

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090382** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.19

(22) Дата подачи заявки
2018.07.27

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 5/48 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ В ФОРМЕ ИНЪЕКЦИОННОГО ВОДНОГО РАСТВОРА, ВКЛЮЧАЮЩИЕ, ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ, ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ ИНСУЛИН A21G И СУПРЕССОР ГЛЮКАГОНА ПРАНДИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

(31) **1757172; 1757184; 1855250**
(32) **2017.07.27; 2017.07.28; 2018.06.14**
(33) **FR**
(86) **PCT/EP2018/070510**
(87) **WO 2019/020820 2019.01.31**
(88) **2019.03.28**

(71) Заявитель:
АДОСИА (FR)
(72) Изобретатель:
Чань Ю-Пин (FR)
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, имеющего рН от 3,5 до 4,4, включающей, по меньшей мере, человеческий инсулин A21G и по меньшей мере один супрессор глюкагона с прандиальным действием. В одном варианте осуществления супрессор глюкагона с прандиальным действием выбран из группы, состоящей из аналога амилина или агониста амилинового рецептора или аналога GLP-1 или агониста рецептора GLP-1 (GLP-1 RA). В одном варианте осуществления супрессор глюкагона с прандиальным действием представляет собой аналог амилина или агонист амилинового рецептора. В одном варианте осуществления пептид, являющийся супрессором глюкагона с прандиальным действием, представляет собой прамлинтид. Изобретение также относится к способу получения человеческого инсулина A21G, включающему, по меньшей мере, стадию взаимодействия человеческого инсулина A21G, B31R, B32R (инсулин гларгин) с крысиной карбоксипептидазой В, где отношение инсулин/карбоксипептидаза находится между 500 до 2000, при рН от 7,5 до 8,5 и при температуре от 20 до 30°C в течение 10-20 ч.

A1

202090382

202090382

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561218EA/019

КОМПОЗИЦИИ В ФОРМЕ ИНЪЕКЦИОННОГО ВОДНОГО РАСТВОРА, ВКЛЮЧАЮЩИЕ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ ИНСУЛИН A21G И СУПРЕССОР ГЛЮКАГОНА ПРАНДИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

Изобретение относится к лечением путем инъекции композиции, включающей по меньшей мере человеческий инсулин A21G с прандиальным действием и супрессор глюкагона, особенно с прандиальным действием, для лечения диабета и для возможности улучшения контроля постпрандиальной гипергликемии.

Диабет 1 типа представляет собой аутоиммунное заболевание, приводящее к разрушению бета-клеток поджелудочной железы. Известно, что эти клетки продуцируют инсулин, основной ролью которого является регулирование потребления глюкозы в периферических тканях (Gerich 1993 Control of glycaemia). Следовательно, пациенты с диабетом 1 типа страдают от хронической гипергликемии и должны самостоятельно вводить экзогенный инсулин, чтобы ограничить эту гипергликемию. Инсулинотерапия коренным образом изменила среднюю продолжительность жизни у этих пациентов.

В настоящее время пациенты с диабетом 1 типа используют два типа инсулина, прандиальные инсулины короткого действия для контроля гликемии во время еды, и длительно действующие базальные инсулины для контроля гликемии в течение дня и ночи. Существует несколько типов инсулинов короткого действия, которые отличаются началом их действия. Например, человеческий инсулин, называемый регулярным инсулином, имеет отсроченное действие по сравнению с так называемыми инсулиновыми аналогами быстрого действия, такими как инсулин лизпро (Humalog[®], ELI LILLY) или инсулин аспарт (Novorapid[®], NOVO NORDISK). Таким образом, человеческий инсулин следует вводить в среднем за 30 минут до еды, тогда как инсулиновые аналоги можно вводить за 15 минут до еды или во время еды. Кроме того, считается, что инсулиновые аналоги приводят к лучшему контролю постпрандиальной гликемии, чем человеческий инсулин, и это объясняет, почему значительное большинство пациентов в Европе и в США в настоящее время используют инсулиновые аналоги быстрого действия, у которых действие короче, чем у человеческого инсулина.

Однако контроль гликемии, обеспечиваемый этими экзогенными прандиальными инсулинами после приема пищи, не является оптимальным, даже в случае инсулиновых аналогов быстрого действия. Это частью связано с тем, что эти пациенты, в отличие от здоровых субъектов, продуцируют глюкагон после приема пищи, что приводит к удалению некоторого количества глюкозы, накопленной в печени. Эта продукция глюкозы, опосредованная глюкагоном, ухудшает проблему постпрандиальной гипергликемии у этих пациентов и приводит к чрезмерному использованию инсулина.

Примерно такую же проблему регуляции постпрандиальной гликемии имеют пациенты с диабетом 2 типа, принимающие лечение инсулином, в случаях, когда их заболевание приводит к существенной потере их способности продуцировать инсулин и

амилин.

Было продемонстрировано, что супрессоры глюкагона, в частности пептиды и/или гормоны, способны ингибировать продукцию глюкагона после приема пищи, что приводит к существенному улучшению контроля постпрандиальной гликемии. Например, амилин, гормон, продуцируемый бета-клетками поджелудочной железы, продукция которого также недостаточна у пациентов с диабетом 1 типа, играет ключевую роль в регуляции постпрандиальной гликемии. Амилин, также известный под названием "островковый амилоидный полипептид" или IAPP, представляет собой состоящий из 37 аминокислот пептид, который совместно накапливается и совместно секретируется с инсулином (Schmitz 2004 Amylin Agonists). Этот пептид описан как блокатор продукции глюкагона альфа-клетками поджелудочной железы. Таким образом, инсулин и амилин имеют комплементарные и синергетические роли, поскольку инсулин обеспечивает возможность снижения концентрации глюкозы в крови, в то время как амилин обеспечивает возможность снижения поступления эндогенной глюкозы в кровь путем ингибирования продукции или секреции эндогенного глюкагона.

Однако человеческий амилин обладает свойствами, которые не совместимы с фармацевтическими требованиями, что касается растворимости и стабильности (Goldsbury CS, Cooper GJ, Goldie KN, Muller SA, Saafi EL, Gruijters WT, Misur MP, Engel A, Aebi U, Kistler J: Polymorphic fibrillar assembly of human amylin. *J Struct Biol* 119:17-27, 1997). Известно, что амилин образует амилоидные волокна, приводя к образованию нерастворимой в воде бляшки. Следовательно, необходимо разработать аналог для решения этих проблем растворимости.

Компания Amylin разработала аналог амилина, прамлинтид, для компенсации физической стабильности человеческого амилина. Этот продукт, поступаемый на рынок под названием Symlin[®], был одобрен FDA в 2005 году для лечения диабета 1 типа и 2 типа как дополнение к инсулинотерапии. Его следует вводить подкожным путем три раза в день за час до еды, чтобы улучшить контроль постпрандиальной гликемии, принимая во внимание его относительно короткий период полужизни, составляющий несколько часов. Этот пептид формулируют в композицию при pH 4,0, и было описано, что он подвержен фибриллированию, когда pH раствора выше чем 5,5. Варианты аналогов описаны в патенте США 5686411.

Аналоги амилина или агонисты амилинового рецептора, называемые "прандиальными" или "короткого действия" воспроизводят эффекты амилина, в то же время имея больший период полужизни. Эти производные амилина, которые обеспечивают возможность контроля гликемии во время еды, могут иметь период полужизни меньше 8 часов. Этот период полужизни представляет собой кажущийся период полувыведения после подкожной инъекции человеку. Период полужизни этих амилиновых аналогов или агонистов амилинового рецептора может быть меньше 5 часов, в частности меньше 4 часов, и даже меньше 3 часов.

Однако композиции, включающие амилин или амилиновый аналог, и в частности

прамлинтид, могут индуцировать некоторые побочные эффекты у пациентов. В частности, эти композиции могут вызывать тошноту у пациентов.

GLP-1, еще один физиологический пептид, также описан как играющий такую же роль, как амилин, что касается супрессии секреции глюкагона после приема пищи. GLP-1 также известен как стимулятор секреции инсулина и, таким образом, особенно эффективен при использовании в качестве дополнения к инсулину, в частности у пациентов с диабетом 2 типа. Эти действия являются глюкоза-зависимыми, что минимизирует риск гипогликемии. GLP-1 RA к настоящему времени одобрен только для пациентов с диабетом 2 типа.

Подобным образом, человеческий GLP-1 нельзя использовать в качестве терапевтического лечения из-за его чрезвычайно короткого периода полужизни. Различные GLP-1 производные, агонисты GLP-1 рецептора, называемые GLP-1 RA, или аналоги GLP-1 воспроизводят эффекты GLP-1, имея при этом более длинный период полужизни. Эти GLP-1 производные можно подразделить на три группы в зависимости от их соответствующего периода полужизни: те, которые имеют короткое действие, или прандиальные, для контроля гликемии во время еды (период полужизни меньше 8 часов), те, которые имеют действие в течение дня, которые покрывают потребности в течение дня (период полужизни больше 8 часов, или 10 часов), и те, которые имеют действие в течение недели, которые покрывают потребности в течение недели (период полужизни больше 48 часов). Что касается GLP-1 RA с прандиальным действием, два пептида, которые одобрены к настоящему времени, представляют собой эксенатид (Byetta[®], ASTRA-ZENECA, два введения ежедневно) и ликсисенатид (Lyxumia[®], SANOFI, одно введение ежедневно). Композиции этих двух GLP-1 RA формулируют при pH близком к 4, и их следует вводить за час до еды, так же как и прамлинтид.

Для инсулинозависимых пациентов одна из основных трудностей при использовании этих различных соединений-супрессоров глюкагона короткого действия связана с количеством дополнительных инъекций, которые могут варьироваться от 1 до 3 инъекций в день в дополнение к 2-4 инъекциям инсулина. Таким образом, крайне важно иметь возможность комбинировать в растворе прандиальный инсулин с супрессором глюкагона с прандиальным действием, чтобы можно было использовать эти соединения в дополнение к инсулину, не усложняя при этом лечение для пациентов. Кроме того, можно было бы более точно имитировать физиологию, поскольку оба этих гормона секретируются в ответ на прием пищи, чтобы улучшить контроль постпрандиальной гликемии, в частности, обеспечить лучший контроль постпрандиальной гипергликемии и, таким образом, лучше лечить диабет.

Но прандиальные инсулины и эти представляющие интерес пептиды несовместимы в водном растворе. Действительно, прандиальные инсулины обладают оптимальной химической стабильностью при pH близком к 7, тогда как производные амилина или GLP-1 физически и химически нестабильны при pH близком к физиологическому pH.

Эта трудность привела к созданию насосов, содержащих два резервуара для

содержания прандиального инсулина отдельно от производного амилина. Патент США US2016/001002 от компании ROCHE описывает такой насос для обеспечения совместного введения амилина и прандиального инсулина с использованием одного медицинского устройства. Однако было бы предпочтительно иметь возможность смешивать эти гормоны в водном растворе, чтобы использовать существующие медицинские устройства, которые являются более простыми и/или которые имеют пониженный риск отказа.

