



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0025119

(51)⁷ A61P 3/10; A61K 31/5585; A61K 38/28 (13) B

-
- (21) 1-2016-04232 (22) 04/05/2015
(86) PCT/US2015/029010 04/05/2015 (87) WO2015/171484 12/11/2015
(30) 61/990,402 08/05/2014 US
(45) 25/08/2020 389 (43) 25/01/2017 346A
(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America
(72) CHRISTE, Michael Edward (US); HARDY, Thomas Andrew (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

(54) DƯỢC PHẨM TÁC DỤNG NHANH CHỨA INSULIN VÀ VẬT PHẨM CHỨA
DƯỢC PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa insulin người hoặc chất tương tự insulin mà bao gồm treprostinil và có tác dụng dược động học nhanh hơn so với các chế phẩm thương mại của các sản phẩm tương tự insulin hiện có. Sáng chế cũng đề cập đến vật phẩm sản xuất chứa dược phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa insulin để sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường để chống lại sự lệch lạc trong mức glucoza huyết sau bữa ăn và điều trị cấp chứng tăng đường huyết. Dược phẩm này chứa insulin người hoặc chất tương tự insulin và treprostini. Dược phẩm này có tốc độ hấp thu insulin từ vị trí tiêm nhanh hơn so với các dược phẩm chứa insulin có bán trên thị trường, và đủ ổn định để bảo quản trong thời gian dài. Dược phẩm này hữu dụng để tạo ra hoạt tính insulin trong bữa ăn hoặc điều trị cấp chứng tăng đường huyết khi cần insulin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Profin tác dụng theo thời gian của insulin là quan trọng để kiểm soát mức glucoza huyết sau ăn. Ở các cá thể khỏe mạnh, tuyến tụy tiết ra nhiều insulin để đáp ứng với thức ăn được hấp thu, điều này dẫn đến mức insulin huyết tăng trong vài phút. Ở các cá thể mắc bệnh tiểu đường typ 1 và ở các cá thể nhất định mắc bệnh tiểu đường typ 2, cần phải sử dụng insulin. Tuy nhiên, insulin được sử dụng đi vào máu chậm. Sự khởi đầu quá chậm và sự giải phóng không đủ insulin khi bắt đầu bữa ăn dẫn đến chứng tăng đường huyết sau bữa ăn. Thời gian tác dụng quá dài và insulin dư thừa giữa các bữa ăn gây ra chứng hạ đường huyết sau ăn và có thể góp phần làm tăng cân.

Đã có những nỗ lực làm giảm tác dụng theo thời gian của các sản phẩm insulin. Những nỗ lực trước đây để phát triển các sản phẩm như vậy bao gồm sự phát triển các chất tương tự insulin “tác dụng nhanh” mới, như insulin lispro (HUMALOG®) và insulin aspart (NOVOLOG®), mà đạt được tác dụng nhanh thông qua các thay đổi về trình tự axit amin từ trình tự các chuỗi axit amin amin trong insulin người. Một chất tương tự khác, insulin glulisin (APIDRA®), thiếu kẽm và không tạo ra các hexamer ổn định. APIDRA® do đó cần chất làm ổn định bổ sung, polysorbat 20. Các chất tương tự insulin tác dụng nhanh có bán từ những năm 1990 và đầu những năm 2000. Ngay cả với các chất gọi là chất tương tự insulin tác dụng nhanh, không đạt được mức insulin tối đa cho đến 50-90 phút sau khi tiêm. Mức này chậm hơn so với insulin được giải phóng bởi tuyến tụy có chức năng bình thường và không phải lúc nào cũng phù hợp với profin hấp thu hydrat cacbon.

Cách khác để đạt được tác dụng nhanh đã được khám phá là tìm kiếm những thành phần cải thiện profin tác dụng theo thời gian của insulin khi được cấp cùng với insulin. Ví dụ, vào những năm 1980 đã có tuyên bố rằng prostaglandin E₁ đẩy nhanh sự hấp thu insulin khi được dùng kết hợp với insulin. Williams, *et al.*, 1 Diabetic Med. 109-13 (1984). Tuy nhiên, prostaglandin E₁ không ổn định về mặt hóa học, chỉ tan ở mức tối thiểu trong nước, và nhanh chóng bị chuyển hóa, đây là các đặc điểm không mong muốn để sử dụng trong chế phẩm insulin. Một tác nhân khác được tuyên bố là đẩy nhanh sự hấp thu insulin là chất ức chế proteaza aprotinin, nhưng aprotinin không thích hợp để sử dụng lặp lại nhiều lần do khả năng gây ra các phản ứng miễn dịch của nó. D.R. Owens, *et al.*, 25 Br. J. Clin. Pharmac. 453-456 (1988). Gần đây hơn, đã có tuyên bố rằng có thể đạt được sự khởi đầu tác dụng nhanh hơn so với các liệu pháp insulin đã có bằng cách bổ sung hợp chất nicotin, như nicotinamit, và axit amin arginin, và tùy ý axit glutamic. Xem Patent Mỹ số 8,324,157.

