрируют, что пирофосфат или трифосфат ускоряют действие и сокращают Tmax по сравнению с HUMALOG. Лекарственная форма А с пирофосфатом демонстрирует Tmax на ~47% меньше, чем HUMALOG (на ~33% меньше по медианному Tmax) и имеет сопоставимую среднюю Cmax с HUMALOG. Лекарственная форма В с трифосфатом демонстрирует Tmax на ~77% меньше, чем HUMALOG (на ~67% меньше по медианному Tmax) и на ~125% более высокую Cmax, чем Humalog. Лекарственные формы, содержащие 25 мМ пирофосфат или 25 мМ трифосфат, обеспечивали более короткое Tmax и более высокую Cmax, по сравнению с HUMALOG.

Исследование 2. Влияние концентрации трифосфата на ФК/ФД

Использовали четырнадцать кастрированных самцов юкатанских миниатюрных свиней (возрастом 14 месяцев и со средней массой тела 35 кг) с диабетом (вызванным

аллоксаном), которым предварительно устанавливали устройство для сосудистого доступа. Диабетических животных содержали по отдельности, и они в любое время имели свободный доступ к питьевой воде. Их кормили два раза в сутки общим кормом S-9 и два раза в сутки вводили соответствующие поддерживающие дозы базального и прандиального

5 инсулина для сдерживания диабетического состояния.

Составляли экспериментальные препараты и в течение ночи привозили их на холоду. Их хранили в холодильнике до времени введения доз, а затем возвращали в холодильник после завершения введения доз всем животным. Во время введения доз экспериментальные препараты держали в изолированной коробке, пока их не вынимали.

10 Контрольный препарат HUMALOG представлял собой промышленный флакон.

Таблица 5. Композиции экспериментальных и контрольных препаратов.

Название препарата	Композиция препарата
HUMALOG	3,5 мг/мл инсулина лизпро 7 мМ фосфат натрия, рН 7,4 0,3 мМ молекул Zn 16 мг/мл глицерина 3,15 мг/мл м-крезола
Лекарственная форма С: инсулин лизпро + 5 мМ трифосфата	3,5 мг/мл инсулина лизпро 7 мМ фосфата натрия 0,3 мМ цинка 13,70 мг/мл глицерина 3,15 мг/мл м-крезола 5 мМ трифосфата натрия, рН 7,4
Лекарственная форма D: инсулин лизпро + 10 мМ трифосфата	3,5 мг/мл инсулина лизпро 7 мМ фосфата натрия 0,3 мМ цинка 11,40 мг/мл глицерина 3,15 мг/мл м-крезола 10 мМ трифосфата натрия, рН 7,4
Лекарственная форма E: инсулин лизпро + 20 мМ трифосфата	3,5 мг/мл инсулина лизпро 7 мМ фосфата натрия 0,3 мМ цинка 6,79 мг/мл глицерина 3,15 мг/мл м-крезола 20 мМ трифосфата натрия, рН 7,4

Дизайн исследования представлял собой четырехсторонний перекрестный дизайн, обеспечивающий возможность введения каждому отдельному животному каждого из трех экспериментальных препаратов и контрольного препарата, вводя по одному экспериментальному препарату в каждый день исследования (4 разных дня с интервалами по 7 дней).

За день до начала исследования животным давали половину суточного рациона и вводили 0,2 Е/кг инсулина Humalog Mix 75/25 в качестве утренней поддерживающей дозы.

Всех экспериментальных животных выдерживали без доступа к пище в течение ночи и не

вводили им вечернюю дозу инсулина и не давали им корм до введения лекарственного средства в день исследования.

Утром дня проведения исследования всех животных помещали в стропы для ограничения подвижности и открывали доступ к точкам сосудистого доступа (предусмотренным для отбора образцов крови), и проверяли на проходимость. Животных случайным образом распределяли на экспериментальные группы (4 групп с $n=3-4$ на группу, всего $n=14$ на одно экспериментальное лечение). Две свиньи не принимали участие в исследовании, поскольку они наблюдались у ветеринара, и общее количество $n=14$ уменьшилось до $n=12$ еще до каких-либо других исключений. Одно животное исключали из группы с HUMALOG, и двух животных исключали из группы инсулин лизпро + трифосфат 10 мМ, поскольку они не соответствовали критериям включения, поэтому $n=11$ и $n=10$, соответственно, для указанных групп.

