

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201890343** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2018.07.31

(22) Дата подачи заявки
2016.08.19

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 31/557 (2006.01)

(54) **БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩИЕ ИНСУЛИНОВЫЕ КОМПОЗИЦИИ**

(31) **62/210,469**

(32) **2015.08.27**

(33) **US**

(86) **PCT/US2016/047723**

(87) **WO 2017/034956 2017.03.02**

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

(72) Изобретатель:
**Акерс Майкл Патрик, Кристе
Майкл Эдвард, Харди Томас Эндрю,
Маджумдар Ранаджой, Нгуен Чи А.,
Паавола Чад Д., Сарин Вирендер
Кумар, Шульте Наннетт Элизабет
(US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Строкова
О.В., Гизатуллина Е.М., Христофоров
А.А., Глухарёва А.О., Карпенко О.Ю.
(RU)**

(57) Изобретение представляет собой фармацевтическую композицию человеческого инсулина или аналога инсулина, которая содержит цитрат, трепростинил и стабилизирующие агенты, которая имеет более быстрое фармакокинетическое и/или фармакодинамическое действие по сравнению с коммерческими препаратами существующих аналогов инсулина и которая является стабильной для коммерческого использования.

A1

201890343

201890343

A1

БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩИЕ ИНСУЛИНОВЫЕ КОМПОЗИЦИИ

Данное изобретение представляет собой фармацевтическую композицию для применения при лечении диабета для противодействия послепрандиальным изменениям уровня глюкозы в крови и для неотложного лечения гипергликемии. Композиция, которая содержит человеческий инсулин или 5 аналог инсулина, цитрат, трепростинил и стабилизирующие агенты, характеризуется более быстрым захватом инсулина из мест инъекции по сравнению с существующими коммерческими композициями инсулина и является стабильной для коммерческого использования. Композиция полезна 10 для обеспечения активности инсулина во время приема пищи, для использования в непрерывной подкожной инфузии инсулина (CSII) или в качестве неотложного лечения гипергликемии, когда необходим инсулин.

Профиль времени действия инсулина важен для контроля уровня глюкозы в крови после приема пищи. У здоровых людей поджелудочная железа 15 выделяет пиковые количества инсулина в ответ на поглощенную пищу, что приводит к увеличению уровней инсулина в плазме в течение нескольких минут. У лиц с диабетом 1 типа и у некоторых людей с диабетом типа 2 необходимо вводить инсулин; однако вводимый инсулин медленно поступает в 20 кровь из подкожного пространства. Отсроченное высвобождение инсулина и начало его действия, которое запаздывает в начале приема пищи, приводит к гипергликемии во время или сразу после приема пищи. Длительная продолжительность действия инсулина из подкожного пространства приводит к повышенным концентрациям инсулина между приемами пищи, которые могут вызывать постпрандиальную гипогликемию.

25 Ранее предпринимались попытки ускорить действие продуктов инсулина. Ранние усилия по разработке таких продуктов включали разработку новых быстродействующих аналогов инсулина, таких как инсулин лизпро (HUMALOG®), инсулин аспарт (NOVOLOG®) и инсулин глулизин (APIDRA®). инсулин лизпро и инсулин аспарт достигают быстрого действия за 30 счет изменения аминокислотных последовательностей человеческого инсулина, которые ослабляют димер-димерную связку и изменяют стабильность гексамеров в подкожных условиях. Инсулин глулизин также содержит

изменения последовательностей аминокислотных цепей человеческого инсулина; однако в его коммерческой рецептуре отсутствует цинк и не образуется стабилизирующих гексамеров. Другой аналог инсулина, заявленный как быстродействующий, но который все еще находится в разработке, Fluorolog, 5 содержит в себе один атом фтора, присоединенный к остатку Phe в положении 24 В-цепи инсулина.

Быстродействующие аналоги инсулина, инсулин лизпро, aspart и glulisine стали доступны в 1990-х и начале 2000-х годов. Однако даже с так называемыми быстрыми аналогами инсулина максимальный уровень инсулина 10 в плазме не достигается в течение первых 50-90 минут после подкожной инъекции. Это медленнее, чем эндогенное выделение инсулина из нормально функционирующей поджелудочной железы и не всегда соответствует профилям абсорбции глюкозы.

Другим способом достижения быстрого действия, который был 15 исследован, является использование ингредиентов или эксципиентов, которые улучшают профиль времени действия инсулина, когда они находятся в сочетании с инсулином. Например, в U.S. 8,324,157 указано, что более быстрое начало действия по сравнению с существующей терапией инсулином может быть достигнуто добавлением никотинового соединения, такого как 20 никотинамид, и аминокислоты аргинина и, возможно, глутаминовой кислоты. В US2013/0231281 описаны композиции, содержащие инсулин и олигосахариды, либо отдельно, либо в сочетании с полианионным соединением, и заявляется, что такие композиции являются быстродействующими. В US2014/0113856 описаны композиции, содержащие инсулин в комбинации с хелатором цинка, 25 таким как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), другим эксципиентом, описанным в публикации в качестве агента «растворения/стабилизации», таким как лимонная кислота или цитрат натрия, и магнийсодержащим соединением, и заявлено, что такие композиции имеют более высокую скорость абсорбции и более быстрое снижение активности после пиковых концентраций. В 30 US2015/0065423 описаны композиции, содержащие пептид и сосудорасширяющий агент, раскрываются списки сосудорасширяющих агентов из трех разных категорий и приводятся данные о композициях, содержащих

инсулин лизпро и нитроглицерин, и утверждается, что такие препараты являются быстродействующими.

Несмотря на эти и другие усилия, остается потребность в композициях инсулина, которые имеют более быстрое поглощение инсулина в кровь из места инъекции, более быстрое начало и/или завершение действия по сравнению с существующими композициями инсулина, а также имеют химическую и физическую стабильность при условиях хранения и использования. Данное изобретение направлено на создание композиций, которые отвечают одному или нескольким из этих требований.

Неожиданно было обнаружено, что композиции, содержащие определенные концентрации как цитрата, так и трепростинила, имеют более стремительный профиль времени действия по сравнению с существующими коммерчески доступными композициями инсулина, и что можно поддерживать химическую и физическую стабильность композиций, содержащих эти концентрации как цитрата, так и трепростинила, без потери улучшения скорости действия путем включения в композиции цинка и одного или нескольких дополнительных стабилизирующих агентов, таких как поверхностно-активное вещество, хлорид магния или хлорид натрия.

Соответственно, данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим: инсулин; цитрат, в концентрации от около 5 до около 25 мМ; трепростинил, в концентрации от около 0,04 до около 20 мкг/мл; цинк, в концентрации, достаточной для обеспечения по меньшей мере 2 ионов цинка на шесть молекул инсулина; консервант; и один или несколько дополнительных стабилизирующих агентов; и имеет рН от около 7,0 до около 7,8 при комнатной температуре.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит инсулин лизпро в концентрации от около 100 до около 200 ед/мл; цитрат, в концентрации от около 15 до около 25 мМ; трепростинил, в концентрации от около 0,5 до около 2 мкг/мл; цинк, в концентрации от около 0,2 до около 1 мМ; м-крезол, в концентрации от около 2,5 до около 3,8 мг/мл; полоксамер 188, в концентрации от около 0,03 до около 0,12 мас./об.; хлорид магния, в концентрации, приводящей к молярному соотношению хлорида

магния к цитрату около 1:3; глицерин, в концентрации от около 1 до около 2 мг/мл; и имеет рН от около 7,0 до около 7,8 при комнатной температуре.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 100 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,6 мМ; полоксамер 188, в концентрации около 0,09% мас./об. хлорид магния, в концентрации около 5 мМ; м-крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл; глицерин в концентрации около 1,61 мг/мл; и имеет рН около 7,4.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,8 мМ; полоксамер 188, в концентрации от около 0,06 до около 0,12% мас./об.; хлорид магния, в концентрации около 5 мМ; м-крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл; глицерин в концентрации около 1,61 мг/мл; и имеет рН около 7,4.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит инсулин лизпро в концентрации от около 100 до около 200 ед/мл; цитрат, в концентрации от около 15 до около 25 мМ; трепростинил, в концентрации от около 0,5 до около 2 мкг/мл; и цинк, в концентрации от около 0,2 до около 2 мМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит инсулин лизпро в концентрации от около 100 до около 200 ед/мл; цитрат, в концентрации от около 15 до около 25 мМ; трепростинил, в концентрации от около 0,5 до около 2 мкг/мл; цинк, в концентрации от около 0,2 до около 2 мМ; и магний, в концентрации, приводящей к молярному отношению магния к цитрату от около 1:1 до около 1:5.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 100 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,6 мМ; и магний, в концентрации около 5 мМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 100 ед/мл; цитрат

в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,6 мМ; и магний, в концентрации около 5 мМ; и м-крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл.

5 В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 100 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,6 мМ; магний, в концентрации около 5 мМ; м-крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл; и глицерин, в концентрации около 12 мг/мл.

10 В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 100 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,6 мМ; магний, в концентрации около 5 мМ; м-крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл; и общую концентрацию хлорида от
15 около 10 до около 50 мМ; и имеет рН около 7,4.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 100 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,6 мМ; магний, в концентрации около 5 мМ; м-
20 крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл; глицерин, в концентрации около 12 мг/мл; и общую концентрацию хлорида от около 10 до около 50 мМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 100 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,6 мМ; магний, в концентрации около 5 мМ; м-
25 крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл; глицерин, в концентрации около 12 мг/мл; и общую концентрацию хлорида от около 10 до около 50 мМ; и имеет рН около 7,4.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит инсулин лизпро в концентрации около 100 ед/мл; цитрат в концентрации 15 мМ; трепростинил, в концентрации 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,3 мМ; фосфат в концентрации около 7 мМ; глицерин, в концентрации около 16 мг/мл при рН 7,4.

30

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; и цинк в концентрации от около 0,7 до около 1,7 мМ.

5 В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,8 мМ; и магний в концентрации от около 5 до около 10 мМ.

10 В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,8 мМ; и магний в концентрации около 5 мМ.

15 В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,8 мМ; магний в концентрации от около 5 до около 10 мМ; и общую концентрацию хлорида от около 10 до около 50 мМ.

20 В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,8 мМ; магний в концентрации от около 5 до около 10 мМ; и глицерин в концентрации около 12 мг/мл.

25 В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,8 мМ; магний в концентрации от около 5 до около 10 мМ; глицерин в концентрации около 12 мг/мл; и общую концентрацию хлорида от около 10 до около 50 мМ.

30 В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл;

цинк, в концентрации от около 0,7 до около 1,7 мМ; и м-крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат
5 в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,8 мМ; магний в концентрации от около 5 до около 10 мМ; и м-крезол в концентрации около 3,15 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат
10 в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,8 мМ; магний в концентрации от около 5 до около 10 мМ; общую концентрацию хлоридов от около 10 до около 50 мМ; и м-крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат
15 в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,8 мМ; магний в концентрации от около 5 до около 10 мМ; глицерин в концентрации около 12 мг/мл; и м-крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат
20 в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,8 мМ; магний в концентрации от около 5 до около 10 мМ; глицерин в концентрации около 12 мг/мл; и общую концентрацию
25 хлоридов от около 10 до около 50 мМ; и м-крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит: инсулин лизпро, в концентрации около 200 ед/мл; цитрат
30 в концентрации около 15 мМ; трепростинил, в концентрации около 1 мкг/мл; цинк в концентрации около 0,8 мМ; магний в концентрации около 5 мМ; глицерин в концентрации около 12 мг/мл; и общую концентрацию хлоридов от около 10 до около 50 мМ; и м-крезол, в концентрации около 3,15 мг/мл.

Кроме того, данное изобретение также относится к способу лечения диабета, включающему введение человеку, нуждающемуся в этом, эффективной дозы фармацевтической композиции по данному изобретению.

5 Кроме того, данное изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в терапии. Более конкретно, данное изобретение относится к фармацевтической композиции для применения при лечении диабета. Данное изобретение также относится к применению фармацевтической композиции при изготовлении лекарственного средства для лечения диабета.

10 Кроме того, данное изобретение относится к изделию, содержащему фармацевтическую композицию. Более конкретно, в некоторых аспектах изделие представляет собой емкость многоразового использования, картридж, ручку-инжектор многоразового использования, расходные материалы для инжекторов, помпу для непрерывной подкожной инсулиновой инфузионной терапии или емкость для использования в помпе для непрерывной подкожной
15 инсулиновой инфузионной терапии.

Используемый в данном документе термин «композиция» относится к комбинации инсулина и других ингредиентов или эксципиентов, в которых инсулин и другие ингредиенты или эксципиенты находятся в одном комбинированном препарате, обычно, препарате на водной основе.