Tuy nhiên, vẫn còn nhu cầu về chế phẩm insulin, được dự định để sử dụng khi ăn, mà: có khả năng hấp thu insulin từ vị trí tiêm nhanh hơn và sự khởi đầu tác dụng nhanh hơn so với các sản phẩm insulin đã có; ổn định về mặt hóa học và vật lý trong quá trình bảo quản lâu dài để giảm thiểu các nguy cơ về an toàn và đảm bảo sự chính xác và hiệu lực của liều; không gây đau đến mức không chấp nhận được ở vị trí tiêm; và/hoặc đòi hỏi số thành phần và/hoặc tá dược ở mức tối thiểu để đạt được cải thiện về tác dụng theo thời gian trong khi vẫn đủ ổn định.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế hướng đến việc cung cấp các chế phẩm đáp ứng được những nhu cầu này. Cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa insulin và treprostiniol mà có khả năng hấp thu insulin vào máu nhanh hơn. Chế phẩm theo sáng chế cũng tạo ra sự khởi phát tác dụng và/hoặc sự hấp thu nhanh hơn so với các sản phẩm insulin hiện có bán trên thị trường. Ngoài ra, các chế phẩm theo sáng chế đủ ổn định. Ngoài ra, việc sử dụng các chế phẩm theo sáng chế không gây đau ở mức không chấp nhận được tại vị trí tiêm. Các chế phẩm theo sáng chế đạt được những hiệu quả này trong khi dùng với số lượng thành phần bổ sung ở mức tối thiểu.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa insulin và treprostiniol.

Theo một phương án, insulin được chọn từ nhóm gồm insulin người, hoặc biến thể cấu trúc, thể đột biến, hoặc chất tương tự tác dụng nhanh của insulin người, như insulin lispro, insulin aspart và insulin glulisin. Theo một phương án được ưu tiên, insulin là insulin lispro. Theo một phương án, nồng độ insulin lispro từ khoảng 40 đến khoảng 500 IU/mL. Tốt hơn, nếu nồng độ insulin lispro là 100 IU/mL hoặc 200 IU/mL.

Lượng treprostinil trong chế phẩm phải đủ để dẫn đến sự khởi đầu tác dụng và/hoặc hấp thu nhanh hơn so với của chế phẩm insulin không chứa treprostinil. Nồng độ treprostinil được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 đến khoảng 30 μM , cụ thể là từ khoảng 0,05 đến khoảng 26 μM , từ khoảng 0,05 đến 0,3 μM , từ khoảng 0,1 đến 0,5 μM , từ khoảng 0,3 đến 1,5 μM , từ khoảng 0,5 đến 5,1 μM , từ khoảng 1,5 đến 5,9 μM , từ khoảng 5,1 đến 128 μM , từ khoảng 5,9 đến 20 μM , từ khoảng 12,8 đến 24 μM , từ khoảng 20 đến khoảng 26 μM , hoặc từ khoảng 26 đến 30 μM , cụ thể là khoảng 0,05, 0,1, 0,3, 0,5, 1,5, 5,1, 5,9, 12,8, 20, 24 hoặc 26 μM . Insulin và treprostinil có mặt ở dạng chế phẩm phối hợp liều cố định.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm này chứa một hoặc nhiều chất bảo quản. Theo một phương án được ưu tiên, một hoặc nhiều chất bảo quản được chọn từ nhóm gồm phenol, meta-cresol, và rượu benzylic. Tốt hơn, nếu chất bảo quản là meta-cresol. Theo một phương án, nồng độ meta-cresol từ khoảng 2,5 mg/mL đến khoảng 3,8 mg/mL. Tốt hơn, nếu nồng độ meta-cresol là khoảng 3,15 mg/mL.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm này chứa chất tạo trương lực. Theo một phương án, chất tạo trương lực được chọn từ nhóm gồm glyxerol và natri clorua. Theo một phương án được ưu tiên, chất tạo trương lực là glyxerol. Theo một phương án được ưu tiên khác, nồng độ glyxerol từ khoảng 5 đến khoảng 20 mg/mL. Tốt hơn, nếu nồng độ glyxerol là khoảng 16 mg/mL.