Другое решение этой проблемы смешивания этих гормонов в водном растворе состоит в замене воды органическим растворителем. Заявка на патент WO2013067022 от компании XERIS описывает композиции, которые включают амилин и инсулин в растворе в органическом растворителе. Однако использование органического растворителя, такого как DMSO, вызывает вопросы, связанные с безопасностью для пациента при лечении хронического заболевания, такого как диабет. Кроме того, органические растворители могут быть проблематичными для инъекционных устройств, в частности потому, что они растворяют некоторые из определенных компонентов указанных инъекционных устройств. Поэтому желательно разрабатывать эти комбинации в форме водного раствора.

Проблему стабильности в водном растворе также удалось обойти путем получения смесей в твердом состоянии. Заявка на патент EP2060268 от NOVO NORDISK описывает препараты инсулина и прамлинтида в форме распыляемого порошка для назального применения. Однако предпочтительным и наиболее используемым путем введения на сегодняшний день является подкожный путь, который требует получения готовых к употреблению водных растворов.

Другой подход состоит в объединении прандиального инсулина с производным амилина при pH, при котором это производное амилина является физически стабильным. Заявка на патент US20090192075 от компании Biodel описывает жидкую композицию, включающую человеческий инсулин, прамлинтид и хелатор цинка при pH 4,0. Эта заявка описывает быстрое действие человеческого инсулина из-за присутствия хелатирующего цинк агента. Однако известно, что человеческий инсулин не является химически стабильным при кислотном pH, этот метод не может соответствовать критериям Европейской фармакопеи и/или фармакопеи США.

Альтернативный подход состоит в модификации структуры прандиальных инсулинов для улучшения их стабильности при кислотном pH. Заявка WO2007104786 иллюстрирует композиции, включающие быстрые аналоги инсулина A21G, B28D, desB30 и A21G, B28E, desB30, которые растворимы при кислотном pH.

В заявке WO2007104786 также представлены быстрые композиции инсулина, в частности B28D (инсулин аспарт) при нейтральном pH и в присутствии поверхностно-активного вещества, и в частности глицерофосфатного производного, в частности димиристоилглицерофосфоглицерина (DMPG), что приводит к стабильности, измеряемой при помощи ThT, которая значительно превышает стабильность композиций быстрых аналогов инсулина A21G, B28D, desB30 и A21G, B28E, desB30 при кислотном pH.

В композициях предшествующего уровня техники, включающих прандиальный

инсулин и прамлинтид в комбинации, чаще всего описаны различные типы прандиальных инсулинов; однако их примеры относятся к композициям, включающим так называемые быстрые прандиальные инсулиновые аналоги, при этом последние считаются более эффективными, чем человеческий инсулин.

К удивлению, заявитель продемонстрировал, что композиция, содержащая человеческий инсулин A21G, называемый “регулярным”, то есть инсулин, отличающийся от человеческого инсулина только заменой аспарагинового остатка в положении 21 на А цепи глициновым остатком, менее быстрый, чем так называемые “быстрые” аналоги инсулина, в комбинации с супрессором глюкогона с прандиальным действием при рН в диапазоне от 3,5 до 4,4 в водном растворе обеспечивает возможность лучшего контроля постпрандиальной гликемии, чем с использованием так называемого быстрого прандиального инсулинового аналога.

Кроме того, заявитель, к удивлению, продемонстрировал, что указанная композиция, содержащая человеческий инсулин A21G, в комбинации с супрессором глюкогона с прандиальным действием при рН в диапазоне от 3,5 до 4,4 в водном растворе, демонстрирует физическую и химическую стабильность, совместимую с фармацевтическими требованиями и более высокую, чем растворы, предложенные в уровне техники.

Получение композиции в форме инъекционного водного раствора, демонстрирующей лучший контроль постпрандиальной гипергликемии и улучшенную физическую и химическую стабильность по сравнению с композициями, описанными в предшествующем уровне техники, является замечательным, поскольку специалистам в данной области техники хорошо известно, что, в случае комбинаций, очень трудно предсказать фармакокинетику продуктов в комбинациях и свойства физической и химической стабильности.

Кроме того, также продолжается поиск композиции, которая позволяет уменьшить и даже устранить все или некоторые из побочных эффектов, которые могут быть вызваны активными веществами.

Изобретение относится к композиции в форме инъекцируемого водного раствора, рН которого составляет от 3,5 до 4,4, включающего по меньшей мере так называемый регулярный человеческий инсулин A21G и по меньшей мере один супрессор глюкогона с прандиальным действием.

В соответствии с вариантом осуществления, супрессор глюкогона с прандиальным действием представляет собой аналог амилина или агонист амилинового рецептора, аналог GLP-1 или агонист рецептора GLP-1, также называемый GLP-1 RA.

Заявитель заметил, что композиция по изобретению при рН от 3,5 до 4,4 обладает фармакокинетическими свойствами, совместимыми с использованием во время приема пищи, и позволяет лучше контролировать постпрандиальную гликемию.

Кроме того, заявитель показал, что эти композиции приводят к замедлению абсорбции прамлинтида. Это характеризуется, в частности, достижением пика

прамлинтида в плазме (t_{\max}), которое значительно задерживается, и/или ранней экспозицией прамлинтида в плазме ($AUC_{0-30 \text{ мин}}$), которая значительно ниже по сравнению с введением только одного прамлинтида.

Это замедление позволяет уменьшить и даже устранить побочные эффекты прамлинтида, особенно что касается тошноты.

Изобретение также относится к применению композиции в форме инъекционного водного раствора, рН которого находится в диапазоне от 3,5 до 4,4, включающей по меньшей мере человеческий инсулин А21G и супрессор глюкагона, в частности с прандиальным действием, для улучшения контроля постпрандиальной гликемии.

Изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением, которая предназначена для применения в способе лечения диабета, отличающейся тем, что ее вводят в виде болюса перед едой.

Изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением, которая предназначена для применения в способе лечения диабета, отличающейся тем, что ее вводят для улучшения контроля постпрандиальной гликемии.

Изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением, которая предназначена для применения в способе лечения диабета, отличающейся тем, что ее вводят для улучшения контроля постпрандиальной гликемии и для уменьшения побочных эффектов прамлинтида.

Изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением, которая предназначена для применения в способе лечения диабета, отличающейся тем, что она позволяет уменьшить потребление пищи, индуцированное инсулином.

В соответствии с одним вариантом осуществления, уменьшение потребления пищи относится к периоду от введения инъекции до 4 часов после инъекции.

В соответствии с одним вариантом осуществления, уменьшение потребления пищи относится к периоду от введения инъекции до 3 часов после инъекции.

В соответствии с одним вариантом осуществления, уменьшение потребления пищи относится к периоду от введения инъекции до 2 часов после инъекции.

В соответствии с одним вариантом осуществления, уменьшение потребления пищи относится к периоду от введения инъекции до 1 часа после инъекции.

Изобретение также относится к стабильным фармацевтическим композициям, включающим такие композиции.

Требования, которые позволяют получить инъекционную фармацевтическую композицию для лечения диабета, в частности, являются следующими:

- водная жидкая композиция, которая является физически и химически стабильной в течение по меньшей мере двух недель или даже в течение одного месяца при 30°C (многократное использование) и в течение по меньшей мере одного года или даже 2 лет при 5°C,

- совместимость с антимикробными консервантами.

Подобным образом, композиции человеческого инсулина А21G с аналогом GLP-1

или агонистом GLP-1 рецептора, также называемым GLP-1 RA, например эксенатидом или ликсисенатидом, при рН от 3,5 до 4,4 обладают физической и химической стабильностью, позволяющей разработать жидкую лекарственную форму, которая стабильна в течение по меньшей мере 2 недель или даже одного месяца при 30°C, и в течение по меньшей мере одного года или даже 2 лет при 5°C.

Что касается стабильности, обычный метод измерения стабильности белков или пептидов состоит в измерении образования фибрилл при помощи тиофлавина Т, также называемого ThT. Этот метод позволяет измерять в условиях температуры и перемешивания, способствующих ускорению явления, время задержки до образования фибрилл путем измерения увеличения флуоресценции. Композиции в соответствии с изобретением имеют время задержки до образования фибрилл, которое явно больше, чем время, описанное в литературе. Композиции в соответствии с изобретением демонстрируют физическую и химическую стабильность, которая намного выше, чем описанная в предшествующем уровне техники при использовании коммерческих прандиальных инсулинов.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением демонстрируют время задержки, измеренное при помощи ThT, равное по меньшей мере 8 часам.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением демонстрируют время задержки, измеренное при помощи ThT, равное по меньшей мере 10 часам.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением демонстрируют время задержки, измеренное при помощи ThT, равное по меньшей мере 15 часам.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением демонстрируют время задержки, измеренное при помощи ThT, равное по меньшей мере 20 часам.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением демонстрируют время задержки, измеренное при помощи ThT, равное по меньшей мере 25 часам.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, рН которого находится в диапазоне от 3,5 до 4,4, включающей по меньшей мере человеческий инсулин A21G и агонист амилинового рецептора или аналог амилина. В соответствии с одним вариантом осуществления, указанный агонист амилинового рецептора или аналог амилина представляет собой прамлинтид.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, рН которого находится в диапазоне от 3,5 до 4,2, включающей по меньшей мере человеческий инсулин A21G и агонист амилинового рецептора или аналог амилина. В соответствии с одним вариантом осуществления,

указанный агонист амилинового рецептора или аналог амилина представляет собой прамлинтид.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, рН которого находится в диапазоне от 3,8 до 4,2, включающей по меньшей мере человеческий инсулин А21G и агонист амилинового рецептора или аналог амилина. В соответствии с одним вариантом осуществления, указанный агонист амилинового рецептора или аналог амилина представляет собой прамлинтид.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, который имеет рН 4,0, включающей по меньшей мере человеческий инсулин А21G и агонист амилинового рецептора или аналог амилина. В соответствии с одним вариантом осуществления, указанный агонист амилинового рецептора или аналог амилина представляет собой прамлинтид.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, который имеет рН между 3,5 и 4,4, включающей по меньшей мере человеческий инсулин А21G и агонист GLP-1 рецептора или аналог GLP-1. В соответствии с одним вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой эксенатид. В соответствии с другим вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой ликсисенатид.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного раствора, рН которого находится между 3,5 и 4,2, включающей по меньшей мере человеческий инсулин А21G и агонист GLP-1 рецептора или аналог GLP-1. В соответствии с одним вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой эксенатид. В соответствии с другим вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой ликсисенатид.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, который имеет рН между 3,8 до 4,2, включающей по меньшей мере человеческий инсулин А21G и агонист GLP-1 рецептора или аналог GLP-1. В соответствии с одним вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой эксенатид. В соответствии с другим вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой ликсисенатид.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, который имеет рН 4,0, включающей по меньшей мере человеческий инсулин А21G и агонист GLP-1 рецептора или аналог GLP-1. В соответствии с одним вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой эксенатид. В соответствии с другим вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой ликсисенатид.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, рН которого находится в диапазоне от 3,5 до 4,4, включающей по меньшей мере человеческий инсулин А21G, агонист амилинового