20 Используемый в данном документе термин «инсулин» означает человеческий инсулин или быстродействующий структурный вариант, мутеин или аналог человеческого инсулина, который имеет функциональную активность с более быстрым началом действия, чем человеческий инсулин. Конкретными вариантами быстродействующих аналогов человеческого
25 инсулина являются инсулин лизпро, инсулин аспарт и инсулин глулизин. Инсулин для коммерческих продуктов может быть получен с использованием рекомбинантных ДНК-методов или путем химического синтеза. Рекомбинантные методы хорошо известны и являются наиболее предпочтительными. Молекула человеческого инсулина (CAS № 11061-68-0)
30 состоит из двух аминокислотных цепей А и В, последовательности которых хорошо известны.

А-цепь человеческого инсулина имеет следующую последовательность аминокислот:

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

В-цепь человеческого инсулина имеет следующую последовательность аминокислот:

5 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 № 2).

Цепи соединены двумя дисульфидными связями: CysA7-CysB7 и CysA20-CysB19. А-цепь имеет внутрицепочечную дисульфидную связь в положении CysA6-CysA11. Инсулин человека имеет эмпирическую формулу
10 C₂₅₇H₃₈₃N₆₅O₇₇S₆ и молекулярную массу 5808.

Инсулин лизпро, лекарственное вещество в HUMALOG®, идентичен человеческому инсулину с точки зрения его первичной аминокислотной последовательности, за исключением инверсии естественной пролин-лизиновой последовательности в В-цепи в положениях 28 и 29 (28В-L-лизин -29В-L-пролин человеческого инсулина). Было показано, что инсулин лизпро (CAS №
15 133107-64-9) является эквипотентом человеческого инсулина на молярной основе, но его эффект после подкожной инъекции является более быстрым и более коротким, чем у инъеклируемого растворимого человеческого инсулина. HUMALOG® содержит м-крезол в качестве консерванта и стабилизирующего
20 агента, модификатор тоничности (глицерин), буферный агент (двухосновный фосфат натрия), стабилизатор (оксид цинка) и регулятор рН носителя.

Молекула инсулина лизпро состоит из А-цепи человеческого инсулина (SEQ ID № 1), сшитой с В-цепью lispro инсулина, аминокислотная последовательность которой представлена в SEQ ID № 3:

25 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 № 3).

Химическая формула инсулина лизпро представляет собой C₂₅₇H₃₈₃N₆₅O₇₇S₆, а его молекулярная масса составляет около 5808. Одна единица инсулина лизпро эквивалентна 0,0347 мг инсулина лизпро.

30 Инсулин аспарт (CAS № 116094-23-6), лекарственное вещество в NOVLOG®, является еще одним быстродействующим аналогом инсулина. Его структура состоит из А-цепи человеческого инсулина (SEQ ID № 1) и В-цепи, в которой аминокислота Pro в положении B28 заменена на Asp (Pro-B28-Asp

человеческий инсулин), что отражено в следующей аминокислоте последовательность:

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 № 4).

- 5 Инсулин аспарт (28В аспарагиновая кислота - человеческий инсулин) имеет эмпирическую формулу C₂₅₆H₃₈₁N₆₅O₇₉S₆ и молекулярную массу около 5826. Одна единица инсулина аспарт соответствует 6 нмоль, что соответствует 0,035 мг безводного бессолевого инсулина аспарт.

10 Инсулин глулизин (CAS № 207748-29-6), лекарственное вещество в APIDRA®, является еще одним аналогом инсулина с быстрым началом действия. Молекула инсулина glulisine состоит из А-цепи человеческого инсулина (SEQ ID № 1) и модифицированной, по сравнению с человеческим инсулином, В-цепи (Asn-B3-Lys, Lys-B29-Glu), что отражено в следующей аминокислотной последовательности:

15 Phe Val Lys Gln Erg Leu Cys Gly Ser Erg Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr (SEQ ID № 5).

20 Инсулин глулизин (3В-лизин-29В-глутаминовая кислота - человеческий инсулин) имеет эмпирическую формулу C₂₅₈H₃₈₄N₆₄O₇₈S₆ и молекулярную массу 5823. Одна единица инсулина glulisine соответствует приблизительно 0,0349 мг инсулина glulisine.

25 Следующая схема изображает аминокислотные последовательности и дисульфидные связи человеческого инсулина и быстродействующих аналогов инсулина, которые в настоящее время одобрены для использования при коррекции уровня глюкозы в крови во время приема пищи:

Цепь А человеческого инсулина

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn

Tyr Cys Asn

Цепь В человеческого инсулина с заменами, показанными для определенных аналогов инсулина

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
Lys (glulisine)

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Glu (glulisine)
Asp (aspart)
Lys Pro (lispro)

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции по данному изобретению имеют концентрации инсулина от около 40 до около 500 ед/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции по данному изобретению имеют концентрации инсулина от около 100 до около 500 ед/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции по данному изобретению имеют концентрации инсулина от около 100 до около 300 ед/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции по данному изобретению имеют концентрации инсулина от около 100 до около 200 ед/мл. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения композиции содержат приблизительно 100 ед/мл или приблизительно 200 ед/мл.

В одном варианте реализации изобретения инсулин выбран из группы, состоящей из человеческого инсулина или быстродействующего варианта его структуры, мутеина или аналога человеческого инсулина, такого как инсулин лизпро, Инсулин аспарт или Инсулин глулизин. В предпочтительном варианте реализации изобретения инсулин представляет собой инсулин лизпро.

Улучшения в профиле времени действия инсулина, продемонстрированного в данном изобретении, достигаются за счет использования определенных концентраций цитрата и трепростинила.

Термин «цитрат» относится к любому соединению, содержащему ион цитрата, который имеет химическое название 2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат, молекулярную формулу $C_6H_5O_7^{-3}$ и молекулярную массу 189. Цитратный ион широко распространен у растений и животных и является естественным компонентом питания. Это общий метаболит в окислительном метаболизме и важный компонент костей. Ряд цитратов относится Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США для использования в пищевых продуктах к веществам группы GRAS (generally regarded as safe, обычно считается безопасным), в том числе:

Вещество GRAS	Формула (Mr, а.е.м.)	CAS №	21 CFR
Лимонная кислота	$C_6H_8O_7$ (192.12)	77-92-9	184.1033
Цитрат натрия	$C_6H_5Na_3O_7$ (258.07)	68-04-2	184.1751
Моногидрат цитрата калия	$C_6H_5O_7K_3$ (324.41)	6100-05-6	184,1625

Различные цитратсодержащие соединения также включены в парентеральные лекарственные продукты в соответствии с базой данных о неактивных ингредиентах Управления по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) США, включая, например, лимонную кислоту, моногидрат лимонной кислоты, безводную лимонную кислоту, цитрат натрия, безводный тринатрийцитрат, дигидрат тринатрийцитрата. Конкретное соединение цитрата, используемое в композициях по данному изобретению, может представлять собой кислотную форму или различные соли, особенно соли щелочных металлов (например, натрия и калия) и/или моно- или дигидраты. Из них предпочтительным является цитрат натрия.

Было обнаружено, что концентрация цитрата, которая может быть использована в композициях, которые являются быстродействующими и стабильными, составляет от около 5 до около 25 мМ. Некоторые композиции содержат концентрации цитрата около 15, около 20 или около 25 мМ. Было обнаружено, что более высокие концентрации цитрата могут привести к большему улучшению времени действия, но также могут привести к большему

ухудшению с точки зрения стабильности. Таким образом, композиции с концентрациями цитрата в верхнем пределе диапазона требуют дополнительных стабилизирующих агентов, чтобы иметь химическую и физическую стабильность для длительного хранения и использования, как описано более подробно ниже.

Трепростинил представляет собой синтетический аналог простаглицина и имеет химическое название (1R, 2R, 3aS, 9aS)-[[[2,3,3a, 4,9,9a-гексагидро-2-гидрокси-1-[(3S)-3-гидроксиоктил]-1H-бенз[f]инден-5-ил]окси]уксусная кислота (CAS № 81846-19-7), молекулярную массу 390,52 и молекулярную формулу $C_{23}H_{34}O$. Трепростинил является активным ингредиентом в коммерческих лекарственных продуктах, продаваемых под торговыми названиями Remodulin®, Tyvaso® и Orenitran™, которые показаны при лечении артериальной гипертензии легких, чтобы уменьшить симптомы, связанные с физической нагрузкой (Remodulin®), и улучшить способность к физической нагрузке (Tyvaso® и Orenitran™). Tyvaso® и Orenitran™ являются, соответственно, ингаляционными и пероральными лекарственными формами, а Remodulin® используется для подкожного или внутривенного применения в виде непрерывной инфузии. В настоящее время Remodulin® доступен в дозах 1, 2,5, 5 и 10 мг/мл, и каждый мл содержит 3 мг м-крезола, 6,3 мг цитрата натрия или 5,3 мг (1, 2,5 и 5 мг/мл) или 4,0 мг (10 мг/мл), хлорида натрия и воду для инъекций.

Как и цитрат, трепростинил включен, чтобы способствовать улучшению профиля времени действия инсулина. Однако, в отличие от цитрата, увеличение концентрации трепростинила не оказывает отрицательного влияния на стабильность. Однако из-за мощного вазодилатационного эффекта трепростинила концентрация трепростинила в композициях по данному изобретению не должна быть настолько высокой, чтобы вызвать нежелательные системные эффекты.

Кроме того, количество инсулина и, таким образом, объем композиции, вводимой данному субъекту в данный момент времени определяется на основании уровней глюкозы в крови субъекта и/или предполагаемого потребления углеводов. В результате общее количество введенного трепростинила будет варьироваться от инъекции к инъекции. Например, в

некоторых случаях диабетик может хотеть ввести всего лишь одну единицу инсулина, что будет составлять общий объем инъекции всего 10 мкл при 100 ед/мл композиции инсулина лизпро. С другой стороны, имеющиеся в настоящее время инъекционные устройства обеспечивают дозы до 80 ед. в одной инъекции

5 - общий объем такой дозы при композиции 100 ед/мл будет на порядок выше, чем у 1 единицы дозы и некоторым пациентам с диабетом второго типа может требоваться доза более 100 единиц инсулина, обычно требующая более одной инъекции.

Таким образом, в композициях, где инсулин и трепростинил

10 присутствуют в одном комбинированном препарате, концентрация трепростинила должна быть достаточной, чтобы способствовать улучшению времени воздействия, даже когда требуется относительно небольшая доза инсулина, но не должна быть настолько высокой, чтобы вызывают

15 нежелательные системные эффекты, когда требуется относительно высокая доза инсулина. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит трепростинил в концентрации от около 0,1 до около 50 мкМ или от около 0,04 до около 20 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит трепростинил в концентрации от около 0,04 до около 10

20 мкг/мл. Предпочтительная концентрация трепростинила в композициях инсулина, имеющих концентрации инсулина в пределах от около 100 до около 200 ед/мл, составляет от около 0,5 до около 2 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация трепростинила составляет около 1 мкг/мл.

Как описано выше, в то время как добавление цитрата приводит к

25 улучшению времени действия, оно также может способствовать большему ухудшению с точки зрения стабильности. Таким образом, композиции по данному изобретению требуют одного или нескольких дополнительных стабилизирующих агентов, кроме тех, которые включены в доступные в настоящее время коммерческие препараты быстродействующих аналогов

30 инсулина, такие как избыточный цинка, поверхностно-активные вещества, магнийсодержащие соединения, такие как хлорид магния и хлорид-содержащие соединения, такие как хлорид магния и/или хлорид натрия.

Что касается цинка, то композиции по данному изобретению должны, как минимум, содержать цинк в концентрации, которая обеспечивает, по меньшей мере, достаточное ионов цинка для молекул инсулина с образованием стабилизирующих гексамеров, которые имеют 2 специфических, высокоаффинных участка связывания цинка. См., например, BioMetals 18: 295-303 (2005), доступ по адресу: <http://rd.springer.com/article/10.1007/s10534-005-3685-y>. Ионы цинка, заключенные в такие гексамеры инсулина, иногда называют «связанным» цинком. Таким образом, композиции по данному изобретению должны включать достаточное количество цинка для обеспечения по меньшей мере 2 ионов цинка на гексамер инсулина. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, имеющих, например, концентрацию инсулина около 100 ед/мл, около 200 ед/мл, около 300 тд/мл или около 500 тд/мл, минимальная концентрация цинка, необходимая для получения 2 ионов цинка на гексамер инсулина будет составлять около 0,2 мМ, около 0,4 мМ, около 0,6 мМ или около 1 мМ, соответственно.