Theo một phương án, chế phẩm này có thể chứa thêm một hoặc nhiều chất ổn định. Theo một phương án được ưu tiên, một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm gồm kẽm, natri clorua, canxi clorua, và arginin. Tốt hơn, nếu chất làm ổn định là kẽm. Kẽm oxit có thể được cung cấp trong chế phẩm với lượng đủ để tạo ra số nguyên tử kẽm mong muốn. Chế phẩm theo các phương án nhất định của sáng chế

chứa kẽm với tỷ lệ khoảng 2-4 nguyên tử kẽm trên sáu phân tử insulin. Các chế phẩm được ưu tiên nhất định sẽ có khoảng 2,5-3,5 nguyên tử kẽm trên sáu phân tử insulin. Theo các phương án nhất định, nồng độ kẽm từ khoảng 0,00525 mg/mL đến khoảng 0,131 mg/mL. Tốt hơn, nếu khi nồng độ insulin là khoảng 100 IU/mL, thì nồng độ kẽm là khoảng 0,0197 mg/mL.

Theo một phương án, chế phẩm này còn có thể chứa thêm chất đệm. Theo các phương án nhất định, chất đệm được chọn từ nhóm gồm các chất đệm phosphat, như natri phosphat dibazơ, TRIS (2-amino-2-hydroxymetyl-propan-1,3-diol; Trometamin) hoặc natri axetat. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, chất đệm là phosphat hoặc TRIS.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, độ pH của chế phẩm từ khoảng 7,0 đến khoảng 7,8. Tốt hơn, nếu độ pH là khoảng 7,4.

Theo một phương án, chế phẩm này chứa insulin lispro với nồng độ từ khoảng 40 đến khoảng 500 IU/mL, treprostinil với nồng độ từ khoảng 0,01 đến khoảng 30 μ M, meta-cresol với nồng độ từ khoảng 2,5 đến khoảng 3,8 mg/mL, glyxerol với nồng độ từ khoảng 5 đến khoảng 20 mg/mL, kẽm với nồng độ từ khoảng 0,00525 đến khoảng 0,131 mg/mL, và độ pH của chế phẩm từ khoảng 7,0 đến khoảng 7,8. Theo một phương án được ưu tiên, nồng độ insulin là khoảng 100 IU/mL, nồng độ treprostinil từ khoảng 0,05 đến khoảng 26 μ M, nồng độ kẽm là khoảng 0,0197 mg/mL, nồng độ meta-cresol là khoảng 3,15 mg/mL, nồng độ glyxerol là khoảng 16 mg/mL, và độ pH của chế phẩm là khoảng 7,4.

Bản mô tả bộc lộ phương pháp điều trị bệnh tiểu đường bao gồm bước cho người cần điều trị sử dụng liều hữu hiệu chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm nêu trên.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm nêu trên để sử dụng làm thuốc. Theo một phương án, việc sử dụng chế phẩm là sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường. Bản mô tả cũng bộc lộ việc sử dụng chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm nêu trên để sản xuất thuốc để điều trị bệnh tiểu đường.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất vật phẩm sản xuất chứa chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm nêu trên. Theo một phương án, vật phẩm sản xuất là lọ dùng nhiều lần. Theo một phương án khác, vật phẩm sản xuất là bút tiêm tái sử dụng được.

Theo một phương án khác, vật phẩm sản xuất là dụng cụ bơm để điều trị truyền liên tục insulin dưới da.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất insulin để sử dụng kết hợp với treprostinil. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất treprostinil để sử dụng kết hợp với insulin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Profin khởi đầu của tác dụng và/hoặc sự hấp thu sản phẩm insulin có thể được xác định theo nhiều cách. Chẳng hạn, nồng độ insulin trong huyết thanh có thể xác định được bằng cách tính toán các thông số dược động học liên quan đến tác dụng theo thời gian, như thời gian để đạt nồng độ insulin tối đa (Tmax), cũng như nồng độ insulin tối đa (Cmax), và thời gian để phơi nhiễm insulin hoàn toàn, đo được dưới dạng tổng diện tích dưới đường cong nồng độ insulin từ 0 đến vô cùng (AUCinf). Tương tự, tốc độ truyền glucoza (glucose infusion rate - GIR) cần để duy trì nồng độ glucoza bình thường trong huyết thanh sau khi sử dụng là số đo trực tiếp tác dụng dược lực học của insulin. Sáng chế đề xuất sự hấp thu insulin vào máu nhanh hơn và/hoặc sự khởi đầu tác dụng nhanh hơn so với các sản phẩm insulin có bán trên thị trường như được phản ánh, chẳng hạn, qua Tmax ngắn hơn, thời gian để đạt 50% Cmax ngắn hơn (50% Tmax sớm), thời gian để 50% Cmax được thanh thải ngắn hơn (50% Tmax muộn), thời gian để đạt 10%, 20% hoặc 50% AUCinf ngắn hơn, thời gian để đạt GIR tối đa hoặc 50% GIR tối đa ngắn hơn, và/hoặc các thông số dược động học và/hoặc dược lực học khác mà phản ánh khả năng hấp thu hoặc tác dụng nhanh hơn của insulin.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chế phẩm” chỉ chế phẩm phối hợp insulin và treprostinil liều cố định, trong đó insulin, treprostinil, và các thành phần hoặc tá dược bất kỳ khác, được kết hợp trong một dạng bào chế phối hợp duy nhất.