рецептора или аналог амилина и агонист GLP-1 рецептора или аналог GLP-1. В соответствии с одним вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой эксенатид. В соответствии с другим вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой ликсисенатид. В соответствии с еще одним вариантом осуществления, указанный агонист амилинового рецептора или аналог амилина представляет собой прамлинтид.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, рН которого находится в диапазоне от 3,5 до 4,2, включающей по меньшей мере человеческий инсулин А21G, по меньшей мере один агонист амилинового рецептора или аналог амилина и по меньшей мере один агонист GLP-1 рецептора или аналог GLP-1. В соответствии с одним вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой эксенатид. В соответствии с другим вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой ликсисенатид. В соответствии с еще одним вариантом осуществления, указанный агонист амилинового рецептора или аналог амилина представляет собой прамлинтид.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, рН которого находится в диапазоне от 3,8 до 4,2, включающей по меньшей мере человеческий инсулин А21G, по меньшей мере один агонист амилинового рецептора или аналог амилина и по меньшей мере один агонист GLP-1 рецептора или аналог GLP-1. В соответствии с одним вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой эксенатид. В соответствии с другим вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой ликсисенатид. В соответствии с еще одним вариантом осуществления, указанный агонист амилинового рецептора или аналог амилина представляет собой прамлинтид.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции в форме инъекционного водного раствора, который имеет рН 4,0, включающей по меньшей мере человеческий инсулин А21G, по меньшей мере один агонист амилинового рецептора или аналог амилина и по меньшей мере один агонист GLP-1 рецептора или аналог GLP-1. В соответствии с одним вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой эксенатид. В соответствии с другим вариантом осуществления, указанный агонист GLP-1 рецептора представляет собой ликсисенатид. В соответствии с еще одним вариантом осуществления, указанный агонист амилинового рецептора или аналог амилина представляет собой прамлинтид.

Особенно выгодно комбинировать в водном растворе человеческий инсулин А21G с аналогом амилина, агонистом рецептора амилина или GLP-1 и с аналогом GLP-1 или агонистом рецептора GLP-1, поскольку эта так называемая "тройная" комбинация позволяет, в частности, усиливать действие каждого гормона и снижать дозы каждого из них.

Композиции в форме водного раствора для инъекций по изобретению представляют собой прозрачные растворы. Под "прозрачным раствором" понимают

композиции, которые удовлетворяют критериям, описанным в фармакопее США и Европейской фармакопее, касающимся растворов для инъекций. В фармакопее США растворы определены в части <1151>, относящейся к инъекции (<1>) (ссылающейся на <788> согласно USP 35 и определенной в <788> согласно USP 35 и в <787>, <788> и <790> USP 38 (с 1 августа 2014 г.), согласно USP 38). В европейской фармакопее растворы для инъекций должны соответствовать критериям, приведенным в разделах 2.9.19 и 2.9.2

В настоящей заявке, как уже было указано, амилин относится к соединениям, описанным в патентах США №№ 5124314 и 5234906. Когда используется термин "аналог", он относится к пептиду или белку, в котором один или более конститутивных аминокислотных остатков первичной последовательности заменены другими аминокислотными остатками, и/или в котором один или более конститутивных аминокислотных остатков удалены, и/или в котором один или более конститутивных аминокислотных остатков добавлены. Процент гомологии, который принят для настоящего определения аналога, составляет 50%. В случае амилина, аналог может быть, например, получен из первичной аминокислотной последовательности амилина путем замены одной или более природных или не природных или пептидомиметических аминокислот.

Эксенатид и ликсисенатид, которые описаны в заявках US 2004/0023871 и WO 0104156, соответственно, обычно считаются агонистами рецептора GLP-1. В одном варианте осуществления супрессор глюкагона с прандиальным действием представляет собой прамлинтид (Symlin®), продаваемый компанией ASTRAZENECA AB.

В одном варианте осуществления GLP-1, аналоги GLP-1 или GLP-1 RA указаны как имеющие "короткое действие" или "прандиальные". Имеющий "короткое действие" или "прандиальный" следует понимать как означающий GLP-1, аналоги GLP-1 или GLP-1 RA, у которых кажущийся период полувыведения после подкожной инъекции человеку меньше 8 часов, в частности меньше 5 часов, предпочтительно меньше 4 часов или даже меньше 3 часов, такие как, например, эксенатид или ликсисенатид.

В одном варианте осуществления GLP-1, аналоги GLP-1 или GLP-1 RA выбраны из группы, состоящей из эксенатида (Byetta®, ASTRA-ZENECA), ликсисенатида (Lixumia®, SANOFI), их аналогов или производных и их фармацевтически приемлемых солей.

В одном варианте осуществления GLP-1, аналог GLP-1 или GLP-1 RA представляет собой эксенатид или Byetta®, его аналоги или производные и их фармацевтически приемлемые соли.

В одном варианте осуществления GLP-1, аналог GLP-1 или GLP-1 RA представляет собой ликсисенатид или Lixumia®, его аналоги или производные и их фармацевтически приемлемые соли.

В одном варианте осуществления концентрация человеческого инсулина A21G составляет от 240 до 3000 мкМ или от 40 до 500 Ед./мл.

В одном варианте осуществления концентрация человеческого инсулина A21G составляет 600 мкМ или 100 Ед./мл.

В одном варианте осуществления концентрация человеческого инсулина A21G составляет 1200 мкМ или 200 Ед./мл.

В одном варианте осуществления концентрация человеческого инсулина A21G составляет 1800 мкМ или 300 Ед./мл.

В одном варианте осуществления концентрация человеческого инсулина A21G составляет 2400 мкМ или 400 Ед./мл.

В одном варианте осуществления концентрация человеческого инсулина A21G составляет 3000 мкМ или 500 Ед./мл.

В настоящей заявке 100 Ед./мл человеческого инсулина A21G соответствует 3,5 мг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация прамлинтида составляет от 0,32 до 5 мг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация прамлинтида составляет от 0,4 до 3 мг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация прамлинтида составляет от 0,5 до 2 мг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация прамлинтида составляет от 0,5 до 1,5 мг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация прамлинтида составляет от 0,6 до 1 мг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация прамлинтида составляет 1,0 мг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация прамлинтида составляет 0,6 мг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация эксенатида составляет от 10 до 1000 мкг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация эксенатида составляет от 10 до 500 мкг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация эксенатида составляет от 20 до 400 мкг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация эксенатида составляет от 20 до 300 мкг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация эксенатида составляет от 30 до 300 мкг/мл. В одном варианте осуществления концентрация эксенатида составляет от 30 до 150 мкг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация эксенатида составляет от 40 до 150 мкг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация эксенатида составляет от 40 до 80 мкг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация эксенатида составляет 50 мкг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация ликсисенатида составляет от 20 до 1000 мкг/мл.

Ед. инсулина.

В одном варианте осуществления концентрация ликсисенатида, его аналогов или производных и их фармацевтически приемлемых солей составляет от 0,02 до 0,4 мг на 100 Ед. инсулина.

В одном варианте осуществления концентрация ликсисенатида, его аналогов или производных и их фармацевтически приемлемых солей составляет от 0,03 до 0,3 мг на 100 Ед. инсулина.

В одном варианте осуществления концентрация ликсисенатида, его аналогов или производных и их фармацевтически приемлемых солей составляет от 0,04 до 0,2 мг на 100 Ед. инсулина.

В одном варианте осуществления концентрация ликсисенатида, его аналогов или производных и их фармацевтически приемлемых солей составляет от 0,04 до 0,15 мг на 100 Ед. инсулина.

В одном варианте осуществления концентрация ликсисенатида, его аналогов или производных и их фармацевтически приемлемых солей составляет 0,1 мг на 100 Ед. инсулина.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением получают путем смешивания растворов аналогов амилина или агонистов рецептора амилина и растворов GLP-1, аналога GLP-1 или агониста рецептора GLP-1 RA в соотношениях по объему в диапазоне от 10/90 до 90/10.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением, кроме того, включают соли цинка при концентрации от 0 до 800 мкМ на 100 Ед. инсулина.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением, кроме того, включают соли цинка при концентрации от 0 до 500 мкМ на 100 Ед. инсулина.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением, кроме того, включают соли цинка при концентрации от 100 до 500 мкМ на 100 Ед. инсулина.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением, кроме того, включают соли цинка при концентрации от 200 до 400 мкМ на 100 Ед. инсулина.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением, кроме того, включают соли цинка при концентрации 300 мкМ на 100 Ед. инсулина.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением, кроме того, включают буферы.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением включают буфер, выбранный из группы, состоящей из натрий-ацетатного буфера и Tris.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением, кроме того, включают консерванты.

В одном варианте осуществления консерванты выбраны из группы, состоящей из м-крезола и фенола, отдельно или в смеси.

В одном варианте осуществления концентрация консервантов составляет от 10 до 50 мМ.

В одном варианте осуществления концентрация консервантов составляет от 10 до 40 мМ.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением, кроме того, включают поверхностно-активное вещество.

В одном варианте осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из Полоксамера 188, Tween[®] 20, также называемого Полисорбат 20, и Tween[®] 80, также называемого Полисорбат 80.

В одном варианте осуществления концентрация Tween[®] 20 варьируется от 5 до 50 мкг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация Tween[®] 20 варьируется от 5 до 25 мкг/мл.

В одном варианте осуществления концентрация Tween[®] 20 составляет 10 мкМ.

Композиции в соответствии с изобретением, кроме того, могут включать добавки, такие как регуляторы тоничности.

В одном варианте осуществления регуляторы тоничности выбраны из группы, состоящей из глицерина, хлорида натрия, маннита и глицина.

В одном варианте осуществления композиции в соответствии с изобретением, кроме того, включают антиоксидант.

В одном варианте осуществления антиоксидант представляет собой метионин.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, кроме того, включает по меньшей мере один промотор абсорбции, выбранный из промоторов абсорбции, промоторов диффузии или сосудорасширяющих средств, отдельно или в смеси.

Промоторы абсорбции включают, но не ограничиваются этим, поверхностно-активные вещества, например, соли желчных кислот, соли жирных кислот или фосфолипиды; никотиновые соединения, такие как никотинамиды, никотиновые кислоты, ниацин, ниацинамид, витамин В3 и его соли; ингибиторы панкреатического трипсина; соли магния; полиненасыщенные жирные кислоты; фосфатидилхолин дидеканоил; аминокполикарбоксилаты; толметин; капрат натрия; салициловую кислоту; олеиновую кислоту; линолевую кислоту; эйкозапентаеновую кислоту (EPA); докозагексаеновую кислоту (DHA); бензиловую кислоту; доноры оксида азота, например, 3-(2-гидрокси-1-(1-метилэтил)-2-нитрозогидразино)-1-пропанамин, N-этил-2-(1-этилгидрокси-2-1-нитрозогидразино)этанамин или S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин; желчные кислоты, глицин в его конъюгированной форме с желчной кислотой; аскорбат натрия, аскорбат калия; салицилат натрия, салицилат калия, ацетилсалициловую кислоту, салицилосалициловую кислоту, ацетилсалицилат алюминия, холинсалицилат, салициламид, ацетилсалицилат лизина; эксаламид; дифлунисал; этензамид; EDTA; отдельно или в смеси.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, кроме того, включает по меньшей мере один промотор диффузии. Примеры промоторов диффузии включают, но не ограничиваются этим, гликозаминогликаны, например, гиалуронидазу.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, кроме того, включает по меньшей мере одно сосудорасширяющее средство.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, кроме того, включает по меньшей мере одно сосудорасширяющее средство, индуцирующее гиперполяризацию путем блокирования кальциевых ионных каналов.