Однако, включение избыточного цинка, то есть большего количества цинка, чем было бы связано в двух специфических сайтах с высокой аффинностью к цинку в гексамерах инсулина, описанных выше, может быть использовано для дополнительной стабилизации композиции. Такой цинк иногда называется «свободным» или «несвязанным» цинком. В настоящее время имеющиеся цинксодержащие препараты включают от около 2 до 4 ионов цинка на гексамер инсулина. Например, препараты инсулина лизпро 100 ед/мл (HUMALOG®) и инсулина аспарт (NOVOLOG®) имеют около 3 ионов цинка на шесть молекул инсулина, что соответствует концентрации около 0,3 мМ. Имеющаяся в настоящее время композиция HUMALOG® 200 ед/мл содержит около 3,5 ионов цинка на шесть молекул инсулина, что соответствует концентрации цинка около 0,7 мМ. Имеющаяся в настоящее время композиция человеческого инсулина 100 ед/мл, продаваемая Eli Lilly and Company (HUMULIN® R), содержит около 2,3 ионов цинка на шесть молекул инсулина, что соответствует концентрации цинка около 0,23 мМ.

Было обнаружено, что в некоторых композициях по данному изобретению включение избыточного свободного или несвязанного цинка, то есть цинка, не связанного в 2 специфическими сайтами с высоким сродством к

цинку в гексамерах инсулина, описанных выше, оказывает стабилизирующий эффект. Было обнаружено, что композиции, содержащие около 100 ед/мл инсулина лизпро и концентрацию цинка до около 1 мМ, из которого около 0,2 мМ является связанным цинком, а около 0,8 мМ является несвязанным или свободным цинком, были как быстродействующими, так и стабильными. Однако включение слишком большого количества свободного или несвязанного цинка может снизить эффект улучшения времени действия. Было обнаружено, что, например, композиция, содержащая около 100 ед/мл инсулина лизпро с концентрацией цинка около 5 мМ, из которого около 4,8 мМ составляет несвязанный цинк, не имела улучшений во времени действия, наблюдаемых в композициях с более низкими концентрациями цинка. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация цинка находится в пределах от около 0,2 до около 2 мМ, от около 0,3 до около 1,7 мМ, от около 0,7 до около 1,7 мМ, от около 0,4 до около 1 мМ, от около 0,4 до около 0,8 мМ или от около 0,6 до около 0,9 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения содержание цинка составляет около 0,3, около 0,4, около 0,5, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1, около 1,25 или около 1,7 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, содержащих около 100 ед/мл инсулина лизпро, концентрация цинка составляет около 0,6 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, содержащих около 200 ед/мл инсулина лизпро, концентрация цинка составляет около 0,8 мМ.

Другим стабилизирующим агентом, который может быть использован, является поверхностно-активное вещество. Примеры поверхностно-активных веществ, описанных для использования в парентеральных фармацевтических композициях, включают полисорбаты, такие как полисорбат 20 (TWEEN® 20), полиэтиленгликоли, такие как PEG 400, PEG 3000, TRITON™ X-100, полиэтиленгликоли, такие как полиоксиэтилен (23) лауриловый эфир (номер CAS 9002-92-0, продаваемый под торговой маркой BRIJ®), алкоксилированные жирные кислоты, такие как MYRJ™, полипропиленгликоли, блок-сополимеры, такие как полуксамер 188 (номер CAS 9003-11-6, продаваемый под торговым названием PLURONIC® F- 68) и полуксамер 407 (PLURONIC® F127), алкиловые эфиры сорбитана (например, SPAN®), полиэтиоксилированное касторовое масло (например, KOLLIPHOR®, CREMOPHOR®) и трегалоза и их

производные, такие как сложный эфир лаурат трегалозы. В некоторых вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество выбран из группы, состоящей из полиоксиэтилена (23) лаурилового эфира, полксамера 188 и сложного эфира лаурат трегалозы. Наиболее предпочтительным является полксамер 188. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация поверхностно-активного вещества составляет от около 0,003 до около 2% мас./об., от около 0,003 до около 0,3% мас./об. или от около 0,01 до около 0,2% мас./об.. В предпочтительных вариантах реализации изобретения, в которых поверхностно-активное вещество представляет собой полксамер 188, концентрация полксамера 188 составляет от около 0,06 до около 0,12 мас./об.. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация полксамера 188 составляет около 0,06% мас./об.. В других вариантах реализации изобретения концентрация полксамера 188 составляет около 0,09% мас./об.. В других вариантах реализации изобретения концентрация полксамера 188 составляет около 0,12% мас./об..

Другим стабилизирующим агентом, который может быть использован в композициях по данному изобретению, является магний, который может быть получен, например, путем добавления магнийсодержащего соединения, такого как хлорид магния, который имеет молекулярную формулу $MgCl_2$ и молекулярную массу 95,211. Хотя $MgCl_2$ может проявлять стабилизирующие эффекты в определенных композициях, высокие концентрации хлорид ионов (Cl^-) могут приводить к кристаллизации инсулина при низких температурах, а концентрации ионов магния (Mg^{+2}), которые превышают концентрацию цитрата, приводят к осаждению инсулина. Таким образом, максимальное количество хлорида магния, которое может быть включено, ограничено количеством применяемого цитрата. В некоторых вариантах реализации изобретения, когда $MgCl_2$ используется для внесения магния в качестве стабилизирующего агента в композициях по данному изобретению, молярное отношение хлорида магния к цитрату колеблется от около 1:2 до около 1:10. В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение магния находится в диапазоне от около 1:1 до около 1:5. Предпочтительным является молярное соотношение хлорида магния к цитрату в диапазоне от около 1:3 до около 1:5. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация магния колеблется

от около 1 до около 15 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация магния находится в интервале от около 1 до около 5 мМ, от около 5 до около 10 мМ или от около 10 до около 15 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация магния составляет около 2,5, около 5, 5 около 7,5 или около 10 мМ.

Другим стабилизирующим агентом, который может быть использован в композициях по данному изобретению, является хлоридсодержащее соединение, такое как хлорид натрия, которое имеет молекулярную формулу NaCl и молекулярную массу 58,44. Хлорид натрия используется в некоторых доступных в настоящее время препаратах быстродействующих аналогов 10 инсулина, таких как APIDRA® (инсулин глулизин), который содержит 5 мг/мл хлорида натрия и NOVOLOG® (инсулин аспарт), который содержит 0,58 мг/мл хлорида натрия. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, в которых в качестве стабилизирующего агента используется хлорид натрия, 15 концентрация хлорида натрия колеблется от около 1 до около 50 мМ. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, в которых в качестве стабилизирующего агента используется хлорид натрия, концентрация хлорида натрия колеблется от около 10 до около 40 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация хлорида натрия составляет от около 15 20 до около 25 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация хлорида натрия составляет около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19 или около 20 мМ.

Оба MgCl₂ и NaCl приводят к добавлению ионов хлорида (Cl⁻), и если 25 общее содержание хлоридов в композиции слишком велико, инсулин в композиции может кристаллизоваться при низких температурах, также это может приводить к нестабильности при высоких температурах. Таким образом, если в качестве стабилизирующих агентов используют MgCl₂ и/или NaCl, необходимо учитывать общее содержание хлоридов в композиции. При 30 определении общего количества хлорида, присутствующего в композиции, если MgCl₂ и/или NaCl используются в качестве стабилизирующих агентов, также необходимо учитывать тот факт, что ионы хлорида могут быть добавлены в композицию посредством добавления других компонентов, например, с

объемом активного фармацевтического ингредиента (API) инсулина путем добавления небольших количеств HCl, которые могут потребоваться для регулирования pH, и/или в связи с предоставлением Zn, который может быть добавлен в форме раствора, полученного путем солюбилизации оксида цинка (ZnO) с HCl. Таким образом, следует учитывать общую концентрацию хлорида из всех источников, если в качестве стабилизирующих агентов применяются MgCl₂ и/или NaCl. Что касается концентраций, то в композициях, содержащих около 100 мМ NaCl, наблюдается низкотемпературная кристаллизация инсулина, но такие проблемы не наблюдаются в композициях, содержащих вплоть до около 30 мМ общего хлорида. Кроме того, было обнаружено, что проблемы с низкой температурой кристаллизации, связанные с относительно высокими концентрациями хлорида, чувствительны к концентрациям цитрата. Таким образом, композиции по данному изобретению, имеющие концентрации цитрата в нижнем конце диапазона, описанные в данном документе, могут быть более толерантными к относительно более высоким концентрациям хлорида, по сравнению с композициями, содержащими концентрации цитрата в верхнем конце диапазона, предусмотренного в данном изобретении. Например, было обнаружено, что увеличение концентраций хлорида натрия до 50-75 мМ в композициях, содержащих 25 мМ цитрата, приводит к проблемам с низкой температурой кристаллизации, но такие проблемы не наблюдаются в случаях, когда 50 мМ хлорида натрия добавляют к 15 мМ цитрата или когда 25 мМ хлорида натрия добавляют к 25 мМ цитрата. Количество общего хлорида, добавленного посредством использования NaCl и/или MgCl₂ в качестве стабилизирующих агентов, не должно превышать около 50 мМ. В некоторых вариантах реализации данного изобретения общая концентрация хлорида из всех источников составляет от около 10 до около 50 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида находится в пределах от около 13 до около 45 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида находится в пределах от около 20 до около 25 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида находится в пределах от около 15 до около 35 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида находится в пределах от около 20 до около 25 мМ. В некоторых вариантах

реализации изобретения общая концентрация хлорида составляет около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, около 21 мМ, около 22 мМ, около 23 мМ, около 24 мМ или около 25 мМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция может
5 содержать более одного дополнительного стабилизирующего агента, чтобы
гарантировать, что композиция поддерживает коммерчески приемлемый
профиль стабильности. Предпочтительная комбинация стабилизирующих
агентов, которые могут быть использованы в композициях по данному
изобретению, содержит избыток цинка и магния. Другая предпочтительная
10 комбинация стабилизирующих агентов, которые могут быть использованы в
композициях по данному изобретению, содержит цинк, поверхностно-активное
вещество, такое как полоксамер 188 и хлорид магния или хлорид натрия.

Композиции по данному изобретению содержат один или несколько
консервантов, которые обеспечивают антимикробные свойства и могут
15 дополнительно обеспечивать преимущества с точки зрения стабильности.
Композиции являются стерильными при создании, однако, когда
предусматривается использование композиции в повторно используемой
емкости или картридже, антимикробное консервирующее соединение или смесь
соединений, которые совместимы с другими компонентами композиции,
20 обычно добавляются в достаточных концентрациях для удовлетворения
нормативных и фармакопейных антимикробных требований к сохранности. См.
U.S. Pharmacopeia Monographs. Insulin lispro injection. USP29-NF24; British
Pharmacopeia Monographs 2008 Volume III: Insulin aspart injection; U.S.
Pharmacopeia Monographs. Insulin assays; and U.S. Pharmacopeia general chapters.
25 USP29-NF24. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention; 2005. Antimicrobial
effectiveness testing; pp. 2499–2500. Предпочтительными консервантами
являются арильные кислоты и фенольные соединения или смеси таких
соединений. Эффективные концентрации могут быть легко определены с
использованием методов, упомянутых выше. Консерванты, обычно
30 используемые в препаратах инсулина, включают фенол (CAS № 108-95-2,
молекулярная формула C_6H_5OH , молекулярная масса 94,11) и м-крезол (CAS №
108-39-4, молекулярная формула C_7H_8O , молекулярная масса 108,14).
Например, данные коммерческие композиции содержат 3,5 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). В одном варианте реализации изобретения консервант выбирают из группы, состоящей из фенола и м-крезола. Предпочтительным вариантом консерванта является м-крезол. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация м-крезола составляет от около 2,5 до около 3,8 мг/мл. Предпочтительной концентрацией м-крезола является концентрация около 3,15 мг/мл.