После отбора двух образцов крови в исходном состоянии (-30 и -20 мин.) животных возвращали в загон и давали им ~300 г корма S-9. Через двадцать минут после завершения приема пищи животным вводили инъекцию экспериментального препарата подкожно в бок (0 мин.) с помощью инсулинового шприца Terumo (0,5 мл, игла 1/2"). Все экспериментальные животные имели свободный доступ к чистой пресной воде в течение всего оставшегося периода сбора крови.

Собирали серийные образцы крови (по 2,0 мл каждый) у каждого животного в следующие моменты времени: -30, -20 (затем сразу кормили), 0 (непосредственно перед введением дозы), через 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 240 и 360 минут после SC введения дозы. Образцы крови (антикоагулянт: нет [сыворотка]) выдерживали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 минут, но не более 2 часов для обеспечения свертывания. Затем отделяли сыворотку посредством центрифугирования и делили на две аликвоты, и хранили в замороженном состоянии примерно при -70°C . На следующий день аликвоты доставляли службой доставки на сухом льду.

Концентрации инсулина в сыворотке определяли с помощью конкурентного радиоиммуноанализа (RIA), как описано выше. Данные анализировали с помощью некомпартментного фармакокинетического анализа, используя Phoenix WinNonLin 6.3, как описано выше. Определяли концентрации глюкозы в сыворотке с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава Cobas c311 (Roche Diagnostics, Индианаполис, штат Индиана).

Результаты измерения глюкозы в сыворотке (мг/дл) представлены ниже в таблице 6.

Таблица 6. Результаты измерения глюкозы в сыворотке (мг/дл).

	HUMALOG		Лекарственная форма С инсулин лизпро + 5 мМ трифосфата		Лекарственная форма D инсулин лизпро + 10 мМ трифосфата		Лекарственная форма E инсулин лизпро + 20 мМ трифосфата	
Время (мин.)	Среднее	Ст.о ткл.	Среднее	Ст.о ткл.	Среднее	Ст.о ткл.	Среднее	Ст.о ткл.
-30	287	63	266	49	283	43	285	34
-20	299	65	275	52	295	40	292	37
0	306	65	280	54	294	43	299	43
5	314	64	281	53	294	43	300	49
10	320	61	252	47	266	39	256	52
15	314	59	221	45	232	40	215	56
30	305	65	161	50	171	44	146	59
45	277	73	141	57	141	47	114	59
60	246	74	126	64	126	60	99	61
75	219	73	113	63	113	60	96	63
90	183	76	106	73	102	57	92	63
105	160	71	95	63	99	57	96	63
120	140	72	82	60	94	55	93	60
150	117	72	77	52	81	51	96	58
180	105	80	77	59	72	48	106	71
240	133	93	115	83	99	67	163	101
360	219	93	164	94	163	94	197	92

ФК параметры как функция от концентрации трифосфата представлены ниже в таблице 7.

Таблица 7. Данные ФК.

Лекарственная форма		Tmax (мин.)	Cmax (нМ)	AUC _{беск.} (мин.*нМ)	CL/F (мл/мин./кг)
Humalog N=12	Среднее ± CO	58,8 ± 6,0	0,89 ± 0,098	127 ± 12	10,3 ± 0,89
	Медиана	60	1,03	119	10,2
Лекарственная форма С: инсулин лизпро + 5 мМ трифосфата N=12	Среднее ± CO	52,5 ± 13,0	1,05 ± 0,093	132 ± 25	11,6 ± 1,5
	Медиана	37,5	1,12	120	9,97
Лекарственная форма D: инсулин лизпро + 10 мМ трифосфата N=10	Среднее ± CO	28,0 ± 10,6	1,23 ± 0,15	127 ± 29	12,0 ± 1,5
	Медиана	15,0	1,21	98,6	12,2
Лекарственная форма E: инсулин лизпро + 20 мМ трифосфата N=12	Среднее ± CO	12,9 ± 2,5	1,67 ± 0,14	116 ± 13	11,8 ± 1,2
	Медиана	10,0	1,84	109	11,0

Сокращения: Tmax – время при максимальной концентрации инсулина, Cmax – максимальная концентрация инсулина, AUC_{беск.} – площадь под кривой от 0 до бесконечности, CL/F – клиренс/биодоступность.