Như được sử dụng ở đây, “insulin” chỉ insulin người hoặc biến thể cấu trúc, thể đột biến, hoặc chất tương tự tác dụng nhanh của insulin người mà có hoạt tính chức năng của insulin người nhưng khởi đầu tác dụng nhanh hơn. Các chất tương tự tác dụng nhanh cụ thể của insulin người là insulin lispro, insulin aspart, và insulin glulisin. Insulin dùng trong các sản phẩm thương mại có thể được sản xuất bằng các phương pháp ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách tổng hợp hóa học. Các phương pháp tái tổ hợp là

đã biết rõ và rất được ưu tiên. Phân tử insulin người (CAS No. 11061-68-0) gồm hai chuỗi axit amin, A và B, trình tự của chúng là đã biết rõ.

Chuỗi A của insulin người có trình tự axit amin như sau:

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

Chuỗi B của insulin người có trình tự axit amin như sau:

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

Các chuỗi này được nối bằng hai liên kết disulfua: CysA7-CysB7 và CysA20-CysB19. Chuỗi A có một liên kết disulfua nội chuỗi ở CysA6-CysA11. Insulin người có công thức thực nghiệm $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ và phân tử lượng là 5808.

Insulin lispro (đôi khi gọi là KPB), được chất trong HUMALOG®, giống với insulin người ở trình tự axit amin chính của nó trừ sự đảo ngược trình tự prolin-lysin tự nhiên trên chuỗi B ở các vị trí 28 và 29 (insulin người 28^B-L-Lysin-29^B-L-prolin). Insulin lispro (CAS No. 133107-64-9) đã thể hiện là có hiệu lực ngang bằng với insulin người trên cơ sở phân tử gam nhưng hiệu quả của nó sau khi tiêm dưới da là nhanh hơn và trong khoảng thời gian ngắn hơn so với của insulin người hòa tan được tiêm. HUMALOG® chứa m-cresol làm chất bảo quản và chất làm ổn định, chất tạo trương lực (glycerin), chất đệm (natri phosphat dibazo), chất làm ổn định (kẽm oxit) và điều chỉnh độ pH cho chất dẫn.

Phân tử insulin lispro gồm chuỗi A của insulin người (SEQ ID NO. 1) được liên kết ngang với chuỗi B của insulin lispro, trình tự axit amin của nó được đưa ra trong SEQ ID NO: 3, dưới đây:

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

Công thức hóa học của insulin lispro là $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ và phân tử lượng của nó là khoảng 5808. Một đơn vị insulin lispro tương đương với 0,0347 mg insulin lispro.

Insulin aspart (CAS No. 116094-23-6), được chất trong NOVOLOG®, là một chất tương tự insulin khởi đầu nhanh khác. Cấu trúc của nó gồm chuỗi A của insulin

người (SEQ ID NO: 1) và chuỗi B trong đó Pro ở vị trí B28 được thay bằng Asp (insulin người Pro-B28-Asp), như theo trình tự axit amin sau:

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

Insulin aspart (insulin người 28^B axit aspartic) có công thức thực nghiệm C₂₅₆H₃₈₁N₆₅O₇₉S₆ và phân tử lượng khoảng 5826. Một đơn vị insulin aspart tương ứng với 6 nmol, tương ứng với 0,035 mg insulin aspart khan không chứa muối.

Insulin glulisin (CAS No. 207748-29-6), được chất trong APIDRA®, là một chất tương tự insulin khởi đầu nhanh khác nữa. Phân tử insulin glulisin gồm chuỗi A của insulin người (SEQ ID NO. 1) và chuỗi B cải biến (Asn-B3-Lys, Lys-B29-Glu) so với insulin người, theo trình tự axit amin sau đây:

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

Insulin glulisin (insulin người 3^B-lysin-29^B-axit glutamic) có công thức thực nghiệm C₂₅₈H₃₈₄N₆₄O₇₈S₆ và phân tử lượng là 5823. Một đơn vị insulin glulisin tương ứng với khoảng 0,0349 mg insulin glulisin.

Sơ đồ sau đây minh họa các trình tự axit amin và các liên kết disulfua của insulin người và của các dược chất trong sản phẩm insulin tác dụng nhanh mà hiện đã được chấp thuận để sử dụng trong điều trị sự sai lệch nồng độ glucoza huyết trong bữa ăn:

Chuỗi insulin A người

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

Tyr Cys Asn

Chuỗi insulin B người, với các vị trí được thể hiện cho các chất tương tự insulin nhất định

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

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

Các chế phẩm theo sáng chế có nồng độ insulin nằm trong khoảng từ 0,24 đến 3 mM (40 - 500 IU/mL; 1,4 mg/mL - 17,5 mg/mL). Các chế phẩm theo sáng chế có thể có nồng độ cụ thể là 40, 100, 200, 300, 400, và 500 IU/mL (1,4, 3,5, 7, 10,5, 14, và 17,5 mg/mL). Các chế phẩm được ưu tiên có nồng độ là 100 IU/mL hoặc 200 IU/mL.