Желательно как можно точнее согласовать тоничность (то есть осмоляльность) вводимого препарата с тоничностью биологических жидкостей в месте инъекции композиций, потому что растворы, которые не являются приблизительно изотоническими с биологическими жидкостями, могут вызвать жгучее болезненное ощущение при введении. Таким образом, желательно, чтобы композиции были приблизительно изотоническими с биологическими жидкостями в местах инъекции. Если осмоляльность композиции в отсутствие агента тоничности значительно меньше осмоляльности ткани (для крови около 300 мосмоль/кг, требования европейской фармакопеи в осмоляльности составляет > 240 мосмоль/кг), то агент тоничности обычно следует добавлять для повышения тоничности композиции до около 300 мосмоль/кг. Осмоляльность композиции определяется наличием и концентрациями других 15
20
25
30
эксципиентов в композиции, включая стабилизирующий агент (ы). Таким образом, концентрации всех различных эксципиентов в композиции должны учитываться, чтобы определить, должен ли добавляться агент тоничности, и такие оценки и определения могут быть легко получены с использованием стандартных способов. См. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, David B. Troy and Paul Beringer, eds., Lippincott Williams & Wilkins, 2006, pp. 257-259; Remington: Essentials of Pharmaceutics, Linda Ed Felton, Pharmaceutical Press, 2013, pp. 277-300. Типичные агенты тоничности включают глицерин (глицерин), маннит и хлорид натрия. Если требуется добавление агента тоничности, предпочтительным является глицерин. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация глицерина составляет от около 1 до около 16 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация глицерина составляет от около 1 до около 2 мг/мл, от около 3 до около 4 мг/мл, от около 5 до около 6 мг/мл, от около 7 до около 8 мг/мл, от около 9 до около 10

мг/мл, от около 11 до около 12 мг/мл, от около 13 до около 14 мг/мл или от около 15 до около 16 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация глицерина составляет около 5, около 12 или около 16 мг/мл.

Известно также, что цитрат, который, как отмечено выше, способствует
5 улучшению характеристик времени действия, также обладает буферными свойствами, но при желании может быть добавлено дополнительное буферное соединение. Примерами таких буферных соединений являются фосфатные буферы, такие как двухосновный фосфат натрия, ацетат натрия и трис(гидроксиметил)аминометан или ТРИС. Если требуется дополнительное
10 буферное соединение, предпочтительными являются ТРИС или фосфатные буферы. рН для коммерческих композиций инсулина обычно находится в диапазоне от 7,2 до 7,6, при $7,4 \pm 0,1$ в качестве общего целевого рН. Значение рН по данному изобретению обычно составляет от около 7,0 до около 7,8, и оно регулируется с использованием физиологически подходящих кислот и
15 оснований, обычно 10% хлористоводородной кислоты и 10% гидроксида натрия. Предпочтительно рН составляет около 7,4.

Способ введения композиций по данному изобретению, как правило, осуществляется путем самостоятельной подкожной инъекции, например, с использованием шприца или устройства для перорального введения, или путем
20 непрерывной подкожной инсулиновой инфузии инсулиновой помпой, через внутривенным, внутрикожный, или внутрибрюшинный пути введения.

Как отмечено выше, данное изобретение также относится к изделию, содержащему фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах реализации изобретения изделие представляет собой емкость многократного
25 использования. В других вариантах реализации изобретения изделие является предварительно заполненным многоразовым картриджем. В других вариантах реализации изобретения изделие является повторно используемой ручкой-инжектором. В других вариантах реализации изобретения изделие является одноразовой ручкой-инжектором. В других вариантах реализации изобретения
30 изделие является помпой для непрерывной подкожной инсулиновой инфузионной терапии. В других вариантах реализации изобретения изделие представляет собой емкость для использования в насосном устройстве для непрерывной подкожной инсулиновой терапии.

В одном варианте реализации изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: инсулин; цитрат, в концентрации от около 5 до около 25 мМ; трепростинил, в концентрации от около 0,04 до около 20 мкг/мл; цинк, в концентрации, достаточной для обеспечения по меньшей мере 2 ионов цинка на шесть молекул инсулина; консервант; и один или несколько дополнительных стабилизирующих агентов; и имеет рН от около 7,0 до около 7,8 при комнатной температуре.

В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация цинка находится в диапазоне от около 0,2 до около 2 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация цинка составляет от около 0,2 до около 1 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация цинка составляет от около 0,6 до около 0,8 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация цинка составляет около 0,6 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация цинка составляет около 0,7 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация цинка составляет около 0,8 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация цинка составляет около 0,9 мМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или несколько дополнительных стабилизирующих агентов выбраны из группы, состоящей из поверхностно-активного вещества, хлорида магния и хлорида натрия.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или несколько дополнительных стабилизирующих агентов содержат поверхностно-активное вещество, которое присутствует в концентрации от около 0,003 до около 2% мас./об.. В некоторых вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер 188. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация полоксамера 188 составляет от около 0,06 до около 0,12% мас./об.. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация полоксамера 188 составляет около 0,06% мас./об.. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация полоксамера 188 составляет около 0,09% мас./об.. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация полоксамера 188 составляет около 0,12% мас./об..

В некоторых вариантах реализации изобретения один или несколько дополнительных стабилизирующих агентов содержат хлорид магния, который

присутствует в концентрации, приводящей к молярному соотношению хлорида магния к цитрату от около 1:2 до около 1:10. В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение магния находится в диапазоне от около 1:1 до около 1:5. В некоторых вариантах реализации изобретения молярное отношение хлорида магния к цитрату составляет от около 1:3 до около 1:5. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация магния колеблется от около 1 до около 15 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация магния находится в интервале от около 1 до около 5 мМ, от около 5 до около 10 мМ или от около 10 до около 15 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация магния составляет около 2,5, около 5, около 7,5 или около 10 мМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или несколько дополнительных стабилизирующих агентов содержат хлорид натрия, который присутствует в концентрации от около 10 до около 40 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация хлорида натрия составляет от около 15 до около 25 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида составляет не более около 50 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида находится в пределах от около 10 до около 50 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида находится в пределах от около 13 до около 45 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида находится в пределах от около 20 до около 25 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида находится в пределах от около 15 до около 35 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида находится в пределах от около 20 до около 25 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида составляет около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, около 21 мМ, около 22 мМ, около 23 мМ, около 24 мМ или около 25 мМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация инсулина составляет от около 100 до около 500 ед/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация инсулина составляет от около 100 до около 300 ед/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация инсулина

составляет от около 100 до около 200 ед/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения инсулин представляет собой инсулин лизпро.

В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация цитрата составляет от около 10 до около 25 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация цитрата составляет около 15 мМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит трепростинил в концентрации от около 0,04 до около 20 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация трепростинила составляет от около 0,04 до около 10 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация трепростинила составляет от около 0,5 до около 2 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация трепростинила составляет около 1 мкг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения консервант представляет собой м-крезол. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация м-крезола составляет от около 2,5 до около 3,8 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация м-крезола составляет около 3,15 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция дополнительно содержит агент тоничности. В некоторых вариантах реализации изобретения агент тоничности представляет собой глицерин. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация глицерина составляет от около 1 до около 15 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация глицерина составляет от около 1 до около 2 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция обеспечивает поглощение инсулина в кровь, начало действия и/или продолжительность действия, которые по меньшей мере на 20% быстрее по сравнению с композициями, которые содержат один и тот же инсулин, но которые не содержат цитрат или трепростинил, при измерении одного или нескольких фармакокинетических или фармакодинамических параметров, относящихся к времени действия, таких как: время до максимальной концентрации инсулина (T_{max}); время достижения половины максимальной концентрации инсулина (начальное $\frac{1}{2} T_{max}$); время достижения половины максимальной концентрации инсулина во время фазы снижения кривой

концентрации за время (позднее $\frac{1}{2}$ Tmax); время между ранним и поздним $\frac{1}{2}$ Tmax (диапазон Tmax); процент от общей дозы инсулина, поглощенной в разное время на основании фракционной площади под кривой концентрации инсулина (например, AUC_{0-30min}, AUC_{0-60min}, AUC_{0-120 min}, AUC_{0-180min}); время достижения 5 половины общей концентрации инсулина (T50); время достижения максимальной скорости инфузии глюкозы (GIRmax), время достижения половины максимальной скорости инфузии глюкозы (начальное $\frac{1}{2}$ GIRmax); время достижения половины максимальной скорости инфузии глюкозы во время фазы снижения кривой концентрации-времени (позднее $\frac{1}{2}$ GIRmax); 10 процент общей концентрации глюкозы, вводимой в разное время на основе фракционной площади под кривой GIR (например, GIR_{0-30min}, GIR_{0-60min}, GIR_{0-120 min}, GIR_{0-180min}).

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция обеспечивает поглощение инсулина в кровь, начало действия и/или 15 продолжительность действия, которое меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или, по меньшей мере, на 50% быстрее по сравнению с композициями, которые содержат тот же самый инсулин, но не содержащими цитрат или трепростинил при измерении одних или нескольких фармакокинетических или фармакодинамических параметров, описанных выше.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция обеспечивает поглощение инсулина в кровь, начало действия и/или 20 продолжительность действия, которое быстрее на величину от около 20 до около 50%, от около 20 до около 30%, от около 30 до около 40 % или от около 40 до около 50% по сравнению с композициями, которые содержат один и тот же инсулин, но которые не содержат цитрат или трепростинил, при измерении 25 одних или нескольких фармакокинетических или фармакодинамических параметров, описанных выше.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция не содержит никакого дополнительного хелатирующего агента, 30 такого как ЭДТА, любого дополнительного сосудорасширяющего агента, такого как нитроглицерин, и/или любых олигосахаридов.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция является стабильной, чтобы обеспечить хранение в течение по

меньшей мере 24 месяцев при 2-8 °С и до 28 дней при использовании при температурах до 30 °С для емкостей или картриджей в повторно используемых ручках-инжекторах. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция является стабильной, чтобы обеспечить хранение в течение по меньшей мере 36 месяцев при 2-8 °С и до 28 дней при использовании при температурах до 30 °С для емкостей или картриджей в повторно используемых ручках-инжекторах.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция является стабильной при использовании в помпе для непрерывной подкожной инсулиновой инфузии в течение до 7 дней.

Дополнительные варианты реализации данного изобретения включают описанные ниже:

1. Фармацевтическая композиция, содержащая: инсулин; цитрат; и трепростинил.
2. Фармацевтическая композиция по вышеописанному варианту реализации, где инсулин выбран из группы, состоящей из человеческого инсулина, инсулина лизпро, инсулина аспарт или инсулина glulisine.
3. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой инсулин представляет собой инсулин лизпро.
4. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация инсулина составляет от около 100 до около 500 ед/мл.
5. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация инсулина составляет от около 100 до около 300 ед/мл.
6. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация инсулина составляет от около 100 до около 200 ед/мл.
7. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация инсулина составляет около 100 ед/мл.

8. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация инсулина составляет около 200 ед/мл.
- 5 9. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация инсулина составляет от около 5 до около 25 ед/мл.
- 10 10. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация инсулина составляет от около 15 до около 25 ед/мл.
11. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация инсулина составляет от около 15 до около 20 ед/мл.
12. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цитрата составляет около 5, 15 около 10, около 12, около 15, около 18, около 20 или около 25 мМ.
13. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цитрата составляет около 15 мМ
14. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация трепростинила составляет от 20 около 0,04 до около 20 мкг/мл.
15. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация трепростинила составляет от около 0,04 до около 10 мкг/мл.
16. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных 25 вариантов реализации, в которой концентрация трепростинила составляет от около 0,5 до около 10 мкг/мл.
17. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация трепростинила составляет от около 0,5 до около 2 мкг/мл.
- 30 18. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация трепростинила составляет около 0,5, около 0,6, около 1, около 2, около 2,3, около 9,3 или около 10 мкг/мл.

19. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация трепростинила составляет около 1 мкг/мл.

20. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой композиция дополнительно содержит цинк.

21. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цинка составляет от около 0,2 до около 2 мМ.

22. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цинка составляет от около 0,3 до около 1.7 мМ.

23. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цинка составляет от около 0,7 до около 1.7 мМ.

24. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цинка составляет от около 0,3 до около 1 мМ.

25. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цинка составляет от около 0,4 до около 0.8 мМ.

26. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цинка составляет около 0,3, около 0,4, около 0,5, около 0,6, около 0,7 около 0,8, около 0,9 мМ, около 1,25 или около 1,7 мМ.

27. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цинка составляет около 0,6 мМ.

28. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цинка составляет около 0,7 мМ.

29. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цинка составляет около 0,8 мМ.

30. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой концентрация цинка составляет около 0,9 мМ.

31. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, дополнительно содержащая магний.

32. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой магний присутствует в концентрации, приводящей к молярному отношению магния к цитрату от около 1:2 до около 1:10.

33. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой магний присутствует в концентрации, приводящей к молярному отношению магния к цитрату от около 1:1 до около 1:5.

34. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой молярное отношение магния к цитрату составляет от около 1:3 до около 1:5.

35. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой магний присутствует в концентрации от около 1 до около 15 мМ.

36. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой магний присутствует в концентрации от около 2.5 до около 10 мМ.

37. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой магний присутствует в концентрации от около 5 до около 10 мМ.

38. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой магний присутствует в концентрации от около 2.5 до около 7.5 мМ.

39. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой магний присутствует в концентрации около 2,5, около 5, около 7,5 или около 10 мМ.

40. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, включающая магний, в которой магний представлен в виде хлорида магния.

41. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, дополнительно содержащая хлорид натрия.

42. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой содержится хлорид натрия в концентрации от около 1 до около 50 мМ.

5 43. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой содержится хлорид натрия в концентрации от около 10 до около 40 мМ.

44. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой содержится хлорид натрия в концентрации от около 15 до около 25 мМ.

10 45. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой содержится хлорид натрия в концентрации от около 1 до около 20 мМ.

15 46. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, отличающаяся тем, что композиция содержит хлорид натрия в концентрации около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19 или около 20 мМ.

20 47. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой общая концентрация хлорида составляет от около 1 до около 100 мМ.

48. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой общая концентрация хлорида составляет от около 10 до около 100 мМ.

25 49. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой общая концентрация хлорида составляет от около 10 до около 50 мМ.

50. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой общая концентрация хлорида составляет от около 13 до около 45 мМ.

30 51. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой общая концентрация хлорида составляет от около 16 до около 35 мМ.

52. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, в которой общая концентрация хлорида составляет от около 20 до около 25 мМ.

53. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация хлорида составляет около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, около 21 мМ, около 22 мМ, около 23 мМ, около 24 мМ или около 25 мМ.

54. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

55. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит полоксамер 188.

56. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая полоксамер 188 в концентрации от около 0,003 до около 2% мас./об..

57. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая полоксамер 188 в концентрации от около 0,003 до около 0.3% мас./об..

58. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая полоксамер 188 в концентрации от около 0,01 до около 0.2% мас./об..

59. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая полоксамер 188 в концентрации от около 0,06 до около 0,12 вес./об..

60. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит консервант.

61. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая консервант, который выбран из группы, состоящей из м-крезола и фенола.

62. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая консервант, который представляет собой м-крезол.

5 63. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая м-крезол в концентрации от около 2,5 до около 3,8 мг/мл.

64. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая м-крезол в концентрации около 3,15 мг/мл.

10 65. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, дополнительно содержащая агент тоничности.

66. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая агент тоничности, который представляет собой глицерин.

15 67. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая глицерин в концентрации от около 1 до около 20 мг/мл.

68. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая глицерин в концентрации от около 1 до около 15 мг/мл.

20 69. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая глицерин в концентрации от около 1 до около 2 мг/мл, от около 3 до около 4 мг/мл, от около 5 до около 6 мг/мл, от около 7 до около 8 мг/мл, от около 9 до около 10 мг/мл, от около 11 до около 12 мг/мл, от около 13 до около 14 мг/мл или от около 15 до около 16 мг/мл.

25 70. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая глицерин в концентрации около 5, около 12 или около 16 мг/мл.

71. Фармацевтическая композиция по любому из вышеописанных вариантов реализации, содержащая глицерин в концентрации около 12 мг/мл.

30 Изобретение далее иллюстрируется следующими примерами, которые не должны рассматриваться как ограничивающие.

ПРИМЕРЫ

Фармакокинетические и Фармакодинамические Исследования

Инсулин лизпро, объединенный с 0,5 мкг/мл трепростинила и/или 15 мМ цитрата натрия

5 Кастрированные самцы миниатюрных свиней из Юкатана, больные диабетом (индуцированным с помощью Alloxan) (средний возраст 23 месяца, средний вес тела 45 кг) с ранее установленными сосудистыми порт-системами использовались под наблюдением персонала и ветеринаров. Животные, больные диабетом размещались индивидуально и всегда имели доступ к пресной воде. Их кормили двумя приемами пищи в день, соблюдая стандартную диету, также они получали соответствующую основную и прандиальную инсулиновую
10 терапию два раза в день для терапии диабетического состояния.

Тестируемые композиции (композиции А, В и С в таблице ниже) формировались путем добавления указанных количеств цитрата и/или трепростинила к флакону Humalog®. Необходимое количество трепростинила рассчитывается исходя из флаконов 1 мг/мл Remodulin®. Каждый мл
15 Remodulin® также содержит 3 мг м-крезола, 6,3 мг цитрата натрия и 5,3 мг хлорида натрия, поэтому добавление трепростинила в тестовые композиции также приводит к добавлению небольших количеств этих эксципиентов, а также к небольшому разведению эксципиентов Humalog®. Однако такие небольшие количества, как считается, не влияют на свойства композиций и, таким образом,
20 не отражены в Таблице 1 ниже.

Таблица 1.

Название	Препарат
Композиция А	100 единиц/мл инсулина лизпро 0,5 мкг/мл трепростинила 1,88 мг/мл фосфата 3,15 мг/мл м-крезола 16 мг/мл глицерина 0,3 мМ Zn рН 7,4
Композиция В	98 единиц/мл инсулина лизпро 15 мМ Цитрата натрия 1,88 мг/мл фосфата 3,15 мг/мл м-крезола 16 мг/мл глицерина 0,3 мМ Zn рН 7,4
Композиция С	98 единиц/мл инсулина лизпро 15 мМ Цитрата натрия 0,5 мкг/мл трепростинила 1,88 мг/мл фосфата 3,15 мг/мл м-крезола 16 мг/мл глицерина 0,3 мМ Zn рН 7,4
Humalog®	100 ед/мл инсулина лизпро 1,88 мг/мл фосфата 16 мг/мл глицерина 3,15 мг/мл м-крезола 0,3 мМ Zn рН 7,4

За день до исследования животных кормили половиной их ежедневного рациона и вводили животным 0,2 Ед/кг инсулина Humalog® Mix 75/25 при их утренней терапии. Все исследуемые животные голодали в течение ночи и не получают своего вечернего инсулина или еды до введения препарата в день исследования.

Утром в день исследования все животные помещались в стропы для удерживания и получения доступа к сосудистым порт-системам (оборудованным для взятия крови) и проверки их работоспособности. Животных случайным образом делили на тестовые группы.

Исследование представляет собой полное кроссоверное исследование с $n = 20$. Одно животное было устранено от двух из четырех исследований из-за

неработоспособности порта, поэтому для композиций А и С выборка составляет $n = 19$, тогда как для композиции В и Humalog® выборки равны $n = 20$.

5 После сбора двух исходных образцов крови (-30 и -20 мин) животных возвращали в свои помещения и кормили (~ 300 г). Через 20 минут после полного потребления пищи животным вводили тестовый препарат подкожно на боку (0 мин) с помощью инсулинового шприца Teguto (0,3 или 0,5 мл с иглой 1/2 дюйма). Все исследуемые животные имели доступ к чистой свежей воде в течение оставшегося периода отбора крови.

10 Последовательные образцы крови (по 2,0 мл каждый) отбирают у каждого животного в следующие моменты времени: -30, -20 (затем сразу же кормили), 0 (непосредственно перед дозой), 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 240 и 360 минут после подкожной дозы.

15 Образцы крови (антикоагулянт: нет [сыворотка]) содержались при температуре окружающей среды в течение по меньшей мере 30 минут, но не более 2 часов, чтобы обеспечить свертывание. Затем сыворотку отделяли с помощью центрифугирования и разделяли на две аликвоты и хранили в замороженном состоянии при температуре около -70°C .

20 Концентрацию глюкозы в сыворотке определяли с помощью автоматизированного клинического химического анализатора AU480 (Beckman Coulter, Inc., Brea, California). Аликвоты для анализа ФК (фармакокинетические параметры) были отправлены в EMD Millipore Corp., St. Charles, MO на сухом льду службой доставки на следующий день и содержали подробное описание образцов.

25 Данные о глюкозе сыворотки представлены в Таблице 2 ниже как среднее (AVG) (мг/дл) +/- стандартная ошибка среднего (SEM), если не указано иное.

Таблица 2.

Время (мин)	Humalog®		Композиция А		Композиция В		Композиция С	
	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	290,2	8,6	286,8	9,0	289,2	8,1	283,2	8,4
-20	297,6	8,5	299,2	10,2	297,6	9,0	297,5	7,5
0	311,3	8,6	311,0	10,7	312,2	9,5	309,6	7,4
5	318,1	8,9	316,8	10,0	319,0	9,6	314,9	8,1
10	318,9	8,6	315,3	11,4	305,2	11,7	295,7	10,3
15	312,3	9,2	297,6	13,5	276,6	12,8	265,1	11,6
30	297,1	9,8	251,9	18,6	220,3	16,2	205,5	17,0
45	288,3	12,0	233,1	16,7	204,5	18,5	209,8	17,1
60	244,1	14,7	187,9	17,5	178,5	18,6	159,2	20,0
75	231,5	15,3	166,6	18,2	169,0	20,4	146,3	20,4
90	204,6	15,6	145,7	18,5	157,7	21,4	133,2	21,1
105	181,9	15,9	127,0	18,1	144,7	21,4	118,7	18,9
120	153,3	16,2	111,4	17,3	128,2	21,1	111,7	18,5
150	120,2	16,8	86,4	15,8	115,7	20,0	102,9	15,9
180	101,5	16,5	76,4	14,5	106,3	18,2	97,0	13,2
240	82,8	12,2	92,3	14,2	100,7	13,3	98,6	12,3
360	90,3	14,4	130,5	18,2	111,8	17,2	126,3	17,0

Концентрации сывороточного инсулина для ФК-анализа измеряли с использованием RIA общего количества инсулина. Нижний и верхний пределы количественного определения для анализа составляют 20 пМ и 5000 пМ соответственно. Предполагается, что значения ниже нижнего предела количественного определения составляют 20 пМ. Некомпаратментальные фармакокинетические исследования выполняются с использованием Phoenix WinNonlin v6.3. Параметры ФК, полученные из концентраций сывороточного инсулина, приведены в Таблице 3 ниже.

10 Таблица 3.

Композиция		Tmax (мин)	Раннее ½ Мах. (мин)	Позднее ½ Мах. (мин)	Диапазон Tmax (мин)	T50 (мин)
Humalog®	Среднее (SE)	71,3 (7,3)	29,6 (4,1)	175 (14)	145 (14)	127 (6)
А	Среднее (SE)	74,2 (7,6)	24,1 (3,8)	146 (12)	122 (13)	102 (5)
В	Среднее (SE)	55,5 (7,8)	16,5 (4,9)	130 (12)	113 (14)	100 (6)

С	Среднее (SE)	42,1 (6,6)	15,9 (3,9)	98,5 (13,4)	82,6 (13,6)	83,4 (5,7)
---	--------------	------------	------------	-------------	-------------	------------

Это исследование подтверждает, что композиции по данному изобретению имеют улучшенное фармакокинетическое и/или фармакодинамическое время действия.

5 Инсулин лизпро, объединенный с 10 мМ цитрата и/или 10 мг/мл трепростинила

Исследование композиций, содержащих различные концентрации цитрата и/или 10 мкг/мл трепростинила, проводили на кастрированных самцах миниатюрных свиней Юкатана, больных диабетом (индуцированным с помощью Alloxan) (средний возраст 24 месяца, средняя масса тела 43 кг) следуя, в основном, описанным выше процедурам.

Исследуемые препараты (композиции D-H в приведенной ниже таблице) формировали путем добавления указанных количеств цитрата и/или трепростинила к флакону Humalog®. Как и в случае описанного выше исследования, необходимое количество трепростинила рассчитывалось, исходя из флакона 1 мг/мл Remodulin®, поэтому добавление трепростинила в тестовые композиции также приводит к добавлению небольших количеств м-крезола, цитрата натрия и хлорид натрия, а также небольшого разбавления эксципиентов Humalog®. Однако такие небольшие количества, как считается, не влияют на свойства композиций и, таким образом, не отражены в Таблице 4 ниже.

Таблица 4.

Название	Состав композиции
Композиция D	99,7 ед/мл инсулина лизпро 5 мМ цитрата 0,3 мМ Zn 3,15 мг/мл м-крезола 16 мг/мл глицерина 1,88 мг/мл фосфата
Композиция E	99,2 ед/мл инсулина лизпро 10 мМ цитрата 0,3 мМ Zn 3,15 мг/мл мета-крезола 16 мг/мл глицерина 1,88 мг/мл фосфата

Композиция F	99,2 ед/мл инсулина лизпро 10 мкг/мл трепростинила 0,3 мМ Zn 3,15 мг/мл мета-крезола 16 мг/мл глицерина 1,88 мг/мл фосфата
Композиция G	100,2 ед/мл инсулина лизпро 5 мМ цитрата 10 мкг/мл трепростинила 0,3 мМ Zn 3,15 мг/мл мета-крезола 16 мг/мл глицерина 1,88 мг/мл фосфата
Композиция H	99,6 ед/мл инсулина лизпро 10 мМ цитрата 10 мкг/мл трепростинила 0,3 мМ Zn 3,15 мг/мл мета-крезола 16 мг/мл глицерина 1,88 мг/мл фосфата
Humalog®	100 ед/мл КРВ 1,88 мг/мл двухосновного фосфата натрия 16 мг/мл глицерина 3,15 мг/мл м-крезола 0,3 мМ Zn рН 7.4

Исследование было проведено как полное кроссоверное исследование на 19 свиньях, в котором каждая свинья исследуется для каждого испытуемого препарата. Несколько животных не участвовали в исследовании из-за неработоспособности порт-системы, поэтому выборки D и E составляют n = 18, тогда как выборки F-H равны n = 19 и размер выборки Humalog® равен n = 17.