- 5 Трифосфат в концентрации 5, 10 или 20 мМ в лекарственных формах, подобных HUMALOG, ускоряет время действия и сокращает Tmax, и увеличивает Cmax по сравнению с HUMALOG®, и это происходит дозозависимым образом.

Исследование 3. Влияние на различные промышленные инсулины

- 10 Использовали пятнадцать кастрированных самцов юкатанских миниатюрных свиней с диабетом (вызванным аллоксаном), которым предварительно устанавливали устройство для сосудистого доступа, для изучения влияния трифосфата на профиль глюкозы в сыворотке и профиль времени действия инсулина в сыворотке для различных промышленных инсулинов. Содержание и питание животных, а также доставку и хранение

экспериментальных и контрольных препаратов осуществляли так, как описано выше в исследованиях 1 и 2.

Экспериментальные препараты (лекарственные формы F, G и H в следующей таблице) составляли посредством добавления достаточного количества трифосфата в промышленные флаконы HUMULIN-R®, NOVOLOG® и APIDRA® для достижения концентрации трифосфата 20 мМ. Следует отметить, что концентрации других ингредиентов, перечисленных в следующей таблице, отражают концентрации этих ингредиентов в промышленных флаконах указанных продуктов; приведенные концентрации не корректировали для учета небольшого разбавления в результате добавления трифосфата.

Таблица 8. Композиции экспериментальных и контрольных препаратов.

Название препарата	Композиция препарата
HUMALOG	3,5 мг/мл инсулина лизпро 7 мМ фосфат натрия, pH 7,4 0,3 мМ Zn 16 мг/мл глицерина 3,15 мг/мл м-крезола
Лекарственная форма F: NOVOLOG + 20 мМ трифосфата	100 Е/мл инсулин аспарта 19,6 мкг/мл цинка 16 мг/мл глицерина 1,50 мг/мл фенола 1,72 мг/мл м-крезола 1,25 мг/мл безводного гидрофосфата динатрия 0,58 мг/мл хлорида натрия 20 мМ трифосфата натрия
Лекарственная форма G: APIDRA + 20 мМ трифосфата	100 Е/мл инсулин глулизина 3,15 мг/мл м-крезола 6 мг/мл трометамин, 5 мг/мл хлорида натрия 0,01 мг/мл полисорбата 20 20 мМ трифосфата натрия
Лекарственная форма H: HUMULIN + 20 мМ трифосфата	100 Е/мл инсулина 16 мг/мл глицерина 2,6 мг/мл м-крезола 0,23 мМ Zn 20 мМ трифосфата натрия

Исследование имело четырехсторонний перекрестный дизайн, обеспечивающий
5 возможность введения каждому отдельному животному каждого из трех
экспериментальных препаратов и контрольного препарата, вводя по одному
экспериментальному препарату в каждый день исследования (4 разных дня с интервалами

по 7 дней). Животных готовили к исследованию так, как описано выше для исследований 1 и 2.

Животных случайным образом распределяли на экспериментальные группы (4 групп с n=3-4 на группу, всего n=15 на одно экспериментальное лечение). Одно животное исключали из группы HUMULIN R + 20 мМ трифосфата и NOVOLOG + 20 мМ трифосфата вследствие проблем с проходимостью порта, поэтому для указанных экспериментальных групп n=14. Одно животное исключали из группы HUMALOG вследствие проблем с проходимостью порта, и одно животное исключали из группы HUMALOG, поскольку оно не соответствовало критериям включения, и для этой группы n=13.

Сбор образцов крови в исходном состоянии, инъекцию экспериментальных препаратов, сбор образцов крови и получение, транспортировку и измерение образцов крови и сыворотки осуществляли так, как описано выше для исследований 1 и 2.

Определяли концентрации глюкозы в сыворотке с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава AU480 (Beckman Coulter). Результаты измерения глюкозы в сыворотке (мг/дл) представлены ниже в таблице 9.