Các cải thiện về profin tác dụng theo thời gian của các chất tương tự insulin trên đây được chứng tỏ trong sáng chế đạt được thông qua việc sử dụng lượng nhỏ chất tương tự prostacyclin treprostinil (CAS No. 81846-19-7). Danh pháp hóa học của treprostinil là axit (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-Hexahydro-2-hydroxy-1-[(3S)-3-hydroxyoctyl]-1H-benz[f]inden-5-yl]oxy]axetic. Chất này có phân tử lượng là 390,52 và công thức phân tử là C₂₃H₃₄O₅. Treprostinil là thành phần hoạt tính của dược phẩm thương mại có bán với tên thương mại Remodulin®, Tyvaso® và Orenitran™, mà được chỉ định để điều trị bệnh tăng huyết áp động mạch phổi để loại bỏ các triệu chứng có liên quan đến luyện tập (Remodulin®) và để cải thiện khả năng luyện tập (Tyvaso® và Orenitran™). Tyvaso® và Orenitran™ lần lượt có dạng liều hít và dạng liều dùng đường uống, và Remodulin® được chỉ định để dùng dưới da hoặc trong tĩnh mạch như truyền liên tục. Remodulin® hiện có nồng độ liều 1, 2,5, 5 và 10 mg/mL, và mỗi mL cũng chứa 3 mg metacresol, 6,3 mg natri xitrat, 5,3 mg (nồng độ 1, 2,5 và 5 mg/mL) hoặc 4,0 mg (nồng độ 10 mg/mL) natri clorua, và nước để tiêm.

Đường dùng của các chế phẩm theo sáng chế thường là tự sử dụng bằng cách tiêm dưới da, ví dụ, bằng xi lanh hoặc bút tiêm, hoặc bằng cách truyền liên tục insulin dưới da bằng dụng cụ bơm insulin, cũng có thể dùng theo đường trong tĩnh mạch, qua da, hoặc trong màng bụng. Tốt hơn, nếu đường dùng là tự sử dụng bằng cách tiêm dưới da. Liều hoạt chất được tiêm sẽ được xác định bởi bệnh nhân có tham khảo ý kiến của bác sĩ.

Các chế phẩm này là vô trùng khi được sản xuất lần đầu. Khi chế phẩm được cung cấp trong lọ hoặc ống dùng nhiều lần, chất hoặc hỗn hợp các chất bảo quản chống vi sinh vật mà tương thích với các thành phần khác của dạng bào chế thường được bổ sung để đáp ứng các yêu cầu theo quy định và yêu cầu về bảo quản chống vi sinh vật trong dược điển. Xem U.S. Pharmacopeia Monographs. Insulin lispro injection. USP29-NF24; British Pharmacopeia Monographs 2008 Volume III: Insulin aspart injection; U.S. Pharmacopeia Monographs. Insulin assays; và U.S. Pharmacopeia general chapters. USP29-NF24. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention; 2005. Antimicrobial effectiveness testing; pp. 2499-2500. Các chất bảo quản được ưu tiên là các axit aryl và các hợp chất phenol, hoặc hỗn hợp các chất này. Nồng độ hữu hiệu có thể xác định được dễ dàng bằng các phương pháp nêu trên. Các chất bảo quản thường dùng nhất trong các sản phẩm insulin là phenol, m-cresol, và rượu benzylic. Các chế phẩm thương mại hiện có, chẳng hạn, chứa 3,15 mg/mL m-cresol (HUMALOG® và APIDRA®), 1,72 mg/mL m-cresol và 1,50 mg/mL phenol (NOVOLOG®), và 2,5 mg/mL m-cresol (HUMULIN® R U-500).

Mong muốn khi sử dụng chế phẩm càng gần phù hợp với trương lực của (tức là, độ thẩm thấu) của dịch thể ở vị trí tiêm càng tốt vì các dung dịch mà không gần bằng trương với các dịch thể có thể gây ra cảm giác đau nhói khi sử dụng. Do đó, mong muốn rằng các chế phẩm này gần như bằng trương với các dịch thể ở vị trí tiêm. Nếu độ thẩm thấu của chế phẩm khi không có chất tạo trương lực đủ nhỏ hơn so với độ thẩm thấu của mô (đối với máu, khoảng 300 mOsmol/kg; yêu cầu của European Pharmacopeia về độ thẩm thấu là > 240 mOsmol/kg), thì chất tạo trương lực thường cần được bổ sung vào để tăng trương lực của chế phẩm đến khoảng 300 mOsmol/kg. Các chất tạo trương lực thường là glyxerol (glyxerin) và natri clorua. Lượng chất tạo trương lực để bổ sung vào dễ dàng xác định được bằng các kỹ thuật chuẩn. 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.