В одном варианте осуществления сосудорасширяющее средство, индуцирующее гиперполяризацию путем блокирования кальциевых ионных каналов, представляет собой аденозин, гиперполяризующий агент, происходящий из эндотелия, ингибитор фосфодиэстеразы типа 5 (PDE5), агент открытия калиевых каналов или любую комбинацию этих средств.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, кроме того, включает по меньшей мере одно сосудорасширяющее средство с АМРс-опосредованием.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, кроме того, включает по меньшей мере одно сосудорасширяющее средство с GMPc-опосредованием.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, кроме того, включает по меньшей мере одно сосудорасширяющее средство, выбранное из группы, включающей сосудорасширяющие средства, которые действуют, индуцируя гиперполяризацию путем блокирования кальциевых ионных каналов, сосудорасширяющие средства, действие которых опосредовано АМРс, и сосудорасширяющие средства, действие которых опосредовано GMPc.

Такое по меньшей мере одно сосудорасширяющее средство выбрано из группы, включающей доноры оксида азота, например, нитроглицерин, изосорбиддинитрат, изосорбидмононитрат, амилнитрат, эритритил, тетранитрат и нитропруссид; простаглицлин и его аналоги, например, эпопростенол натрия, илопрост, эпопростенол, трепростинил или селексипаг; гистамин, 2-метилгистамин, 4-метилгистамин; 2-(2-пиридил)этиламин, 2-(2-тиазолил)этиламин; папаверин, папаверин гидрохлорид; миноксидил; дипиридамола; гидралазин; аденозин, аденозин трифосфат; уридин трифосфат; GPLC; L-карнитин; аргинин; простаглицлин D2; соли калия; и, в некоторых случаях, антагонисты α_1 и α_2 рецепторов, например, празозин, феноксибензамин, фентоламин, дибенамин, моксисилит гидрохлорид и толазолин), бетазол, димаприт; агонисты β_2 рецепторов, например, изопротеренол, добутамина, албутерола, тербуталина, аминофиллина, теофиллина, кофеина; алпростадил, амбрисентан; каберголин; диазоксид; дигидралазин мезилат; дилтиазем гидрохлорид; эноксимон; флунаризин гидрохлорид; экстракт *Ginkgo biloba*; левозимендан; молзидомин; оксалатную соль нафтидрофуриловой кислоты; никорандил; пентоксифиллин; феноксибензамин хлорид; пирибедиловое основание; пирибедил мезилат; регаденозон моногидрат; риоцикват; силденафил цитрат, тадалафил, тригидратированный варденафил гидрохлорид; триметазидин гидрохлорид;

тринитрин; верапамил гидрохлорид; антагонисты рецепторов эндотелина, например, аванафил и босентран моногидрат; и ингибиторы кальциевых каналов, например амлодипин, аранидипин, азелнидипин, барнидипин, бенидипин, цилнидипин, клеvidипин, исрадипин, эфонидипин, фелодипин, лацидипин, лерканидипин, манидипин, никардипин, нифедипин, нилвадипин, нимодипин, низолдипин, нитрендипин, прандипин; отдельно или в смеси.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 3,5 мг/мл - 10,5 мг/мл человеческого инсулина A21G, 0,6 мг/мл - 3 мг/мл прамлинтида, 25 мМ м-крезола, 184 мМ глицерина при pH 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать от 300 до 900 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности от 8 до 10 мкМ, и особенно предпочтительно 8 мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 3,5 мг/мл человеческого инсулина A21G, 0,6-1 мг/мл прамлинтида, 25-30 мМ м-крезола, 150-200 мМ глицерина, при pH 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 300 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности от 8 до 10 мкМ, и особенно предпочтительно 8 мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 3,5 мг/мл человеческого инсулина A21G, 0,6 мг/мл прамлинтида, 25 мМ м-крезола, 184 мМ глицерина, при pH 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 300 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности 10 мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 3,5 мг/мл человеческого инсулина A21G, 0,6 мг/мл прамлинтида, 25 мМ м-крезола, 184 мМ глицерина, при pH 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 300 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности 8 мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 3,5 мг/мл человеческого инсулина A21G, 1,0 мг/мл прамлинтида, 25 мМ м-крезола, 184 мМ глицерина, при pH 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 300 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности 8 мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 7,0 мг/мл человеческого инсулина A21G, от 1,2 до 2,0 мг/мл прамлинтида, 25 мМ м-крезола, 150-200 мМ глицерина, при pH 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 600 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности от 8 до 10 мкМ, и особенно предпочтительно 8 мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 7,0 мг/мл человеческого инсулина A21G, 1,2 мг/мл прамлинтида, 25 мМ м-крезола, 184 мМ глицерина, при pH 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 600 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности 10 мкМ.

мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 7,0 мг/мл человеческого инсулина А21G, 1,2 мг/мл прамлингида, 25 мМ м-крезола, 184 мМ глицерина, при рН 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 600 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности 8 мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 7,0 мг/мл человеческого инсулина А21G, 2,0 мг/мл прамлингида, 25 мМ м-крезола, 184 мМ глицерина, при рН 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 600 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности 8 мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 10,5 мг/мл человеческого инсулина А21G, 1,8-3 мг/мл прамлингида, 25 мМ м-крезола, 150-200 мМ глицерина, при рН 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 900 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности от 8 до 10 мкМ, и особенно предпочтительно 8 мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 10,5 мг/мл человеческого инсулина А21G, 1,8 мг/мл прамлингида, 25 мМ м-крезола, 184 мМ глицерина, при рН 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 900 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности 10 мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 10,5 мг/мл человеческого инсулина А21G, 1,8 мг/мл прамлингида, 25 мМ м-крезола, 184 мМ глицерина, при рН 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 900 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности 8 мкМ.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит 10,5 мг/мл человеческого инсулина А21G, 3 мг/мл прамлингида, 25 мМ м-крезола, 184 мМ глицерина, при рН 4,0. Эта композиция, кроме того, может содержать 900 мкМ цинка. Эта композиция, кроме того, может включать полисорбат 20, в частности 8 мкМ.

Композиции в соответствии с изобретением могут, кроме того, включать все эксципиенты в соответствии с фармакопеями, в частности, Европейской фармакопеей и/или фармакопеей США, и совместимые с инсулинами, используемыми в обычных концентрациях.

В соответствии с одним вариантом осуществления, композиция может быть в твердой или лиофилизированной форме. Эту композицию можно затем использовать для восстановления раствора или препарата.

Рассматриваемые способы введения представляют собой внутривенный, подкожный, внутрикожный или внутримышечный путь.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, способ введения представляет собой подкожный путь.

Также рассматриваются трансдермальный, пероральный, назальный, вагинальный, глазной, буккальный, пульмональный пути введения.

Изобретение также относится к имплантируемому или транспортабельному насосу, включающему композицию в соответствии с изобретением.

Изобретение также относится к применению композиции в соответствии с изобретением, которая предназначена для помещения в имплантируемый или транспортабельный насос.

Изобретение также относится к композициям с однократной дозой.

В одном варианте осуществления композиции находятся в форме раствора для инъекций.

Преимуществом является то, что композицию по изобретению можно получить простым смешиванием водного раствора аналога амилина или агониста рецептора амилина и человеческого инсулина A21G в водном растворе или в лиофилизированной форме.

При необходимости композицию смеси корректируют, что касается эксципиентов, таких как глицерин, м-крезол, хлорид цинка и полисорбат 20 (Tween® 20). Их добавление можно осуществить путем добавления концентрированных растворов указанных эксципиентов.

В одном варианте осуществления композиции характеризуются тем, что указанные композиции имеют растворимость при pH 4,0 и физическую стабильность, измеренную при помощи ThT, выше, чем у эталонной композиции, включающей аналог амилина или агонист рецептора амилина и коммерческий прандиальный инсулин.

ThT измеряют в соответствии с протоколом, описанным в примерах.

В одном варианте осуществления композиции характеризуются тем, что указанные композиции имеют растворимость при pH 4,0 и физическую стабильность, измеренную при помощи ThT, выше, чем у эталонной композиции, включающей GLP-1, аналог GLP-1 или агонист рецептора GLP-1 и коммерческий прандиальный инсулин.

Инсулин и аналоги инсулина могут быть получены методами рекомбинантной ДНК с использованием бактерий, таких как *Escherichia coli*, и дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae* (см., например, G. Walsh Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005, 67, 151-159). Как правило, продуцируют проинсулин, который затем расщепляют ферментами, такими как трипсин и карбоксипептидаза В, для получения желаемой последовательности.

Для получения человеческого инсулина A21G проинсулин кодируют таким образом, чтобы глицин находился в A21, и после расщепления трипсином и карбоксипептидазой В получают желаемый инсулин. Процедура получения описана Kohn et al., в Peptides 2007, 28, 935-948.

Изобретение также относится к способу получения человеческого инсулина A21G,

включающему по меньшей мере одну стадию, состоящую во взаимодействии человеческого инсулина A21G, B31R, B32R (инсулин гларгин) с крысиной карбоксипептидазой В при соотношении инсулин/карбоксипептидаза от 500 до 2000, при рН от 7,5 до 8,5 и температуре от 20 до 30°C в течение от 10 до 20 часов. Затем продукт может быть очищен. Очистку можно осуществить жидкостной хроматографией.

Таким образом, человеческий инсулин A21G можно получить путем удаления двух аргининов из инсулина гларгина путем расщепления карбоксипептидазой В. После ферментативного расщепления человеческий инсулин A21G очищают хроматографией, а затем выделяют лиофилизацией или кристаллизацией с использованием традиционных способов.

Описание чертежей:

Фиг. 1: Графическое определение времени задержки фибриллирования.

Фиг. 1 представляет графическое определение времени задержки фибриллирования на основании виртуального примера. На оси абсцисс показано время в минутах, а на оси ординат показана флуоресценция ThT в произвольных единицах (а.у.), и LT означает время задержки.

Фиг. 2: Концентрации прамлинтида и инсулина в плазме после введения композиции A21-8 (среднее значение \pm стандартное отклонение)

Квадраты представляют концентрацию инсулина, а треугольники представляют концентрацию прамлинтида.

На оси абсцисс показано время в минутах после инъекции; на оси ординат слева показана концентрация инсулина с поправкой на исходный уровень в пмоль/л, а на оси ординат показана концентрация прамлинтида с поправкой на исходный уровень в пмоль/л.

Фиг. 3: Гликемия после введения композиции A21-8 (среднее значение \pm стандартное отклонение).

На оси абсцисс показано время в минутах после инъекции, а на оси ординат показана гликемия в % от исходного уровня.

Фиг. 4: Концентрация прамлинтида после введения композиции A21-9 (кривая с квадратами) и PRAM (кривая с треугольниками) (среднее значение \pm стандартное отклонение).