Таблица 9. Результаты измерения глюкозы в сыворотке (мг/дл).

	HUMALOG		Лекарственная форма F: HUMULIN + 20 мМ трифосфата		Лекарственная форма G: APIDRA + 20 мМ трифосфата		Лекарственная форма H: NOVOLOG + 20 мМ трифосфата	
Время (мин.)	Среднее	Ст.откл.	Среднее	Ст.откл.	Среднее	Ст.откл.	Среднее	Ст.откл.
-30	343	39	335	62	336	45	343	56
-20	360	38	356	64	350	45	355	58
0	372	43	368	61	366	42	367	48
5	386	37	371	63	378	39	373	51
10	362	39	315	64	307	37	296	50
15	348	39	274	65	276	45	255	50
30	274	65	209	73	201	63	177	56
45	239	82	187	85	169	76	139	59
60	190	90	184	101	143	76	118	67
75	173	82	185	110	130	79	113	76
90	150	77	175	115	114	67	105	82
105	136	67	164	118	104	64	103	84
120	129	68	164	124	102	68	102	82
150	116	67	145	123	94	68	94	78
180	111	73	134	122	91	65	92	71
240	131	80	120	108	107	65	103	74
360	174	101	116	111	149	86	149	88

Концентрации инсулина в сыворотке определяли с помощью конкурентного радиоиммуноанализа (RIA), как описано выше для исследований 1 и 2. Данные анализировали некомпартментным фармакокинетическим анализом с помощью Phoenix WinNonLin. Фармакокинетические параметры как функция от концентрации трифосфата представлены ниже в таблице 10.

Таблица 10. Данные ФК.

Лекарственная форма		Tmax (мин.)	Cmax (нМ)	AUC _{беск.} (мин.*нМ)	CL/F (мл/мин./кг)
HUMALOG N=13	Среднее ± CO	58,8 ± 7,49	1,12 ± 0,176	129 ± 9,27	9,88 ± 0,669
	Медиана	60	1,00	120	9,99
Лекарственная форма F: HUMULIN + 20 мМ трифосфата N=14	Среднее ± CO	22,5 ± 9,55	1,45 ± 0,230	173 ± 14,6	7,48 ± 0,527
	Медиана	7,50	1,12	159	7,54
Лекарственная форма G: APIDRA + 20 мМ трифосфата N=15	Среднее ± CO	17,7 ± 4,02	1,65 ± 0,196	166 ± 11,7	7,75 ± 0,527
	Медиана	10,0	1,52	153	7,85
Лекарственная форма H: NOVOLOG + 20 мМ трифосфата N=14	Среднее ± CO	27,9 ± 10,8	1,10 ± 0,111	121 ± 12,7	10,9 ± 0,784
	Медиана	12,5	0,980	108	11,1

Сокращения: Tmax – время при максимальной концентрации инсулина, Cmax – максимальная концентрация инсулина, AUC_{беск.} – площадь под кривой от 0 до бесконечности, CL/F – клиренс/биодоступность.

ФК/ФД данные демонстрируют, что использование трифосфата в лекарственных формах различных промышленных инсулинов ускоряет время действия и сокращает Tmax, по сравнению с HUMALOG без трифосфата. Все лекарственные формы, содержащие 20 мМ трифосфата, вызывали сокращение Tmax по сравнению с чистым HUMALOG. Лекарственные формы, содержащие APIDRA и HUMULIN с 20 мМ трифосфата, вызывали увеличение Cmax по сравнению с чистым HUMALOG.

Клиническое исследование

Проводили клиническое исследование для изучения фармакокинетического и фармакодинамического действия композиций согласно настоящему изобретению.

Исследование разрабатывали как перекрестное исследование в 5 периодах для сравнения влияния подкожных (SC) доз 4 лекарственных форм, содержащих различные концентрации трифосфата с инсулином лизпро, с лекарственной формой инсулина лизпро без трифосфата. Экспериментальные препараты составляли посредством добавления достаточного количества трифосфата и хлорида магния к промышленному препарату инсулина лизпро U200 для достижения концентраций, указанных ниже в таблице 11:

Таблица 11. Композиции экспериментальных и контрольных препаратов.