Nếu cần, chế phẩm có thể chứa thêm một hoặc nhiều chất làm ổn định, như kẽm, natri clorua, canxi clorua, và arginin. Kẽm là chất làm ổn định thường dùng, và kẽm oxit có thể được bổ sung để tạo ra số nguyên tử kẽm mong muốn. Một số chế phẩm insulin thương mại có khoảng 2,4 nguyên tử kẽm trên sáu phân tử insulin (HUMULIN® R U-500), và một số chế phẩm có khoảng 3,0 nguyên tử kẽm trên sáu phân tử insulin (HUMALOG®, NOVOLOG®).

Nếu cần, chất đệm có thể được đưa vào. Ví dụ về các chất đệm như vậy là chất đệm phosphat, như natri phosphat dibazơ, TRIS hoặc natri axetat. Các chất đệm phosphat hoặc TRIS được ưu tiên.

Độ pH của chế phẩm insulin thương mại thường nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,6, trong đó $7,4 \pm 0,1$ là độ pH đích phổ biến. Độ pH theo sáng chế thường từ 7,0 đến 7,8 và được điều chỉnh bằng các axit và bazơ thích hợp về mặt sinh lý, thường là axit clohydric 10% và natri hydroxit 10%. Tốt hơn, nếu độ pH là khoảng 7,4.

Theo một phương án, profin khởi đầu tác dụng và/hoặc hấp thu của các chế phẩm theo sáng chế nhanh hơn ít nhất 20% so với các chế phẩm chứa cùng loại insulin nhưng không chứa treprostini, như được xác định, chẳng hạn, bằng: các thông số dược động học, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở Tmax, 50% Tmax sớm, 50% Tmax muộn, Cmax, và/hoặc thời gian để đạt 10%, 20% hoặc 50% tổng AUCinf; và/hoặc các thông số dược lực học, như thời gian để đạt GIR tối đa hoặc thời gian để đạt 50% GIR tối đa. Theo một phương án khác, profin khởi đầu tác dụng và/hoặc hấp thu của các chế phẩm theo sáng chế nhanh hơn ít nhất 25% so với các chế phẩm chứa cùng loại insulin nhưng không chứa treprostini, như xác định, chẳng hạn bằng các thông số dược động học và/hoặc dược lực học, bao gồm các thông số nêu trên. Theo một phương án khác, profin khởi đầu tác dụng và/hoặc hấp thu của các chế phẩm theo sáng chế nhanh hơn ít nhất 30% so với các chế phẩm chứa cùng loại insulin nhưng không chứa treprostini, như xác định, chẳng hạn bằng các thông số dược động học và/hoặc dược lực học, bao gồm các thông số nêu trên.

Sáng chế cũng bao gồm danh mục các phương án không giới hạn sau đây, các phương án này được mô tả tiếp trong bản mô tả:

Dược phẩm chứa insulin, treprostinil, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm.

Dược phẩm chứa insulin, treprostinil, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm, trong đó insulin được chọn từ nhóm gồm insulin người, insulin lispro, insulin aspart và insulin glulisin, một hoặc nhiều chất bảo quản được chọn từ nhóm gồm phenol, meta-cresol, và rượu benzylic, chất tạo trương lực được chọn từ nhóm gồm glyxerol và natri clorua, một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm gồm kẽm, natri clorua, canxi clorua, và arginin và chất đệm được chọn từ nhóm gồm phosphat, TRIS hoặc natri axetat.

Dược phẩm chứa insulin, treprostinil, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm, trong đó insulin là insulin lispro, chất bảo quản là meta-cresol, chất tạo trương lực là glyxerol, chất làm ổn định là kẽm, và chất đệm là TRIS.

Dược phẩm chứa insulin, treprostinil, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm, trong đó insulin là insulin lispro, chất bảo quản là meta-cresol, chất tạo trương lực là glyxerol, chất làm ổn định là kẽm, và chất đệm là phosphat.

Dược phẩm chứa insulin, treprostinil, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm, trong đó insulin là insulin lispro, chất bảo quản là meta-cresol, chất tạo trương lực là natri clorua, chất làm ổn định là kẽm, và chất đệm là TRIS.

Dược phẩm chứa insulin, treprostinil, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm, trong đó insulin là insulin lispro, chất bảo quản là meta-cresol, chất tạo trương lực là glyxerol, chất làm ổn định là kẽm, và chất đệm là phosphat.