На оси абсцисс показано время в минутах после инъекции, а на оси ординат показаны концентрации прамлинтида с поправкой на исходный уровень (концентрации до введения препарата вычитаются индивидуально), в пмоль/л.

Примеры

Пример 1. Получение человеческого инсулина A21G

5 г инсулина гларгина (Gan & Lee Pharmaceuticals) смешивают с ферментом карбоксипептидазой В (Reference 08039852001; Sigma-Aldrich) при рН 8,0 (рН доведен путем добавления Tris буфера) и смеси дают выстояться в течение 17 часов при 25°C, при этом концентрация инсулина гларгина составляет приблизительно 4 мг/мл. Соотношение

фермент/гларгин составляет 1/500. Смесь затем очищают жидкостной хроматографией, диализуют против хлористоводородной кислоты 0,01N и затем лиофилизируют. В результате получают человеческий инсулин A21G с чистотой 98% и выходом приблизительно 90%. Молекулярная масса инсулина, измеренная методом масс-спектрометрии (времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией), составляет 5752 Да. Человеческий инсулин A21G также можно получить с использованием рекомбинантного метода, как описано Kohn et al. (Peptides 2007, 28, 935-948).

Пример 2. Композиции прандиальных инсулинов и прамлинтида, эксенатида или ликсисенатида при кислотном pH.

Получение раствора человеческого инсулина A21G 100 Ед./мл (3,5 мг/мл) и прамлинтида 1 мг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ), глицерин (184 мМ) и хлорид цинка (300 мкМ), при кислотном pH от 3,5 или 4,0.

Концентрированный раствор эксципиентов (м-крезол, глицерин) добавляют к концентрированному раствору человеческого инсулина A21G (300 Ед./мл при pH 3,5). Концентрированный раствор прамлинтида (Ambiopharm) (10 мг/мл при pH 4) и концентрированный раствор хлорид цинка добавляют к этому концентрированному раствору человеческого инсулина A21G и эксципиентов, чтобы таким образом получить желаемую конечную композицию. Конечный pH, т.е. 3,5 или 4,0, доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Полученный раствор является прозрачным и гомогенным; его подвергают 0,22 мкм фильтрации и хранят в стеклянных картриджах (1 мл раствора на картридж).

Получение раствора человеческого инсулина A21G 100 Ед./мл и прамлинтида 0,6 мг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ), глицерин (184 мМ) и хлорид цинка (300 мкМ), при кислотном pH 4,0.

Этот раствор получают таким же способом, как раствор, представленный выше.

Получение раствора человеческого инсулина A21G 100 Ед./мл и прамлинтида 1 мг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ) и глицерин (184 мМ), при кислотном pH 4,0.

Концентрированный раствор эксципиентов (м-крезол, глицерин) добавляют к концентрированному раствору человеческого инсулина A21G (800 Ед./мл при pH 3,5). Концентрированный раствор прамлинтида (10 мг/мл при pH 4) добавляют к этому концентрированному раствору человеческого инсулина и эксципиентов, чтобы таким образом получить желаемую конечную композицию. Конечный pH, т.е. 4,0, доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Полученный раствор является прозрачным и гомогенным; его подвергают 0,22 мкм фильтрации и хранят в стеклянных картриджах (1 мл раствора на картридж).

Получение раствора человеческого инсулина A21G 100 Ед./мл и прамлинтида 1 мг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ), глицерин (184 мМ) и Tween 20 (10 мкг/мл), при pH 4.

Концентрированный раствор эксципиентов (м-крезол, глицерин) добавляют к

концентрированному раствору человеческого инсулина A21G (300 Ед./мл при рН 3,5). Концентрированный раствор прамлинтида (10 мг/мл при рН 4) и концентрированный раствор Tween 20 добавляют к этому концентрированному раствору человеческого инсулина A21G и эксципиентов, чтобы таким образом получить желаемую конечную композицию. Конечный рН доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Полученный раствор является прозрачным и гомогенным; его подвергают 0,22 мкм фильтрации и хранят в стеклянных картриджах (1 мл раствора на картридж).

Получение раствора человеческого инсулина A21G 100 Ед./мл и прамлинтида 1 мг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ), глицерин (184 мМ), хлорид цинка (300 мкМ) и Tween 20 (10 мкг/мл), при рН 4.

Концентрированный раствор эксципиентов (м-крезол, глицерин) добавляют к концентрированному раствору человеческого инсулина A21G (300 Ед./мл при рН 3,5). Концентрированный раствор прамлинтида (10 мг/мл при рН 4), концентрированный раствор хлорида цинка и концентрированный раствор Tween 20 добавляют к этому концентрированному раствору человеческого инсулина A21G и эксципиентов, чтобы таким образом получить желаемую конечную композицию. Конечный рН доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Полученный раствор является прозрачным и гомогенным; его подвергают 0,22 мкм фильтрации и хранят в стеклянных картриджах (1 мл раствора на картридж).

Получение раствора человеческого инсулина A21G 100 Ед./мл и эксенатида 50 мкг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ), глицерин (184 мМ) и хлорид цинка (300 мкМ), при кислотном рН.

Концентрированный раствор эксципиентов (м-крезол, глицерин) добавляют к концентрированному раствору человеческого инсулина A21G (300 Ед./мл при рН 3,5). Концентрированный раствор эксенатида (Bachem) (10,5 мг/мл при рН 4) и концентрированный раствор хлорида цинка добавляют к этому концентрированному раствору человеческого инсулина A21G и эксципиентов, чтобы таким образом получить желаемую конечную композицию. Конечный рН 4,0 доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Полученный раствор является прозрачным и гомогенным; его подвергают 0,22 мкм фильтрации и хранят в стеклянных картриджах (1 мл раствора на картридж).

Получение раствора человеческого инсулина A21G 100 Ед./мл и ликсисенатида 100 мкг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ), глицерин (184 мМ) и хлорид цинка (300 мкМ), при кислотном рН.

Концентрированный раствор эксципиентов (м-крезол, глицерин) добавляют к концентрированному раствору человеческого инсулина A21G (230 Ед./мл при рН 3,5). Концентрированный раствор ликсисенатида (Ambiopharm) (10,5 мг/мл при рН 4) и концентрированный раствор хлорида цинка добавляют к этому концентрированному раствору человеческого инсулина A21G и эксципиентов, чтобы таким образом получить

желаемую конечную композицию. Конечный pH 4,0 доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Полученный раствор является прозрачным и гомогенным; его подвергают 0,22 мкм фильтрации и хранят в стеклянных картриджах (1 мл раствора на картридж).

Получение раствора человеческого инсулина A21G 100 Ед./мл, эксенатида 50 мкг/мл и прамлинтида 0,6 мг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ), глицерин (184 мМ) и Tween 20 (10 мкг/мл), при кислотном pH 4,0.

Концентрированный раствор эксципиентов (м-крезол, глицерин) добавляют к концентрированному раствору человеческого инсулина A21G (300 Ед./мл при pH 3,5). Концентрированный раствор прамлинтида (Ambiopharm) (10 мг/мл при pH 4), концентрированный раствор эксенатида (Bachem) (10,5 мг/мл при pH 4) и концентрированный раствор Tween 20 добавляют к этому концентрированному раствору человеческого инсулина A21G и эксципиентов, чтобы таким образом получить желаемую конечную композицию. Конечный pH 4,0 доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Полученный раствор является прозрачным и гомогенным; его подвергают 0,22 мкм фильтрации и хранят в стеклянных картриджах (1 мл раствора на картридж).

Получение раствора человеческого инсулина 100 Ед./мл и прамлинтида 1 мг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ), глицерин (184 мМ) и хлорид цинка (300 мкМ), при кислотном pH 3,5 или 4,0.

Концентрированный раствор эксципиентов (м-крезол, глицерин) добавляют к концентрированному раствору человеческого инсулина (Amphastar Pharmaceuticals) (800 Ед./мл при pH 3,5). Концентрированный раствор прамлинтида (10 мг/мл при pH 4) и концентрированный раствор хлорида цинка добавляют к этому концентрированному раствору человеческого инсулина и эксципиентов, чтобы таким образом получить желаемую конечную композицию. Конечный pH, т.е. 3,5 или 4,0, доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Полученный раствор является прозрачным и гомогенным; его подвергают 0,22 мкм фильтрации и хранят в стеклянных картриджах (1 мл раствора на картридж).

Получение раствора инсулина аспарт 100 Ед./мл и прамлинтида 1 мг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ), глицерин (184 мМ) и хлорид цинка (300 мкМ), при кислотном pH 3,5 или 4,0.

Концентрированный раствор эксципиентов (м-крезол, глицерин) добавляют к концентрированному раствору инсулина аспарт (HEC Pharmaceuticals) (500 Ед./мл при pH 3). Концентрированный раствор прамлинтида (10 мг/мл при pH 4) и концентрированный раствор хлорида цинка добавляют к этому концентрированному раствору инсулина аспарт и эксципиентов, чтобы таким образом получить желаемую конечную композицию. Конечный pH, т.е. 3,5 или 4,0, доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Раствор, доведенный до pH 4,0, является мутным после доведения pH. Раствор, доведенный до pH 3,5, является прозрачным. Его подвергают 0,22

мкм фильтрации и хранят в стеклянных картриджах (1 мл раствора на картридж).

Получение раствора инсулина лизпро 100 Ед./мл и прамлинтида 1 мг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ), глицерин (184 мМ) и хлорид цинка (300 мкМ), при кислотном рН 3,5 или 4,0.

Концентрированный раствор эксципиентов (м-крезол, глицерин) добавляют к концентрированному раствору инсулина лизпро (Gan & Lee Pharmaceuticals) (650 Ед./мл при рН 3). Концентрированный раствор прамлинтида (10 мг/мл при рН 4) и концентрированный раствор хлорида цинка добавляют к этому концентрированному раствору инсулина лизпро и эксципиентов, чтобы таким образом получить желаемую конечную композицию. Конечный рН, т.е. 3,5 или 4,0, доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Полученный раствор является прозрачным и гомогенным; его подвергают 0,22 мкм фильтрации и хранят в стеклянных картриджах (1 мл раствора на картридж).

Получение раствора инсулина глужизина 100 Ед./мл и прамлинтида 1 мг/мл, содержащего эксципиенты коммерческого продукта Apidra® (29 мМ м-крезола, 50 мМ Tris, 86 мМ хлорида цинка и 8,15 мкМ Tween 20), при кислотном рН 3,0, 3,5 или 4,0.

рН коммерческого раствора инсулина глужизина, Apidra®, доводят до рН 2,5 путем добавления водного раствора HCl. Этот раствор добавляют к прамлинтиду в форме порошка, чтобы таким образом получить раствор, содержащий 100 Ед./мл инсулина и 1 мг/мл прамлинтида. Конечный рН доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Растворы, доведенные до рН 3,5 и 4,0, являются мутными после доведения рН. Раствор, доведенный до рН 3,0, является прозрачным. Его подвергают 0,22 мкм фильтрации и хранят в стеклянных картриджах (1 мл раствора на картридж). После нескольких часов хранения раствор является мутным и гетерогенным.