Данные об уровне глюкозы в сыворотке представлены ниже в Таблице 5 в виде среднего (мг/дл) +/- SEM), если не указано иное.

Таблица 5.

Время (мин)	Humalog®		Композиция D		Композиция E		Композиция F		Композиция G		Композиция H	
	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	340,5	8,2	340,2	8,9	321,2	7,3	335,2	8,5	337,4	7,5	331,8	10,1
-20	344,4	8,0	341,3	9,2	326,2	7,8	339,8	7,7	344,6	6,7	338,6	11,0
0	362,6	7,7	353,2	10,3	339,4	9,5	357,8	7,9	354,7	7,9	349,1	11,4
5	377,6	7,9	370,6	9,8	349,5	11,9	367,9	8,0	369,1	8,5	368,2	12,4
10	376,7	8,4	360,7	9,3	329,6	12,0	361,0	11,1	361,9	9,0	345,6	13,4
15	372,4	10,1	341,7	13,2	307,6	13,7	348,1	12,3	342,6	9,1	321,6	14,6
30	339,8	17,9	292,2	17,3	256,6	18,5	304,1	14,7	299,0	12,9	276,4	20,6
45	301,5	21,8	251,1	21,0	230,9	20,9	263,1	18,0	254,6	16,0	237,3	24,2
60	272,4	25,7	224,2	21,3	207,3	20,1	230,9	21,6	230,3	18,3	208,8	26,4
75	253,0	26,7	202,3	22,6	178,2	19,3	197,2	22,8	196,9	20,3	168,5	25,2
90	220,2	28,3	186,1	23,0	164,6	20,5	173,4	23,5	173,6	21,4	153,8	26,2
105	195,6	27,6	148,2	20,0	144,3	19,6	148,6	23,1	147,6	20,9	131,8	24,2
120	184,4	27,5	133,3	19,1	129,9	18,2	130,0	22,6	124,9	20,4	115,4	23,0
150	158,2	24,8	114,1	17,7	104,6	18,5	101,4	18,6	98,8	16,8	90,1	18,3
180	134,3	22,0	102,7	16,5	86,1	15,8	90,8	17,5	92,2	14,6	76,8	15,9
240	122,4	19,7	93,7	16,4	75,2	12,4	93,5	15,0	91,1	17,5	74,4	11,7
360	118,4	17,1	104,0	15,8	90,7	15,1	113,9	13,7	113,7	14,1	105,1	11,1

Концентрации сывороточного инсулина и параметры ФК для контроля Humalog® и композиций E, F и H получали и анализировали в целом, как описано выше, и результаты ФК-анализа приведены в Таблице 6 ниже.

5 Таблица 6.

Композиция		Tmax (мин)	Раннее Max. (мин)	$\frac{1}{2}$ Позднее Max. (мин)	Диапазон (мин)	T50 (мин)
Humalog®	Среднее (SE)	69,7 (12,5)	17,8 (4,1)	155 (16)	138 (16)	113 (7)
E	Среднее (SE)	53,8 (10,3)	6,46 (0,55)	151 (15)	144 (15)	104 (5)
F	Среднее (SE)	54,2 (7,29)	23,1 (4,8)	110 (11)	87,1 (10,8)	89,4 (5,7)
H	Среднее (SE)	39,5 (4,95)	9,85 (1,77)	109 (11)	99,6 (11,5)	90,7 (5,5)

Это исследование подтверждает, что композиции по данному изобретению имеют улучшенное фармакокинетическое и/или фармакодинамическое время действия.

Инсулин лизпро объединенный с 15 мМ цитрата и 0,6-9,3 мкг/мл трепростинила

Исследование композиций, содержащих 15 мМ цитрата и/или различные концентрации трепростинила, проводили на кастрированных самцах миниатюрных свиней Юкатана, больных диабетом (индуцированным с помощью Alloxan) (средний возраст 25 месяца, средняя масса тела 43 кг) следуя, в основном, описанным выше процедурам.

Исследуемые препараты (Композиции I-M в приведенной ниже таблице) составлены путем добавления указанных количеств цитрата и/или трепростинила, а также $MgCl_2$ и/или $NaCl$ в композициях, указанных ниже, во флакон Humalog®. Как и в случае описанного выше исследования, необходимое количество трепростинила рассчитывалось, исходя из флакона 1 мг/мл Remodulin®, поэтому добавление трепростинила в тестовые композиции также приводит к добавлению небольших количеств м-крезола, цитрата натрия и хлорид натрия, а также небольшого разбавления эксципиентов Humalog®. Однако такие небольшие количества, как считается, не влияют на свойства композиций и, таким образом, не отражены в Таблице 7 ниже.

Таблица 7.

Название	Состав композиции
Композиция I	99,1 ед/мл инсулина лизпро 15 мМ цитрата 5 мМ $MgCl_2$ 15 мМ $NaCl$ 0,3 мМ Zn 3,15 мг/мл м-крезола 1,88 мг/мл двухосновного фосфата натрия 16 мг/мл глицерина,
Композиция J	99,8 ед/мл инсулина лизпро 9,30 мкг/мл трепростинила 0,3 мМ Zn 3,15 мг/мл м-крезола 1,88 мг/мл двухосновного фосфата натрия 16 мг/мл глицерина

Название	Состав композиции
Композиция К	99,6 ед/мл инсулина лизпро 15 мМ цитрата 5 мМ MgCl ₂ 15 мМ NaCl 0,60 мкг/мл трепростинила 0,3 мМ Zn 3,15 мг/мл м-крезола 1,88 мг/мл двухосновного фосфата натрия 16 мг/мл глицерина
Композиция L	100,4 ед/мл инсулина лизпро 15 мМ цитрата 5 мМ MgCl ₂ 15 мМ NaCl 2,30 мкг/мл трепростинила 0,3 мМ Zn 3,15 мг/мл м-крезола 1,88 мг/мл двухосновного фосфата натрия 16 мг/мл глицерина
Композиция М	100,3 ед/мл инсулина лизпро 15 мМ цитрата 5 мМ MgCl ₂ 15 мМ NaCl 9,30 мкг/мл трепростинила 0,3 мМ Zn 3,15 мг/мл м-крезола 1,88 мг/мл двухосновного фосфата натрия 16 мг/мл глицерина
Humalog®	100 ед/мл КРВ 1,88 мг/мл двухосновного фосфата натрия 16 мг/мл глицерина 3,15 мг/мл м-крезола 0,3 мМ Zn рН 7,4

Исследование было проведено как полное кроссоверное исследование на 17 свинях, в котором каждая свинья исследуется для каждого испытуемого препарата. Некоторые животные не участвуют в исследовании из-за 5 неработоспособности сосудистой порт-системы или низкой исходной глюкозы.

Выборка для Humalog® составляет n = 17, выборка композиции I равна n = 17, выборка композиции J равна n = 16, выборка композиции K равна n = 15, выборка композиции L равна n = 16, а выборка композиции M равна n = 16.

5 Данные об уровне глюкозы в сыворотке представлены ниже в Таблице 8 в виде среднего (мг/дл) +/- SEM), если не указано иное.

10

Таблица 8.

Время (мин)	Humalog®		Композиция I		Композиция J		Композиция K		Композиция L		Композиция M	
	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	302,5	7,0	324,0	7,2	322,4	11,0	319,6	10,4	337,6	13,6	321,6	7,9
-20	310,7	7,8	330,7	7,6	330,3	10,3	324,5	12,1	345,3	13,8	325,4	7,6
0	321,9	8,6	338,5	9,3	340,1	11,9	335,9	11,7	357,0	15,7	332,2	8,9
5	335,6	9,4	353,8	9,2	356,9	12,6	346,2	12,0	371,2	15,7	346,4	9,2
10	340,3	9,8	347,0	9,6	356,7	11,7	337,7	14,4	365,6	16,5	339,2	11,8
15	326,6	9,7	315,6	10,9	340,1	10,7	306,5	13,7	339,0	17,3	302,4	13,4
30	276,6	17,6	264,1	17,9	271,9	15,5	240,0	15,4	274,7	23,1	244,0	20,6
45	241,2	22,9	220,2	20,2	237,5	14,4	197,9	20,8	226,7	26,8	195,1	22,6
60	202,1	26,0	186,9	21,5	192,9	17,8	160,3	21,4	195,9	27,5	157,9	23,6
75	182,5	27,2	159,9	22,1	155,7	19,8	140,9	21,2	171,4	28,1	136,8	22,7
90	158,0	27,4	141,2	23,9	133,0	19,2	119,5	21,5	153,2	27,4	122,0	21,1
105	142,7	25,2	127,1	23,2	118,0	19,8	105,3	19,8	132,6	25,6	115,9	20,3
120	122,8	23,6	115,8	21,6	98,7	18,5	94,5	17,3	121,8	24,8	99,3	18,6
150	107,9	21,6	101,3	18,2	72,5	15,7	82,8	14,3	110,3	21,7	87,6	17,1
180	90,4	17,1	98,6	18,2	66,4	11,9	79,2	11,2	101,8	20,4	88,2	15,4
240	83,4	14,5	96,5	16,8	72,0	8,0	97,1	11,8	111,2	22,2	98,3	14,3
360	86,0	18,6	96,1	13,3	122,2	16,5	149,5	19,8	156,8	21,2	125,4	20,4

Концентрации сывороточного инсулина и параметры ФК получали и анализировали в целом, как описано выше, и результаты ФК-анализа приведены в Таблице 9 ниже.

Таблица 9.

Композиция		Tmax (мин)	Раннее Мах. (мин)	$\frac{1}{2}$ Позднее Мах. (мин)	Диапазон (мин)	T50 (мин)
Humalog®	Среднее (SE)	60,0 (7,6)	22,9 (5,8)	152 (17)	129 (18)	107 (7)
I	Среднее (SE)	57,1 (9,5)	16,0 (3,5)	144 (16)	128 (17)	102 (5)
J	Среднее (SE)	55,3 (5,3)	13,7 (1,5)	139 (9)	125 (9)	96,8 (4,6)
K	Среднее (SE)	55,0 (6,2)	15,8 (2,2)	136 (10)	120 (11)	91,1 (4,8)
L	Среднее (SE)	50,0 (7,2)	13,2 (2,1)	121 (10)	108 (10)	90,7 (6,6)
M	Среднее (SE)	52,5 (7,4)	11,7 (1,5)	139 (18)	127 (18)	99,0 (7,4)

5 Это исследование подтверждает, что композиции по данному изобретению имеют улучшенное фармакокинетическое и/или фармакодинамическое время действия.

Инсулин лизпро объединенный с 10 мкг/мл трепростинила и 15 или 25 мМ цитрата

10 Исследование композиций, содержащих 10 мМ трепростинила и 15 или 25 мМ цитрата, проводили на кастрированных самцах миниатюрных свиней Юкатана, больных диабетом (индуцированным с помощью Alloxan) (средний возраст 33 месяца, средняя масса тела 49 кг) следуя, в основном, описанным выше процедурам.

15 Исследуемые препараты (композиции N и O в таблице ниже) формировали путем добавления указанных количеств цитрата, трепростинила, NaCl и MgCl₂ к флакону Humalog®. Как и в случае описанного выше исследования, необходимое количество трепростинила рассчитывалось, исходя из флакона 1 мг/мл Remodulin®, поэтому добавление трепростинила в тестовые композиции также приводит к
20 добавлению небольших количеств м-крезола, цитрата натрия и хлорид натрия, а

также небольшого разбавления эксципиентов Humalog®. Однако такие небольшие количества, как считается, не влияют на свойства композиций и, таким образом, не отражены в Таблице 10 ниже.

Таблица 10.