Dược phẩm chứa insulin, treprostinil, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm, trong đó insulin là insulin lispro, chất bảo quản là meta-cresol, chất tạo trương lực là natri clorua, chất làm ổn định là kẽm, và chất đệm là phosphat, và trong đó nồng độ insulin lispro từ khoảng 40 đến khoảng 500 IU/mL, nồng độ treprostinil từ khoảng 0,01 đến khoảng 30 μ M, nồng độ kẽm từ khoảng 0,00525 mg/mL đến khoảng 0,131 mg/mL, nồng độ

meta-cresol từ khoảng 2,5 mg/mL đến khoảng 3,8 mg/mL, và nồng độ glyxerol từ khoảng 5 đến khoảng 20 mg/mL.

Dược phẩm chứa insulin, treprostini, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm, trong đó insulin là insulin lispro, chất bảo quản là meta-cresol, chất tạo trương lực là natri clorua, chất làm ổn định là kẽm, và chất đệm là phosphat, và trong đó nồng độ insulin lispro là khoảng 100 IU/mL, nồng độ treprostini là khoảng 0,05 đến khoảng 26 μ M, nồng độ kẽm là khoảng 0,0197 mg/mL, nồng độ meta-cresol là khoảng 3,15 mg/mL, và nồng độ glyxerol là khoảng 16 mg/mL.

Dược phẩm chứa insulin, treprostini, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm, trong đó insulin là insulin lispro, chất bảo quản là meta-cresol, chất tạo trương lực là natri clorua, chất làm ổn định là kẽm, và chất đệm là TRIS, và trong đó nồng độ insulin lispro là khoảng 100 IU/mL, nồng độ treprostini là khoảng 0,05 đến khoảng 26 μ M, nồng độ kẽm là khoảng 0,0197 mg/mL, nồng độ meta-cresol là khoảng 3,15 mg/mL, và nồng độ glyxerol là khoảng 16 mg/mL, và trong đó độ pH của chế phẩm là khoảng 7,4.

Dược phẩm chứa chế phẩm bất kỳ nêu trên trong đó sự khởi đầu tác dụng và/hoặc profin hấp thu của chế phẩm nhanh hơn ít nhất 20% so với các chế phẩm chứa cùng loại insulin nhưng không chứa treprostini, như được xác định, chẳng hạn bằng Tmax, 50% Tmax sớm, 50% Tmax muộn, Cmax, thời gian để đạt 10%, 20% hoặc 50% AUCinf, thời gian để đạt GIR tối đa, và/hoặc hoặc thời gian để đạt 50% GIR tối đa. Dược phẩm chứa chế phẩm bất kỳ nêu trên trong đó sự khởi đầu tác dụng và/hoặc profin hấp thu của chế phẩm nhanh hơn ít nhất 25% so với các chế phẩm chứa cùng loại insulin nhưng không chứa treprostini, như được xác định, chẳng hạn bằng Tmax, 50% Tmax sớm, 50% Tmax muộn, Cmax, thời gian để đạt 10%, 20% hoặc 50% AUCinf, thời gian để đạt GIR tối đa, và/hoặc hoặc thời gian để đạt 50% GIR tối đa. Dược phẩm chứa chế phẩm bất kỳ nêu trên trong đó sự khởi đầu tác dụng và/hoặc profin hấp thu của chế phẩm nhanh hơn ít nhất 30% so với các chế phẩm chứa cùng loại insulin nhưng không chứa treprostini, như được xác định, chẳng hạn bằng Tmax, 50% Tmax sớm, 50% Tmax muộn, Cmax, thời gian để đạt 10%, 20% hoặc 50% AUCinf, thời gian để đạt GIR tối đa, và/hoặc hoặc thời gian để đạt 50% GIR tối đa.

Dược phẩm chứa chế phẩm bất kỳ nêu trên trong đó chế phẩm này được sử dụng bằng cách tiêm dưới da.