Получение раствора прамлинтида 1 мг/мл, содержащего м-крезол (20 мМ), маннит (236 мМ) и буфер уксусная кислота/ацетат натрия (30 мМ), при рН 4,0.

Концентрированный раствор прамлинтида при 10 мг/мл получают путем растворения прамлинтида в форме порошка, закупленного у Ambiorpharm. Этот раствор добавляют к концентрированному раствору эксципиентов (м-крезол, маннит, буфер уксусная кислота/ацетат натрия), чтобы таким образом получить желаемую конечную композицию. Конечный рН доводят до $4,0 \pm 0,2$ путем добавления NaOH/HCl.

Получение раствора человеческого инсулина A21G 100 Ед./мл и прамлинтида 0,6 мг/мл, содержащего м-крезол (25 мМ), глицерин (184 мМ), буфер уксусная кислота/ацетат натрия (18 мМ) и Tween 20 (8 мкМ), при рН 4.

Концентрированные растворы глицерина и м-крезола добавляют к концентрированному раствору человеческого инсулина A21G в буфере уксусная кислота/ацетат натрия при рН 4 (300 Ед./мл при рН 4). Концентрированный раствор прамлинтида (Ambiorpharm) (10 мг/мл при рН 4) и концентрированный раствор Tween 20 в завершение добавляют к этому концентрированному раствору человеческого инсулина

A21G и эксципиентов, чтобы таким образом получить желаемую конечную композицию. Конечный pH доводят до желаемого значения путем добавления водного раствора NaOH или HCl. Полученный раствор является прозрачным и гомогенным; его подвергают 0,22 мкм фильтрации.

Композиции, полученные как описано выше, представлены в таблице 1 ниже:

Таблица 1

Композиции инсулина и/или супрессоров глюкагона

| Композиции | Тип инсулина (Ед./мл) | Прамлин тид (мг/мл) | pH | Цинк (мкМ) | Tween 20 (мкг/мл) | GLP-1 RA | Другие эксципиенты |
|-------------------|---------------------------------|----------------------------|-----------|-------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| A21-1 | Человеческий инсулин A21G (100) | 1,0 | 4,0 | 300 | 0 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| A21-2 | Человеческий инсулин A21G (100) | 1,0 | 4,0 | 0 | 0 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| A21-3 | Человеческий инсулин A21G (100) | 1,0 | 3,5 | 300 | 0 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| A21-4 | Человеческий инсулин A21G (100) | 1,0 | 4,0 | 0 | 10 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| A21-5 | Человеческий инсулин A21G (100) | 1,0 | 4,0 | 300 | 10 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| A21-6 | Человеческий инсулин A21G (100) | 0 | 4,0 | 300 | 0 | эксенатид 50 мкг/мл | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |

| | | | | | | | |
|-------|--|-----|-----|-----|----|-----------------------------------|---|
| A21-7 | Человеческий инсулин A21G (100) | 0 | 4,0 | 300 | 0 | ликсис енатид 100 мкг/мл | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| A21-8 | Человеческий инсулин A21G (100) | 0,6 | 4,0 | 300 | 0 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| RHI-1 | Человеческий инсулин (100) | 1,0 | 4,0 | 300 | 0 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| RHI-2 | Человеческий инсулин (100) | 1,0 | 3,5 | 300 | 0 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| ASP-1 | Инсулин аспарт (100) | 1,0 | 4,0 | 300 | 0 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| ASP-2 | Инсулин аспарт (100) | 1,0 | 3,5 | 300 | 0 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| GLU-1 | Инсулин глулизин (100) | 1,0 | 4,0 | 300 | 10 | 0 | м-крезол (29 мМ) Tris (50 мМ) NaCl (86 мМ) |

| | | | | | | | |
|-------|--|-----|-----|-----|----|---|--|
| GLU-2 | Инсулин глулизин (100) | 1,0 | 3,5 | | 10 | 0 | м-крезол (29 мМ) Tris (50 мМ) NaCl (86 мМ) |
| GLU-3 | Инсулин глулизин (100) | 1,0 | 3,0 | | 10 | 0 | м-крезол (29 мМ) Tris (50 мМ) NaCl (86 мМ) |
| LIS-1 | Инсулин лизпро (100) | 1,0 | 4,0 | 300 | 0 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| LIS-2 | Инсулин лизпро (100) | 1,0 | 3,5 | 300 | 0 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
| PRAM | - | 1,0 | 4,0 | - | - | 0 | м-крезол (20 мМ) маннит (236 мМ) ацетат (30 мМ) |
| A21-9 | Человеческий инсулин A21G (100) | 0,6 | 4,0 | - | 10 | 0 | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) ацетат (18 мМ) |

| | | | | | | | |
|--------|--|-----|-----|---|----|-------------------------------|---|
| A21-10 | Человеческий инсулин A21G (100) | 0,6 | 4,0 | - | 10 | эксенат ид 50 мкг/мл | м-крезол (25 мМ) глицерин (184 мМ) |
|--------|--|-----|-----|---|----|-------------------------------|---|

Пример 3. Исследование совместимости прандиальных инсулинов с прамлинтидом при кислотном рН.

Внешний вид растворов инсулина и прамлинтида при кислотном рН.

Наблюдение осуществляют при температуре окружающей среды после 2-3 часов стабилизации раствора, хранящегося в картридже. **Таблица 2** представляет внешний вид растворов инсулина и прамлинтида, описанных выше.

Таблица 2

Внешний вид растворов инсулина и прамлинтида

| Композиция | Внешний вид |
|-------------------|--------------------|
| A21-1 | Прозрачный |
| A21-2 | Прозрачный |
| A21-3 | Прозрачный |
| RHI-1 | Прозрачный |
| RHI-2 | Прозрачный |
| ASP-1 | Мутный |
| ASP-2 | Прозрачный |
| GLU-1 | Мутный |
| GLU-2 | Мутный |
| GLU-3 | Мутный |
| LIS-1 | Прозрачный |
| LIS-2 | Прозрачный |

Из инсулинов, которые были оценены, только человеческий инсулин, инсулин лизпро и человеческий инсулин A21G позволяют получить гомогенную и прозрачную композицию с прамлинтидом при рН 4, демонстрирующую растворимость этих веществ. Инсулины аспарт и глулизин не подходят для получения прозрачной композиции с прамлинтидом при рН 4,0.

Пример 4. Исследование времени задержки фибриллирования.

Принцип

Плохая стабильность пептида может привести к образованию амилоидных фибрилл, которые определяют как упорядоченные макромолекулярные структуры. Эти фибриллы могут привести к образованию геля в образце.

Метод мониторинга флуоресценции тиофлавина Т (ThT) используют для анализа физической стабильности композиций. Тиофлавин Т представляет собой небольшую тест-

молекулу, которая имеет характерную флуоресцентную сигнатуру, когда она связывается с амилоидными фибриллами (Naiki et al. (1989) Anal. BioChem. 177, 244-249; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309, 274-284).

Этот метод позволяет отслеживать образование фибрилл при низких концентрациях ThT в неразбавленных композициях. Этот мониторинг осуществляют в условиях ускоренного старения: при перемешивании и при 37°C.

Условия эксперимента

Образцы получали непосредственно перед началом измерения. Получение каждой композиции описано в соответствующем примере. Тиофлавин Т добавляют к композиции из концентрированного исходного раствора, чтобы вызвать незначительное разбавление композиции. Концентрация тиофлавина Т в композиции составляет 40 мкМ. Объем 150 мкл композиции вводят в лунку 96-луночного планшета. Каждую композицию анализируют в трех повторах в том же самом планшете. Планшет герметично закрывают прозрачной пленкой для предотвращения испарения композиции.

Этот планшет затем помещают в камеру планшет-ридера (EnVision 2104 Multilabel, Perkin Elmer). Температуру устанавливают при 37°C и осуществляют перемешивание с использованием боковой мешалки при 960 об/мин с амплитудой 1 мм.

Считывание интенсивности флуоресценции в каждой лунке в зависимости от времени осуществляют с длиной волны возбуждения 442 нм и длиной волны эмиссии 482 нм.

Процесс фибриллирования обнаруживают по сильному увеличению флуоресценции после задержки, которая указана как время задержки.

Для каждой лунки эта задержка определена графически как место пересечения базовой линии флуоресцентного сигнала и наклона кривой флуоресценции против времени, которое определяют во время начального сильного увеличения флуоресценции, как показано на Фиг. 1. Значение времени задержки на графике соответствует среднему значению измеренного времени задержки в 3 лунках.

Прозрачные растворы прамлинтида и инсулина при pH 3,5 и 4,0 предыдущего примера затем подвергают испытанию на фибриллирование в присутствии ThT.

Время задержки, указанное в таблице 3, соответствует среднему значению от 3 измерений; интервал неопределенности соответствует стандартному отклонению между этими 3 результатами.

Таблица 3

Время задержки для растворов инсулина и прамлинтида

| Композиция | Время задержки (ч) |
|-------------------|---------------------------|
| A21-1 | 13,7 +/- 0,8 |
| A21-2 | 10,4 +/- 1,8 |
| A21-3 | 15,6 +/- 5,3 |

| | |
|-------|-------------|
| RHI-1 | 5,0 +/- 0,7 |
| RHI-2 | 1,7 +/- 0 |
| ASP-2 | 2,0 +/- 0 |
| LIS-1 | 1,8 +/- 0,1 |
| LIS-2 | 4,3 +/-0,4 |

Неожиданно, композиции, содержащие человеческий инсулин A21G, имеют время задержки фибрилляции, которое значительно больше, чем у коммерческих инсулинов, испытанных при pH 3,5 или при pH 4,0, в частности больше чем у инсулиновых аналогов быстрого действия, инсулина лизпро и инсулина аспарт.

Пример 5. Исследование времени задержки фибрилляции в присутствии Tween 20

В Таблице 4 представлено время задержки для растворов человеческого инсулина A21G и прамлинтида при pH 4 в присутствии Tween 20.

Таблица 4

Время задержки для растворов человеческого инсулина A21G и прамлинтида в присутствии Tween 20

| Композиция | Время задержки (ч) |
|-------------------|---------------------------|
| A21-4 | 38,1 +/-8,8 |
| A21-5 | 48,3 +/-9,2 |

Таким образом, физическая стабильность улучшается в присутствии Tween 20 при 10 мкг/мл

Пример 6. Физическая стабильность композиций при 30°C в статических условиях

Стеклянные картриджи, заполненные 1 мл композиций, помещают в печь, температуру которой поддерживают при 30°C. Эти картриджи проверяют визуально для определения появления видимых частиц или мутности. Эту проверку осуществляют в соответствии с рекомендациями Европейской фармакопеи (EP 2.9.20): на картридж воздействуют освещением по меньшей мере 2000 люкс и наблюдение осуществляют на белом фоне и на черном фоне. Эти результаты согласуются с фармакопеей США (USP <790>).

Таблица 5

Физическая стабильность растворов инсулина и прамлинтида при 30°C в статических условиях

| Композиция | Внешний вид через 4 недели |
|-------------------|-----------------------------------|
| A21-4 | Прозрачная |
| A21-5 | Прозрачная |

| | |
|-------|------------|
| A21-2 | Прозрачная |
| A21-1 | Прозрачная |
| A21-3 | Прозрачная |
| ASP-2 | Мутная |

Инсулин аспарт, сформулированный с прамлинтидом при pH 3,5, менее стабилен, чем человеческий инсулин A21G, сформулированный с прамлинтидом при pH 3,5 или 4,0.