Название	Состав композиции
Композиция N	99,5 ед/мл инсулина лизпро 10 мкг/мл трепростинила 15 мМ цитрата 5 мМ MgCl ₂ 15 мМ NaCl 16 мг/мл глицерина
Композиция O	99,6 ед/мл инсулина лизпро 10 мкг/мл трепростинила 25 мМ цитрата 5 мМ MgCl ₂ 15 мМ NaCl 16 мг/мл глицерина
Humalog®	100 ед/мл КРВ 1,88 мг/мл двухосновного фосфата натрия 16 мг/мл глицерина 3,15 мг/мл м-крезола 0,3 мМ Zn рН 7,4

5 Исследование было проведено как полное кроссоверное исследование на 20 свиньях, в котором каждая свинья исследуется для каждого испытуемого препарата. Одно животное не участвовало в группе, на которой тестировалась композиция N из-за неработоспособности сосудистой порт-системы или низкой исходной глюкозы, размер выборки для этой группы составляет n = 19. Данные об
10 уровне глюкозы в сыворотке представлены ниже в Таблице 11 в виде среднего (мг/дл) +/- SEM), если не указано иное.

5

10

Таблица 11.

Время (мин)	Humalog®		Композиция N		Композиция O	
	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	323,8	8,4	336,3	9,4	323,3	9,2
-20	332,6	9,1	344,7	9,5	336,0	9,2
0	343,1	8,8	354,0	9,9	346,6	10,2
5	353,3	9,8	364,5	10,8	355,2	10,9
10	355,8	9,8	357,1	9,1	342,3	11,4
15	355,2	10,6	340,7	11,6	325,6	13,8
30	317,9	12,9	293,3	15,9	270,0	17,9
45	291,4	19,1	254,8	19,2	239,7	21,0
60	255,6	21,1	220,9	21,3	216,1	22,8
75	239,8	23,9	195,2	21,7	193,8	22,8
90	205,7	23,7	173,8	22,6	172,6	22,7
105	184,4	22,8	156,0	21,5	158,6	22,7
120	162,0	21,7	139,1	19,4	145,9	21,7
150	135,3	20,5	107,1	18,2	116,8	19,4
180	119,2	18,4	86,1	16,5	104,8	18,3
240	84,1	13,3	83,3	13,1	80,8	14,8
360	63,4	11,4	108,6	14,2	86,1	10,8

В совокупности описанные выше исследования подтверждают, что
15 композиции по данному изобретению имеют более быстрое фармакокинетическое

и/или фармакодинамическое действие, чем коммерческие препараты существующих аналогов инсулина.

Исследования Стабильности

5 Стабильность инсулина лизпро исследовалась при его объединении с диапазоном концентраций цитрата, трепростинила и других эксципиентов. Композиции типовых вариантов препаратов, показанные в таблице 12 ниже, получали путем объединения активного фармацевтического ингредиента инсулина лизпро с другими указанными наполнителями.

10

Таблица 12.

Название	Композиция
Композиция Р	100 ед/мл инсулина лизпро 15 мМ цитрата 10 мкг/мл трепростинила 0,65 мМ Zn 5 мМ MgCl ₂ 0,06% Полоксамера 188 3,15 мг/мл м-крезола 17,5 мМ глицерина рН 7,4
Препарат Q	100 ед/мл инсулина лизпро 20 мМ цитрата 10 мкг/мл трепростинила 0,65 мМ Zn 6,6 мМ MgCl ₂ 0,06% Полоксамера 188 3,15 мг/мл м-крезола 15,68 мМ глицерина рН 7,4

Название	Композиция
Препарат R	100 ед/мл инсулина лизпро 25 мМ цитрата 10 мкг/мл трепростинила 8,3 мМ MgCl ₂ 0,65 мМ Zn 0,06% Полоксамера 188 3,15 мг/мл м-крезола 13,82 мМ глицерина pH 7,4

Растворы фильтровались с использованием 50 мл вакуумного фильтра Steriflip с 0,22 мкМ мембраной PES (Cat #: SCGP00525, EMD Millipore, Billerica, MD) и распределялись в 10-миллилитровые флаконы с обжимными крышками или 3-мл стеклянные инсулиновые картриджи, затем инкубировались при температуре 4 °С и 30 °С соответственно. Образцы, хранимые при температуре 4 °С хранились без взбалтывания в течение 64 дней, а образцы, хранимые при температуре 30 °С инкубировались без взбалтывания в течение 36 дней с последующим имитируемым периодом использования в течение 28 дней. В моделировании использования контейнер переводрачивали, и образец извлекали из каждого флакона или картриджа три раза в день в течение 28 дней. Две выборки получали в каждый тестовый момент времени в дни до или после любой субботы, воскресенья или праздника. Из каждого пузырька извлекали аликвоты по 80 мкл с использованием инсулинового шприца Terumo U-100 (1/2 куб. см 27 G 1/2") и 30 мкл из каждого картриджа с использованием HumaPen Luxura HD с использованием иглы Comfort Point 6 мм (31 G x 1/4").

Образцы отбирали на 36 день (первый день периода использования при 30 °С), 50 день и 64 день для анализа с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) и аналитической размерной эксклюзионной хроматографии (SEC).

Все составы также оценивали в 3 мл стеклянных инсулиновых картриджах при 37 °С при встряхивании со скоростью ~100 об/мин. Эти условия должны указывать на стабильность в непрерывной подкожной инфузионной терапии инсулином. Конечные образцы при этих условиях анализировались с использованием ОФ-ВЭЖХ и SEC.

Анализ ОФ-ВЭЖХ проводится для оценки чистоты белка в каждом препарате в моменты времени стабильности с использованием УФ-детектора при 214 нм. Каждый образец (5 мкл) разделяли, используя колонку Zorbax 300SB-C18, Rapid Resolution 4.6 X 150 мм 3,5 мкм (часть № 863973-902) при температуре 40 °С со скоростью потока 0,6 мл/мин и подвижной фазой А (50 мМ сульфата, рН 2,3 + 20% ацетонитрила (об./об.)) и подвижной фазой В (50 мМ сульфата, рН 2,3 + 50% ацетонитрила (об./об.)). Градиент подвижной фазы В при 0, 3, 15, 21, 26, 27, 27,5 и 35,0 мин составляет 21, 25, 25, 30, 80, 80, 21 и 21% соответственно. Содержание инсулина рассчитывали с использованием ОФ-ВЭЖХ путем объединения основной площади пика инсулина и площади А21, а затем деления на стандарт инсулина лизпро. Потери инсулина для образцов препарата по сравнению с контролем Humalog® составляют менее 5% для всех образцов до 64 дней при температуре 4 °С и 30 °С. Процентное содержание образца вне основного пика с А21 рассчитывается путем деления основной площади пика на общую площадь пика и вычитания этой области и А21 из 100. Процент за пределами площади основного пика составляет менее 1,76% для всех образцов при температуре 4 °С в течение 64 дней и менее 2,48% для всех образцов при температуре 30 °С в течение 64 дней.

Для анализа SEC каждый образец (5 мкл) разделяли, используя колонку Serax Zenix-C SEC-80, 7,8 × 300 мм, 3 мкм (каталог# 233080-7830) при температуре 5 °С и скорости потока 1,0 мл/мин с изократическим элюированием подвижной фазы (0,1% TFA, 50% ACN) в течение 25 минут.

Процент высокомолекулярного полимера (% HMWP) рассчитывается путем объединения общей процентной площади всех пиков, элюирующих до основного пика. Результаты (% HMWP) приведены в таблицах ниже. Группа HMWP составляет менее 1% для всех образцов до 64 дней при температуре 4 °С и 30 °С, а образование HMWP в цитратсодержащих образцах сопоставимо с образованием HMWP в контрольных образцах Humalog®.

Таблица 13. Флаконы, хранящиеся при температуре 4 °С: содержание инсулина, ед/мл.

Композиция	День 36	День 50	День 64
------------	---------	---------	---------

P	100,07	99,89	99,36
Q	100,06	99,88	99,38
R	100,03	99,85	99,29

Таблица 14. Флаконы хранящиеся при температуре 4 °С: другие связанные вещества, процент.

Композиция	День 36	День 50	День 64
P	0,92	1,05	1,17
Q	0,93	1,07	1,12
R	0,96	1,09	1,32

Таблица 15. Флаконы, хранящиеся при температуре 4 °С: высокомолекулярные полимеры, процент.

Композиция	День 36	День 50	День 64
P	0,17	0,19	0,21
Q	0,16	0,20	0,22
R	0,16	0,20	0,21

5 **Таблица 16.** Флаконы хранящиеся при температуре 30 °С: содержание инсулина, ед/мл.

Композиция	День 36	День 50	День 64
P	98,77	98,60	98,47
Q	98,67	98,50	98,46
R	98,82	98,65	98,46

Таблица 17. Флаконы хранящиеся при температуре 30 °С: другие связанные вещества, процент.

Композиция	День 36	День 50	День 64
P	1,23	1,40	1,53
Q	1,33	1,50	1,54
R	1,18	1,35	1,54

Таблица 18. Флаконы, хранящиеся при температуре 30 °С: высокомолекулярные полимеры, процент.

10

Композиция	День 36	День 50	День 64
P	0,33	0,41	0,46
Q	0,29	0,39	0,43
R	0,29	0,38	0,43

Таблица 19. Картриджи объемом 3 мл, хранящиеся в течение 14 дней при температуре 37 °С при встряхивании.

Композиция	%НМВ	ед/мл	%Другие Связанные Вещества
P	0,33	98,24	1,32
Q	0,34	97,88	1,54
R	0,30	97,66	1,59

Проводилось дополнительное исследование стабильности, в котором композиции, содержащие инсулин лизпро и различные концентрации цитрата, трепростинила, цинка и других эксципиентов, подвергаются различным условиям. Готовили 24 цитратсодержащих препарата и две контрольные композиции, которые не содержат цитрат. Концентрации цитрата, хлорида магния, Zn, общего хлорида, трепростинила и полоксамера в композициях указаны в Таблице 20 ниже.

Таблица 20. Тестируемые Препараты

№.	Цитрат (мМ)	MgCl ₂ (мМ)	Общий Zn (мМ)	Общий Хлорид (мМ)	Трепростинил (мкг/мл)	Полоксамера 188%
S	0	0	0,3	10	0	0
T	0	0	0,3	20	0	0
U	12	2,5	0,4	10	2	0
V	12	2,5	0,8	13	0	0
X	12	7,5	0,4	20	0	0
Y	12	7,5	0,8	23	2	0
Z	15	5	0,6	20	1	0
AA	18	2,5	0,4	10	0	0
BB	18	2,5	0,8	13	2	0
CC	18	7,5	0,4	20	2	0
DD	18	7,5	0,8	23	0	0
EE	15	5	0,6	16	1	0,045
FF	15	5	0,6	16	1	0,045
GG	15	5	0,6	25	1	0,045
HH	15	5	0,6	30	1	0,045
II	15	5	0,6	50	1	0,045
JJ	15	5	0,6	100	1	0,045
KK	15	5	0,6	20	1	0,06
LL	12	2,5	0,4	10	0	0,09
MM	12	2,5	0,8	13	2	0,09
NN	12	7,5	0,4	20	2	0,09
OO	12	7,5	0,8	23	0	0,090

PP	18	2,5	0,4	10	2	0,09
QQ	18	2,5	0,8	13	0	0,09
RR	18	7,5	0,4	20	0	0,090
SS	18	7,5	0,8	23	2	0,090

Для приготовления композиций был приготовлен концентрированный стоковый раствор lispro, содержащий 200 единиц инсулина лизпро на мл, 24,2 мг глицерина на мл, 6,30 мг метакрезол на мл и 0,6 мМ цинка в воде для объемных стерильных операций. рН Этого исходный раствор доводят с помощью хлористоводородной кислоты для растворения инсулина лизпро и затем доводят до рН 7,40 с помощью гидроксида натрия.

10 Препараты, содержащие цитрат, получали путем разбавления концентрата lispro с соответствующими объемами стоковых растворов наполнителя: цитрата натрия, хлорида магния, оксида цинка, трепростинила и полоксамера 188. Для достижения целевого содержания хлорида в некоторые препараты добавляют исходный раствор хлорида натрия. рН раствора доводили до 7,30 - 7,50 с помощью хлористоводородной кислоты или гидроксида натрия с последующим добавлением воды для объемных стерильных операций.

15 Нецитратные препараты получали путем разбавления концентрата lispro соответствующими объемами воды для объемных стерильных операций или водой для объемных стерильных операций и раствором хлорида натрия. рН раствора доводили до 7,30 - 7,50 с помощью хлористоводородной кислоты или гидроксида натрия с последующим добавлением воды для объемных стерильных операций.

20 Препараты стерильно фильтровали, а затем распределяли по объему в 10 мл стеклянные флаконы объемом 10,3 мл, закупоривали и обжимали. На каждую порцию заполняли двадцать флаконов.

Исследование включает в себя выдерживание флаконов каждой композиции при одном из трех вариантов различных условий, как описано ниже.