Название препарата	Композиция препарата
HUMALOG	100 Е/мл инсулина лизпро 7 мМ фосфата натрия 0,3 мМ Zn 16 мг/мл глицерина 3,15 мг/мл м-крезола
Лекарственная форма I	+ 10 мМ трифосфата
Лекарственная форма J	+ 20 мМ трифосфата
Лекарственная форма K	+ 30 мМ трифосфата
Лекарственная форма L	+ 30 мМ трифосфата + 7,5 мМ MgCl ₂

Кроме инсулина лизпро, лекарственная форма HUMALOG U-200, в которую для получения экспериментальных препаратов добавляли трифосфат и MgCl₂, содержала также 5 мг/мл трометамин, 16 мг/мл глицерина, 3,15 мг/мл м-крезола и 0,046 мг/мл Zn²⁺.

В исследование включали здоровых субъектов, и каждому субъекту случайным образом назначали последовательность лечения, включающую 15 однократных SC доз чистого инсулина лизпро и 15 однократных SC доз каждого из экспериментальных препаратов. Для каждого отдельного субъекта необходимо выдерживать не менее 3 дней между вводами доз.

Образцы крови собирали в несколько моментов времени для определения концентраций инсулина лизпро в сыворотке в зависимости от времени. Концентрации инсулина лизпро в сыворотке измеряли с помощью надежного твердофазного иммуноферментного анализа, специфического для инсулина лизпро. Фармакокинетические анализы проводили стандартными некомпантментными методами анализа с помощью Phoenix® версии 7.0 (или выше) и программного обеспечения S-PLUS® (версии 8.2). Для

расчета фармакокинетических параметров использовали концентрации свободного инсулина лизпро в сыворотке. Результаты представлены ниже в таблице 12.

Таблица 12. Данные ФК.

	Лечение	Средние значения LS	Соотношение экспериментальный препарат/эталон (ДИ 95%)
Т _{нач.} (мин.)	Humalog	1,78	
	Лекарственная форма I	0,12	0,07 (0,04, 0,10)
	Лекарственная форма J	0,10	0,05 (0,04, 0,08)
	Лекарственная форма K	0,09	0,05 (0,03, 0,07)
	Лекарственная форма L	0,08	0,04 (0,03, 0,07)
Раннее 50% Т _{max} (мин.)	Humalog	19,06	
	Лекарственная форма I	6,04	0,32 (0,26, 0,38)
	Лекарственная форма J	5,04	0,26 (0,23, 0,31)
	Лекарственная форма K	4,73	0,25 (0,21, 0,30)
	Лекарственная форма L	4,58	0,24 (0,20, 0,29)
AUC _(0-15мин.) (пмоль*ч./л)	Humalog	19,87	
	Лекарственная форма I	136,98	6,89 (5,44, 8,74)
	Лекарственная форма J	155,78	7,84 (6,19, 9,93)
	Лекарственная форма K	156,21	7,86 (6,21, 9,96)

	Лекарственная форма L	157,25	7,92 (6,27, 10,00)
AUC _(0-30мин.) (пмоль*ч./л)	Humalog	120,07	
	Лекарственная форма I	371,42	3,09 (2,63, 3,64)
	Лекарственная форма J	393,84	3,28 (2,79, 3,86)
	Лекарственная форма K	397,06	3,31 (2,81, 3,89)
	Лекарственная форма L	393,79	3,28 (2,79, 3,85)
Позднее 50% t _{max} (мин.)	Humalog	168,28	
	Лекарственная форма I	86,10	0,51 (0,45, 0,58)
	Лекарственная форма J	82,10	0,49 (0,42, 0,57)
	Лекарственная форма K	80,80	0,48 (0,44, 0,52)
	Лекарственная форма L	84,52	0,50 (0,45, 0,56)

Сокращения: LS – полученные методом наименьших квадратов, ДИ – доверительный интервал, T_{нач.} – время до начала появления инсулина, раннее 50% T_{max} – время до ранней полумаксимальной концентрации лекарственного средства, AUC_(0-15мин.) – площадь под кривой с нулевого времени до 15 минут, AUC_(0-30мин.) – площадь по дкривой с нулевого времени до 30 минут, позднее 50% t_{max} – время до поздней полумаксимальной концентрации лекарственного средства. Значение Р для всех экспериментальных препаратов по сравнению с контрольным препаратом Humalog составляло <0,0001.