Пример 7. Исследование физической стабильности человеческого инсулина A21G с эксенатидом и ликсисенатидом.

Композиции A21-6 и A21-7 помещают в картриджи и затем выдерживают при 30°C в течение 4 недель. Время задержки фибриллирования измерено для экстемпоральных композиций и представлено в таблице 6.

Таблица 6

Время задержки и физическая стабильность при 30°C в статических условиях растворов человеческого инсулина A21G и эксенатида или ликсисенатида

| Композиция | Время задержки (ч) | Внешний вид после 4 недель при 30°C |
|------------|--------------------|-------------------------------------|
| A21-6 | 18,1 +/- 5,6 | Прозрачная |
| A21-7 | 33,0 +/- 9,7 | Прозрачная |

Пример 8. Химическая стабильность композиции человеческого инсулина A21G и прамлинтида

Все композиции имеют pH 4,0 или pH 3,5 и содержат 100 Ед./мл человеческого инсулина A21G, 1 мг/мл прамлинтида, 25 мМ м-крезола и 184 мМ глицерина. Композиции хранят в стеклянных картриджах и выдерживают при 30°C в статических условиях. Человеческий инсулин A21G и прамлинтид анализируют обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Результаты измерений представлены в таблице 7.

Таблица 7

Изменение концентраций инсулина (а) в Ед./мл и прамлинтида (b) в мг/мл

| Композиция | Концентрация в начальной точке времени | | Концентрация через 4 недели | |
|------------|--|------|-----------------------------|------|
| | (a) | (b) | (a) | (b) |
| A21-1 | 105 | 1,05 | 103 | 1,02 |
| A21-2 | 105 | 1,02 | 106 | 1,03 |
| A21-3 | 101 | 1,12 | 105 | 1,03 |
| RHI-1 | 101 | 1,6 | 76 | 1,03 |

| | | | | |
|-------|-----|------|----|------|
| RHI-2 | 99 | 1,02 | 62 | 1,03 |
| LIS-1 | 105 | 1,07 | 89 | 1,03 |
| LIS-2 | 106 | 1,05 | 82 | 1,04 |
| ASP-2 | 104 | 1,05 | 55 | 1,02 |

Композиции, содержащие человеческий инсулин A21G и прамлинтид, демонстрируют хорошую химическую стабильность через 4 недели при 30°C. Композиции прамлинтида с коммерческими инсулинами претерпевают быстрое разрушение при pH 4,0, и даже еще более быстрое разрушение при pH 3,5.

Пример 9. Фармакокинетические и фармакодинамические исследования на собаках

Фармакокинетическое и фармакодинамическое исследование на собаках композиции, состоящей из человеческого инсулина A21G (100 Ед./мл, т.е. 3,5 мг/мл) и прамлинтида (0,6 мг/мл). Испытываемая композиция имеет pH 4,0 и содержит 25 мМ м-крезола и 184 мМ глицерина (Композиция A21-8).

Четырем животным, которые голодали приблизительно 18 часов, вводят инъекции путем подкожного введения в шею при дозе 0,2 Ед./кг инсулина и 0,12 мкг/кг прамлинтида. За час до введения инъекции берут один или более образцов крови для определения базального уровня глюкозы, инсулина и прамлинтида. Образцы крови затем берут в течение 5 часов после введения композиции. Гликемию определяют при помощи глюкометра. Уровни инсулина и прамлинтида в плазме определяют методом ELISA.

Фармакокинетические параметры композиции A21-8 определяют на основании концентраций в плазме инсулина и прамлинтида с поправкой на базовый уровень. Стандартный некомпартментный анализ осуществляют с использованием программы Phoenix WinNonlin (версия 7, Certara). Значения параметров (среднее значение \pm стандартное отклонение) представлены в таблицах 8 и 9 ниже:

Таблица 8

PK параметры суммарного инсулинового аналога

| Композиция | Tmax инсулина (мин) | Сmax инсулина (пмоль/л) | AUC0-последнее инсулина (мин*пмоль/л) |
|------------|------------------------|----------------------------|---|
| A21-8 | 38 \pm 26 | 218 \pm 141 | 16165 \pm 4160 |

Таблица 9

PK параметры прамлинтида

| Композиция | Tmax прамлинтида (мин) | Сmax прамлинтида (пмоль/л) | AUC0-последнее прамлинтид (мин*пмоль/л) |
|------------|------------------------------|-------------------------------|---|
|------------|------------------------------|-------------------------------|---|

| | | | |
|-------|--------|----------|-------------|
| A21-8 | 20 ± 8 | 104 ± 39 | 5121 ± 2961 |
|-------|--------|----------|-------------|

Средние фармакокинетические (PK) профили суммарного инсулина (квадраты) и прамлингида (треугольники) в плазме представлены на Фиг. 2.

Средние гликемические профили, выраженные в виде процентов от базового уровня, представлены на Фиг. 3.

Отмечается, что прамлинтид и человеческий инсулин A21G оба имеют кинетику прандиальной абсорбции, способствующую ранней гипогликемической активности, с последующим возвращением к уровню, близкому к базовому уровню гликемии, через 5 часов после введения. Эти фармакокинетические и фармакодинамические результаты ясно показывают, что Композиция A21-8 совместима с использованием во время еды.

Пример 10: Фармакокинетические исследования прамлингида на свиньях

Фармакокинетическое исследование на свиньях композиции, состоящей из человеческого инсулина A21G (3,5 мг/мл эквивалентно 100 Ед./мл инсулина) и прамлингида (0,6 мг/мл).

Домашние свиньи с массой тела приблизительно 50 кг, которым заранее вводили катетер в яремную вену, голодали в течение 2,5 часов перед началом эксперимента. В течение часа перед инъекцией инсулина брали 3 образца крови для определения базового уровня глюкозы и инсулина.

Инъекции композиций человеческого инсулина A21G в комбинации с прамлинтидом (A21-9) или прамлингида (PRAM) при дозе 0,2 Ед. инсулина/кг и 1,2 мкг прамлингида/кг осуществляют подкожно в бок животного при помощи шприц-ручки для введения инсулина (Novo, Sanofi или Eli Lilly), снабженной иглой размера 31G.

Для определения концентраций прамлингида в плазме образцы крови берут в следующих временных точках: 4, 8, 12, 16, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 150 и 180 минут. После каждой процедуры взятия образца катетер промывают разбавленным раствором гепарина.

Результаты фармакокинетических исследований раствора человеческого инсулина A21G и прамлингида A21-9 и раствора прамлингида PRAM у свиней

Результаты 3 исследований, осуществленных на той же когорте свиней, объединяют для сравнения фармакокинетики прамлингида между композицией A21-9 и композицией PRAM. Фармакокинетические параметры композиций A21-9 и PRAM определяют на основании концентраций в плазме прамлингида с поправкой на базовый уровень. Стандартный некомпартментный анализ осуществляют с использованием программы Phoenix WinNonlin (версия 7, Certara). Значения параметров (среднее значение ± стандартное отклонение) представлены в следующей таблице.

Таблица 10

PK параметры прамлингида из композиций A21-9 и PRAM

| Композиция | Пептиды (мг/мл) | N | t _{max} прамлинтид | AUC _{0-30мин} прамлинтид | AUC _{0-t} прамлинтид |
|------------|--------------------|---|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
|------------|--------------------|---|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|

| | | | (мин) | (мин*пмоль/л) | (мин*пмоль/л) |
|---|--|----|-------------|---------------|---------------|
| A21-9 | человеческий инсулин A21G (3,5) прамлинтид (0,6) | 34 | 42,1 ± 22,4 | 2461 ± 1467 | 13642 ± 5934 |
| PRAM | Прамлинтид (0,6) | 34 | 23,2 ± 15,0 | 4357 ± 3127 | 14806 ± 7872 |
| Значение р (значимое, если $p < 0,05$) | Сравнение A21-9 с PRAM | 34 | 0,0004 | 0,0007 | 0,8018 |

где t_{max} = время, необходимое для получения максимальной концентрации в плазме; $AUC_{0-30min}$ = площадь под кривой концентрации в плазме против времени между 0 и 30 мин после инъекции; AUC_{0-t} = площадь под кривой концентраций в плазме против времени между 0 и последней определяемой концентрацией после инъекции

Результаты фармакокинетических анализов прамлинтида, полученные с композициями A21-9 и PRAM, представлены на Фиг. 4. Анализ этих профилей и параметров показывает, что комбинация человеческого инсулина A21G и прамлинтида (композиция A21-9, кривая с квадратами) приводит к существенному замедлению абсорбции прамлинтида по сравнению с прамлинтидом, используемым отдельно (композиция PRAM, кривая с треугольниками). Композиция A21-9 приводит к пику в плазме (t_{max}), который существенно отсрочен (приблизительно 18 мин, $p < 0,05$), и ранней экспозиции в плазме прамлинтида ($AUC_{0-30min}$), которая существенно ниже (приблизительно 43%, $p < 0,05$) по сравнению с композицией PRAM. С другой стороны, общая экспозиция в плазме прамлинтида (AUC_{0-t}) оказалась одинаковой для этих двух композиций, что говорит о сопоставимой биодоступности.

Пример 11. Исследование потребления пищи у крыс после инъекции контрольных композиций и после инъекции композиций, включающих человеческий инсулин A21G и/или прамлинтид

Это исследование осуществляли на популяции из 40 по меньшей мере 6-недельных самцов крыс Sprague Dawley.

Крысы имели свободный доступ к пище и воде, за исключением 6-часового периода голодания перед подкожной инъекцией композиций, описанных в таблице ниже.

Таблица 11

Композиции, вводимые крысам, и количество обработанных крыс

| Композиция | Контроль | Хумулин [®] | PRAM | A21-9 |
|--------------|----------|----------------------|------|-------|
| [Прамлинтид] | - | - | 1 | 0,6 |

| | | | | |
|------------------------------------|----|---------------------|----|-----------------------------|
| (мг/мл) | | | | |
| Доза прамлингида (мкг/кг) | - | - | 60 | 60 |
| Тип инсулина [Инсулин] (Ед./мл) | - | Человеческий 100 | - | Человеческий A21G 100 |
| Доза инсулина (Ед./кг) | - | 10 | - | 10 |
| Количество крыс | 10 | 10 | 10 | 10 |

Контрольная композиция представляет собой солевой раствор, т.е. водный раствор, содержащий 150 мМ NaCl.

Композиция Хумулина[®] R представляет собой коммерческий раствор человеческого инсулина, поставляемый на рынок компанией ELI LILLY. Этот продукт представляет собой человеческий инсулин при 100 Ед./мл. Эксципиенты Хумулина[®] R представляют собой глицерин, мета-крезол, гидроксид натрия и хлористоводородную кислоту для доведения рН (рН 7,0-7,8) и воду.