25 **Таблица 21.**

Условия	Описание
Контроль (n = 5)	Статическое хранение в вертикальном положении при температуре 5 °С в течение 39 дней
Тепловой стресс (n = 5)	Сокращенное моделирование транспортировочного стресса, за которым следует

	статическое хранение в вертикальном положении при температуре 30 °С в течение 32 дней
Кумулятивный стресс (n = 5)	Сокращенное моделирование транспортировочного стресса, за которым следует моделирование использования пациентом при вертикальном хранении при температуре 32 °С между моделируемыми приемами препарата.

Как указано в приведенной выше таблице, условия термического стресса и кумулятивного стресса включают в себя сначала выдерживание флаконов в условиях сокращенного моделируемого транспортировочного стресса, который выполняется, как описано в процедуре 3А (2008) Международной организации International Safe Transit Association (ISTA). Для условий термического стресса флаконы затем помещаются в статическое вертикальное хранилище при температуре 30 °С. Для условия кумулятивного стресса флаконы затем подвергаются симуляции использования пациентом. Симуляцию использования пациентом можно применить следующим образом: набрать 8 единиц воздуха в любой шприц для инсулина, вставить иглу во флакон, в то время как флакон находится в вертикальном положении, гарантируя, что наконечник иглы не касается раствора инсулина, ввести воздух в флакон, перевернуть флакон и шприц, набрать 8 единиц раствора препарата, убрать пузырьки воздуха в шприце, медленно перемещая плунжер, чтобы вытолкнуть пузырь обратно в флакон (при необходимости повторить) и отрегулировать плунжер шприца, чтобы конечная дозировка составляла 8 единиц, убрать шприц и поместить флакон обратно в термостат при температуре 30 °С. Этот процесс повторяется в количестве трех доз в день в течение 32 дней. В то время, когда они не используются, флаконы хранятся в вертикальном положении при температуре 30 °С.

Химическую стабильность тестируют методом эксклюзионной хроматографии (SEC) и ВЭЖХ с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ). Анализ ОФ-ВЭЖХ проводится для оценки чистоты белка в каждом препарате с использованием УФ-детектора при 214 нм. Каждый образец (5 мкл) разделяли с использованием колонки Halo Peptide ES-C18, 4.6 X 150 мм 2.7-Micron (часть 92124-702) при температуре 40 °С со скоростью потока 1,0 мл/мин и подвижной фазой А (50 мМ сульфат, рН 2,3 + 20% ацетонитрил (об./об.)) и подвижной фазой В

(50 мМ сульфат, рН 2,3 + 50% ацетонитрил (об./об.)). Градиент подвижной фазы В в момент времени 0, 2, 17, 22, 25, 29, 29,5 и 35 минут составляет 25, 25, 27, 40, 90, 90, 25 и 25% соответственно. Содержание инсулина рассчитывают путем объединения площадей основного пика инсулина и пика В3, а затем деления на стандарт инсулина лизпро. Для анализа SEC каждый образец (50 мкл) разделяли, используя колонку Serax Zenix-C SEC-80, 7,8 × 300 мм, 3 мкм (каталог# 233080-7830) при температуре 5 °С и скорости потока 1,0 мл/мин с изократическим элюированием подвижной фазы (0,1% TFA, 50% ACN) в течение 25 минут. Процент высокомолекулярного полимера (% HMWP) рассчитывается путем объединения общей процентной площади всех пиков, элюирующих до основного пика. По одному флакону препаратов РР и QQ, подверженных кумулятивным стрессовым состояниям, не могли быть использованы из-за образования частиц. Все другие флаконы были протестированы, и все полученные результаты находились в соответствии с критериями приемлемости приема инсулина лизпро для обеих соучаев (95 - 105 ед/мл) и HMWP (NMT 1,5%).

Физическую стабильность оценивают визуальным тестированием, в котором образцы проверяются визуально. Образцы оцениваются как Стабильные, если они прозрачны, бесцветны и не содержат никаких видимых частиц. Все образцы всех препаратов проходят визуальное тестирование во все тестируемые моменты времени в условиях контроля и термического стресса. Результаты визуального тестирования для условий кумулятивного стресса приведены в Таблице 22 ниже.

Таблица 22.

Препарат	21 День (n = 5)	24 Дня (n = 5)	28 Дней (n = 5)	32 Дня (n = 5)
S	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно
T	100% Стабильно	100% Стабильно	80% Стабильно	100% Стабильно
U	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно
V	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно
X	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно
Y	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно

Z	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно
AA	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно
BB	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно
CC	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно
DD	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно
EE	100% Стабильно	100% Стабильно	40% Стабильно	0% Стабильно
FF	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	0% Стабильно
GG	100% Стабильно	80% Стабильно	0% Стабильно	0% Стабильно
HH	100% Стабильно	100% Стабильно	0% Стабильно	0% Стабильно
II	100% Стабильно	100% Стабильно	0% Стабильно	0% Стабильно
JJ	100% Стабильно	100% Стабильно	0% Стабильно	0% Стабильно
KK	100% Стабильно	100% Стабильно	0% Стабильно	0% Стабильно
LL	60% Стабильно	60% Стабильно	40% Стабильно	0% Стабильно
MM	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	20% Стабильно
NN	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	80% Стабильно
OO	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно
PP	20% Стабильно	0% Стабильно	0% Стабильно	0% Стабильно
QQ	80% Стабильно	80% Стабильно	20% Стабильно	0% Стабильно
RR	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	0% Стабильно
SS	100% Стабильно	100% Стабильно	100% Стабильно	0% Стабильно

Все флаконы препаратов U, V, X, Y, Z, AA, BB, CC DD и OO проходили кумулятивное стресс-тестирование после 32 дня моделируемого использования пациентом. Все флаконы с препаратами FF, MM, NN, RR и SS проходят кумулятивный стресс-тест после 28-го дня. Все флаконы препаратов EE, HH, II, JJ и

КК проходят тест после 24 дня. Все флаконы с препаратом GG проходят тест после 21 дня.

5 Описанные выше исследования подтверждают, что композиции являются химически и физически стабильными в условиях охлаждения и термического воздействия и что некоторые композиции данного изобретения достаточно стабильны для коммерческого использования даже при моделировании их использования после 32 дней.

Последовательности

Цепь А человеческого инсулина

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

5

Цепь В человеческого инсулина

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 № 2).

10 Цепь В 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 № 3).

Цепь В инсулина аспарт

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 № 4).

Цепь В инсулина glulisine

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

25

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, которая содержит:
 - а. инсулин;
 - б. цитрат, в концентрации от около 5 до около 25 мМ;
 - 5 в. трепростинил, в концентрации от около 0,04 до около 20 мкг/мл;
 - г. цинк, в концентрации, достаточной для обеспечения по меньшей мере 2 ионов цинка на шесть молекул инсулина;
 - д. консервант; а также
 - е. один или несколько дополнительных стабилизирующих агентов;
- 10 и имеет рН от около 7,0 до около 7,8 при комнатной температуре.
2. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что концентрация цинка составляет от около 0,2 до около 2 мМ.
3. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-2, отличающаяся тем, что концентрация цинка составляет от около 0,2 до около 1 мМ.
- 15 4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что концентрация цинка составляет от около 0,6 до около 0,8 мМ.
5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что один или несколько дополнительных стабилизирующих агентов выбраны из группы, состоящей из поверхностно-активного вещества, хлорида магния и
- 20 хлориданатрия.
6. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что один или несколько дополнительных стабилизирующих агентов содержат магний.
7. Фармацевтическая композиция по п. 6, отличающаяся тем, что магний
- 25 присутствует в концентрации, приводящей к молярному соотношению магния к цитрату от около 1:2 до около 1:10.
8. Фармацевтическая композиция по п. 7, отличающаяся тем, что молярное соотношение магния к цитрату составляет от около 1:3 до около 1:5.
9. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 7-8, отличающаяся тем, что
- 30 магний предложен в виде хлорида магния.
10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что концентрация инсулина составляет от около 100 до около 300 ед/мл.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что концентрация инсулина составляет около 100 ед/мл или около 200 ед/мл.
12. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-11, отличающаяся тем, что инсулин представляет собой инсулин лизпро.
- 5 13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что концентрация цитрата составляет от около 10 до около 25 мМ.
14. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что концентрация трепростинила составляет от около 0,04 до около 10 мкг/мл.
15. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что
10 концентрация трепростинила составляет от около 0,5 до около 2 мкг/мл.
16. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что консервантом является м-крезол.
17. Фармацевтическая композиция по п. 16, отличающаяся тем, что концентрация м-крезола составляет от около 2,5 до около 3,8 мг/мл.
- 15 18. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что один или несколько дополнительных стабилизирующих агентов содержат хлорид натрия.
19. Фармацевтическая композиция по п. 18, отличающаяся тем, что хлорид натрия присутствует в концентрации от около 1 до около 50 мМ.
- 20 20. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-19, отличающаяся тем, что общая концентрация хлорида составляет от около 10 до около 50 мМ.
21. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-20, отличающаяся тем, что дополнительно содержит агент тоничности.
22. Фармацевтическая композиция по п. 21, отличающаяся тем, что агент
25 тоничности представляет собой глицерин.
23. Фармацевтическая композиция по п. 22, отличающаяся тем, что концентрация глицерина составляет от около 1 до около 15 мг/мл.
24. Фармацевтическая композиция, которая содержит:
 - а. инсулин лизпро в концентрации от около 100 до около 200 ед/мл;
 - 30 б. цитрат в концентрации от около 5 до около 25 мМ;
 - в. трепростинил в концентрации от около 0,5 до около 2 мкг/мл; и
 - г. цинк, в концентрации от около 0,2 мМ до около 2 мМ.

25. Фармацевтическая композиция по п. 24, отличающаяся тем, что концентрация цитрата составляет от около 15 до около 25 мМ.
26. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 24-25, отличающаяся тем, что концентрация цинка составляет от около 0,6 до около 0,9 мМ.
- 5 27. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 24-26, отличающаяся тем, что дополнительно содержит магний в концентрации, приводящей к молярному соотношению магния к цитрату от около 1:3 до около 1:5.
28. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-27, отличающаяся тем, что имеет рН около 7,4.
- 10 29. Фармацевтическая композиция по п. 24, отличающаяся тем, что:
- а. инсулин лизпро содержится в концентрации около 100 ед/мл;
 - б. цитрат содержится в концентрации около 15 мМ;
 - в. трепростинил содержится в концентрации около 1 мкг/мл; а также
 - г. цинк содержится в концентрации около 0,6 мМ;
- 15 и дополнительно содержит:
- д. хлорид магния в концентрации около 5 мМ;
 - е. м-крезол в концентрации около 3,15 мг/мл;
 - ж. глицерин в концентрации около 12 мг/мл;
- и имеет рН около 7,4.
- 20 30. Фармацевтическая композиция по п. 24, отличающаяся тем, что:
- а. инсулин лизпро содержится в концентрации около 200 ед/мл;
 - б. цитрат содержится в концентрации около 15 мМ;
 - в. трепростинил содержится в концентрации около 1 мкг/мл; а также
 - г. цинк содержится в концентрации около 0,8 мМ;
- 25 и дополнительно содержит:
- д. хлорид магния в концентрации около 5 мМ;
 - е. м-крезол в концентрации около 3,15 мг/мл; и
 - ж. глицерин в концентрации около 12 мг/мл;
- и имеет рН около 7,4.
- 30 31. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-30, отличающаяся тем, что композиция обеспечивает поглощение инсулина в кровь, которое по меньшей

мере на 20% быстрее по сравнению с композициями, которые содержат тот же инсулин, но не содержат цитрат и трепростинил.

- 5 32. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-30, отличающаяся тем, что композиция стабильна для обеспечения хранения по меньшей мере в течение 24 месяцев при температуре 2-8 °С и до 28 дней при использовании при температурах до 30 °С.
33. Способ лечения диабета, включающий введение человеку, нуждающемуся в этом, эффективной дозы фармацевтической композиции по любому из пп. 1-32.
- 10 34. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-32 для применения в терапии.
35. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-32 для применения при лечении диабета.
36. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 1-32 при изготовлении лекарственного средства для лечения диабета.
- 15 37. Изделие, содержащее любую из фармацевтических композиций по п. 1-32.
38. Изделие по п. 37, отличающееся тем, что представляет собой флакон многократного использования.
39. Изделие по п. 37, отличающееся тем, что представляет собой картридж многократного использования.
- 20 40. Изделие по п. 37, отличающееся тем, что является ручкой-инжектором многократного использования.
41. Изделие по п. 37, отличающееся тем, что является ручкой-инжектором однократного использования.
42. Изделие по п. 37, отличающееся тем, что является помпой для непрерывной 25 подкожной инсулиновой инфузионной терапии.
43. Изделие по п. 37, отличающееся тем, что представляет собой емкость для использования в помпе для непрерывной подкожной инсулиновой инфузионной терапии.