Результаты демонстрируют, что лекарственные формы, содержащие трифосфат, характеризуются ускоренными фармакокинетическими параметрами по сравнению с контрольным образцом, не содержащим трифосфат.

Кроме того, в каждом периоде проводили 5-часовой эугликемический глюкозный клэмп-тест для оценки глюкодинамического ответа на каждое лечение. В данном исследовании в качестве меры воздействия инсулина использовали скорость инфузии

глюкозы (GIR) в зависимости от времени. На все отдельные профили зависимости GIR от времени наносили локально взвешенное сглаживание диаграммы рассеяния (LOESS) в каждой экспериментальной группе и/или периоде, используя программное обеспечение S-PLUS версии 8.2. Сглаженные данные для каждого субъекта использовали для расчета

5 глюкодинамических параметров.

Анализ данных демонстрирует, что лекарственные формы, содержащие трифосфат, характеризуются улучшенными фармакодинамическими параметрами по сравнению с контрольным образцом, не содержащим трифосфат. Исследования, описанные выше, демонстрируют, что добавление небольшого количества некоторых полифосфатов, таких

10 как пирофосфат или трифосфат, в лекарственные препараты инсулина может вызывать сокращение T_{max} и увеличение C_{max} на фармакокинетическом профиле инсулина.

Последовательности

А-цепь инсулина человека

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn (SEQ ID NO:1)

5

В-цепь инсулина человека

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr (SEQ ID NO: 2).

10 В-цепь инсулина лизпро

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr (SEQ ID NO: 3).

В-цепь инсулина аспарта

15 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr (SEQ ID NO: 4).

В-цепь инсулина глулизина

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
20 Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr (SEQ ID NO: 5).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Фармацевтическая композиция, содержащая инсулин и полифосфатное соединение, выбранное из группы, состоящей из пиррофосфата, трифосфата, триметафосфата и тетрафосфата, при условии, что указанная композиция не содержит ни сахаридный мультимер, ни ЭДТК.
2. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что полифосфатное соединение представляет собой трифосфат.
3. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что концентрация трифосфата составляет от примерно 5 до примерно 50 мМ.
4. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что концентрация трифосфата составляет от примерно 10 до примерно 30 мМ.
5. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что концентрация трифосфата составляет от примерно 20 до примерно 25 мМ.
6. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что концентрация трифосфата составляет примерно 20 мМ.
7. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-6, дополнительно содержащая цинк.
8. Фармацевтическая композиция по п. 7, отличающаяся тем, что концентрация цинка составляет от примерно 0,2 до примерно 5 мМ.
9. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащая агент тоничности.
10. Фармацевтическая композиция по п. 9, отличающаяся тем, что агент тоничности представляет собой глицерин.
11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-10, дополнительно содержащая один или более консервантов.
12. Фармацевтическая композиция по п. 11, отличающаяся тем, что один или более консервантов выбраны из группы, состоящей из фенола, мета-крезола и бензилового спирта.
13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что инсулин выбран из группы, состоящей из человеческого инсулина, инсулина лизпро, инсулина аспарта и инсулина глулизина.
14. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, концентрация инсулина составляет от примерно 40 до примерно 500 МЕ/мл.

15. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, концентрация инсулина составляет от примерно 100 до примерно 200 МЕ/мл.
16. Способ лечения диабета, включающий введение человеку, нуждающемуся в этом, эффективной дозы фармацевтической композиции по любому из пп. 1-15.
- 5 17. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-15 для применения в качестве лекарственного средства.
18. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-15 для применения для лечения диабета.
19. Изделие, содержащее любую из фармацевтических композиций по пп. 1-15.
- 10 20. Изделие по п. 19, представляющее собой многоразовый флакон.
21. Изделие по п. 20, представляющее собой многоразовую шприц-ручку.
22. Изделие по п. 21, представляющее собой предварительно наполненную одноразовую шприц-ручку.
23. Изделие по п. 22, представляющее собой автоинъектор.
- 15 24. Изделие по п. 23, представляющее собой помпу для CSII.