При t_0 , сразу после инъекции, распределяют пищу (приблизительно по 100 г на крысу). Потребление пищи (кумулятивное среднее значение) измеряют через один, два и три часа после t_0 , или $t+1$ ч, $t+2$ ч и $t+3$ ч.

Результаты представлены в следующей таблице:

Таблица 12

Потребление пищи через 1, 2 и 3 часа после инъекции

| Композиции | Контроль | Хумулин | PRAM | A21-9 |
|----------------------------------|----------|---------|------|-------|
| Потребление пищи при $t+1$ ч (г) | 3,8 | 4,7 | 1,5 | 3,2 |
| Потребление пищи при $t+2$ ч (г) | 4,4 | 5,3 | 3,3 | 4,4 |
| Потребление пищи при $t+3$ ч (г) | 5,9 | 6,9 | 4,2 | 5,3 |

Эти результаты показывают, что композиция A21-9, объединяющая инсулин A21G и прамлинтид, обеспечивает возможность не только уменьшения потребления пищи, индуцируемого инъекцией инсулина, но также ограничения потребления пищи до уровня меньше чем или равного уровню в контрольной группе, которой вводили инъекцию Контрольной композиции (солевой раствор).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция в форме инъекционного водного раствора, рН которого находится в диапазоне от 3,5 до 4,4, включающая по меньшей мере человеческий инсулин А21G, называемый регулярным, и по меньшей мере один супрессор глюкагона с прандиальным действием.

2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что супрессор глюкагона с прандиальным действием выбран из группы, состоящей из аналога амилина или агониста амилинового рецептора, или аналога GLP-1 или агониста рецептора GLP-1 (GLP-1 RA).

3. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что супрессор глюкагона с прандиальным действием представляет собой аналог амилина или агонист амилинового рецептора.

4. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что пептид, являющийся супрессором глюкагона с прандиальным действием, представляет собой прамлинтид.

5. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что пептид, являющийся супрессором глюкагона с прандиальным действием, представляет собой эксенатид.

6. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что пептид, являющийся супрессором глюкагона с прандиальным действием, представляет собой ликсисенатид.

7. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что концентрация человеческого инсулина А21G составляет от 2 до 20 мг/мл.

8. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что концентрация человеческого инсулина А21G составляет 3,5 мг/мл.

9. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что концентрация пептида, являющегося супрессором глюкагона с прандиальным действием, составляет от 0,01 до 10 мг/мл.

10. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что рН раствора составляет от 3,8 до 4,2.

11. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что рН раствора составляет 4,0.

12. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что она, кроме того, включает соль цинка.

13. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что она, кроме того, включает м-крезол.

14. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что она, кроме того, включает полисорбат в качестве эксципиента (Tween[®] 20)

15. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что она, кроме того, включает полоксамер 188 в качестве эксципиента.

16. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что

она, кроме того, включает метионин.

17. Композиция по любому из предшествующих пунктов, предназначенная для применения в способе лечения диабета, отличающаяся тем, что ее вводят в виде болюса перед едой.

18. Композиция по любому из пп. 1-17, предназначенная для применения в способе лечения диабета, отличающаяся тем, что ее вводят для улучшения контроля постпрандиальной гликемии.

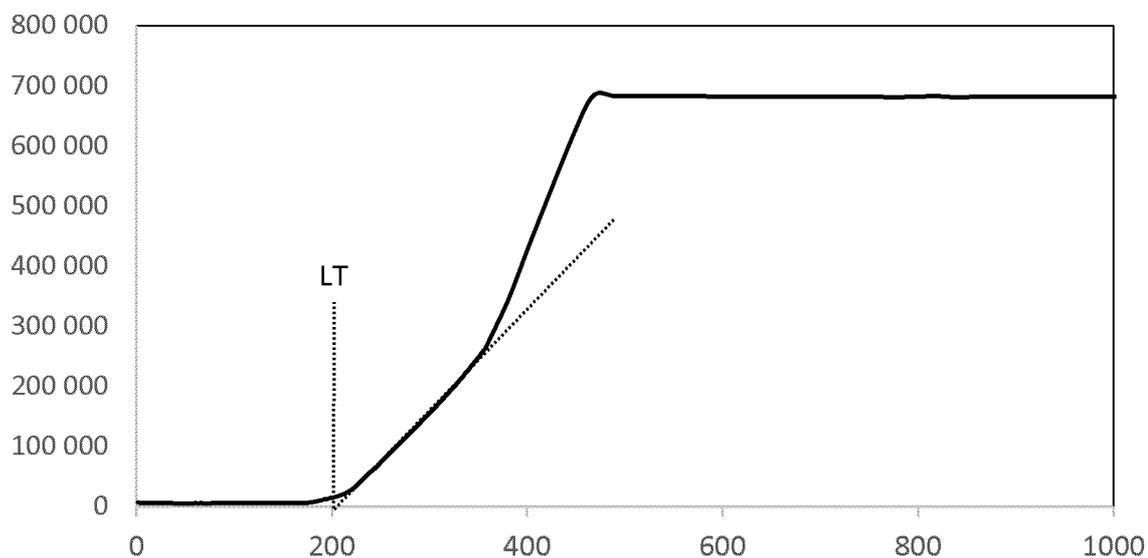
19. Композиция по любому из пп. 1-17, предназначенная для применения в способе лечения диабета, отличающаяся тем, что ее вводят для улучшения контроля постпрандиальной гликемии и для уменьшения побочных эффектов прамлингида.

20. Композиция по любому из пп. 1-17, предназначенная для применения в способе лечения диабета, отличающаяся тем, что она обеспечивает возможность уменьшения потребления пищи, индуцируемого инсулином.

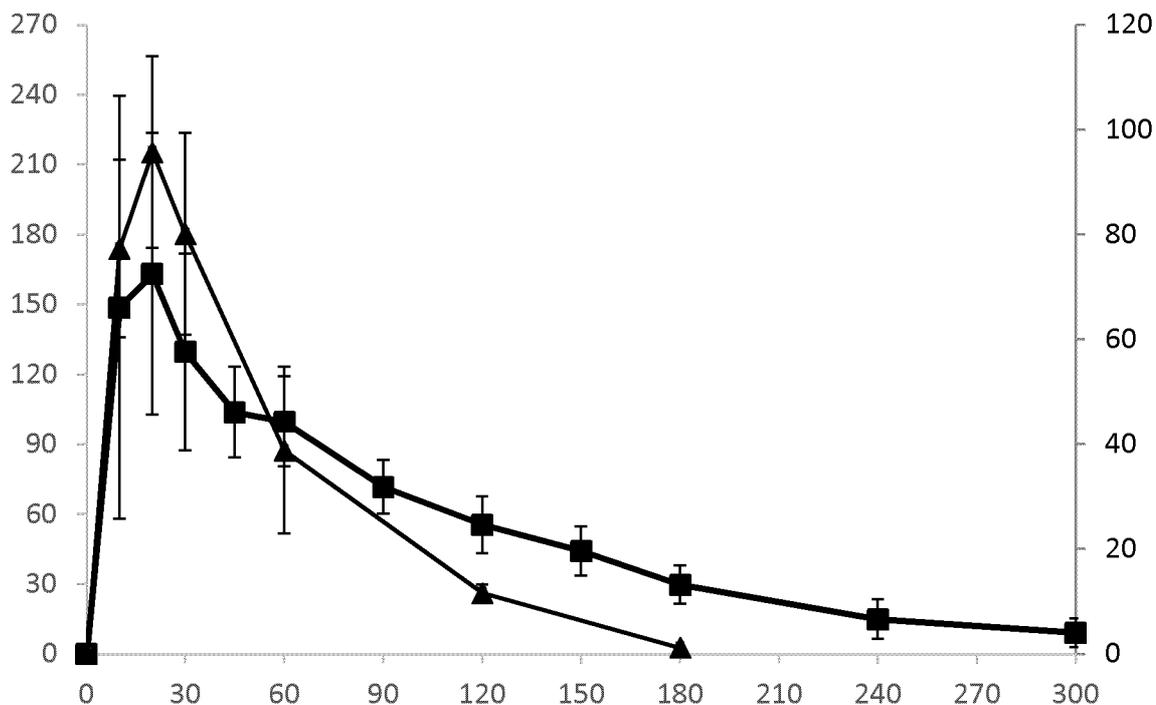
21. Способ получения человеческого инсулина A21G, включающий по меньшей мере одну стадию, включающую взаимодействие человеческого инсулина A21G, B31R, B32R (инсулин гларгин) с крысиной карбоксипептидазой В при отношении инсулин/карбоксипептидаза от 500 до 2000, при рН от 7,5 до 8,5 и при температуре от 20 до 30°C в течение 10-20 часов.

1/2

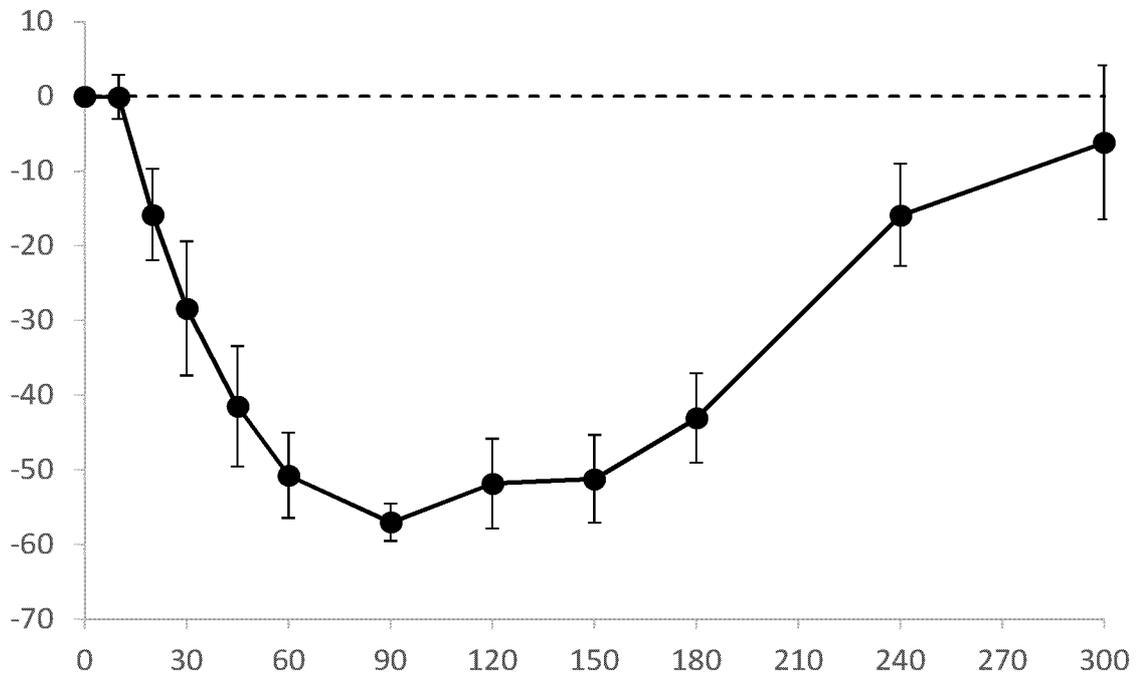
ФИГ.1



ФИГ.2



ФИГ.3



ФИГ.4