Bản mô tả bộ lọc phương pháp điều trị bệnh tiểu đường bao gồm việc cho người cần điều trị sử dụng liều hữu hiệu dược phẩm chứa insulin, treprostini, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm, trong đó insulin là insulin lispro, chất bảo quản là meta-cresol, chất tạo trương lực là glyxerol hoặc natri clorua, chất làm ổn định là kẽm, và chất đệm là phosphat hoặc TRIS, và trong đó sự khởi đầu tác dụng và/hoặc profin hấp thu của chế phẩm này nhanh hơn ít nhất 20% so với các chế phẩm chứa cùng loại insulin nhưng không chứa treprostini, như được xác định, chẳng hạn bằng Tmax, 50% Tmax sớm, 50% Tmax muộn, Cmax, thời gian để đạt 10%, 20% hoặc 50% tổng AUCinf, thời gian để đạt GIR tối đa và/hoặc thời gian để đạt 50% GIR tối đa. Bản mô tả cũng bộ lọc phương pháp điều trị bệnh tiểu đường bao gồm việc cho người cần điều trị sử dụng liều hữu hiệu dược phẩm chứa insulin, treprostini, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm, trong đó insulin là insulin lispro, chất bảo quản là meta cresol, chất tạo trương lực là glyxerol hoặc natri clorua, chất làm ổn định là kẽm, và chất đệm là phosphat hoặc TRIS, và trong đó sự khởi đầu tác dụng và/hoặc profin hấp thu của chế phẩm này nhanh hơn ít nhất 25% so với các chế phẩm chứa cùng loại insulin nhưng không chứa treprostini, như được xác định, chẳng hạn bằng Tmax, 50% Tmax sớm, 50% Tmax muộn, Cmax, thời gian để đạt 10%, 20% hoặc 50% tổng AUCinf, thời gian để đạt GIR tối đa và/hoặc thời gian để đạt 50% GIR tối đa. Bản mô tả cũng bộ lọc phương pháp điều trị bệnh tiểu đường bao gồm việc cho người cần điều trị sử dụng liều hữu hiệu dược phẩm chứa insulin, treprostini, một hoặc nhiều chất bảo quản, chất tạo trương lực, một hoặc nhiều chất làm ổn định, và tùy ý, chất đệm, trong đó insulin là insulin lispro, chất bảo quản là meta-cresol, chất tạo trương lực là glyxerol hoặc natri clorua, chất làm ổn định là kẽm, và chất đệm là phosphat hoặc TRIS, và trong đó sự khởi đầu tác dụng và/hoặc profin hấp thu của chế phẩm này nhanh hơn ít nhất 30% so với các chế phẩm chứa cùng loại insulin nhưng không chứa treprostini, như được xác định, chẳng hạn bằng Tmax, 50% Tmax sớm, 50% Tmax muộn, Cmax, thời gian để đạt 10%, 20% hoặc 50% tổng AUCinf, thời gian để đạt GIR tối đa và/hoặc thời gian để đạt 50% GIR tối đa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa tiếp bằng các ví dụ sau đây, các ví dụ này không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Thử nghiệm độ ổn định

Thử nghiệm độ ổn định được tiến hành để đánh giá độ ổn định của insulin lispro khi được đồng bào chế với treprostinil. Các mẫu đo độ ổn định được chuẩn bị bằng cách kết hợp chế phẩm insulin lispro (Lilly Material # QA415Q) và Remodulin®(United Therapeutics, Batch 922017), sản phẩm có bán trên thị trường chứa 1 mg/mL treprostinil, 3 mg/mL m-cresol, 6,3 mg natri xitrat, 5,3 mg/mL natri clorua, và nước để tiêm. Mỗi millilit chế phẩm được đặt ổn định chứa insulin lispro 100 đơn vị, 16 mg glycerin, 2,13 mg natri phosphat dibazơ, 3,18 mg m-cresol, 0,0197 mg ion kẽm, 0,01 mg treprostinil, 0,063 mg natri xitrat, 0,053 mg natri clorua, 0,0024 mg natri hydroxit, và nước Mini-Q. Độ pH được điều chỉnh đến độ pH cuối là 7,4 bằng cách bổ sung dung dịch nước axit clohydric 1 N và/hoặc natri hydroxit 1 N.

Dung dịch này được lọc bằng bộ lọc Steriflip Vacuum 50 ml bằng màng PES 0,22 μ M (Cat#: SCGP00525, EMD Minipore, Binerica, MD) và phân bố vào các lọ nhấp nháy 7 mL với nắp đậy bằng ure trắng có ren với đệm nút bản viên lá nhôm (lọ và nắp: Cat#:03-340-4A, Kimble Chase, Rockwood, TN), lần lượt được ủ ở 5°C, 25°C, 30°C và 37°C, và rút ra để phân tích ở thời điểm ban đầu, các thời điểm 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần và 36 ngày. Các mẫu cũng được rút ra để phân tích vào các thời điểm 44, 54 và 66 ngày đối với các dung dịch được ủ ở 5°C, 25°C và 30°C.

Phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ cao áp (High pressure size-exclusion chromatography - HP-SEC) được sử dụng để đánh giá độ ổn định của protein và định lượng các dạng có phân tử lượng cao trong từng chế phẩm bằng cách sử dụng hệ thống Agilent 1200 phát hiện bằng UV ở bước sóng 214 nm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Từng mẫu (5 μ L) được tiêm lên cột Tosoh TSKgel G2000SWxl (Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, PA; 3000 mm X 7,8 mm) và tách ở tốc độ dòng 0,5 mL/phút bằng cách sử dụng pha động chứa 10 mM natri phosphat, 10% axetonitril (ACN), và 300 mM NaCl ở độ pH=7,4. Tỷ lệ phần trăm có phân tử lượng cao (% HMW) được tính toàn bằng cách chia diện tích đỉnh sắc ký HMW ở bước sóng 214 nm cho tổng diện tích đỉnh.

Kết quả SEC (% HMW) được đưa ra trong bảng sau.

Thời điểm	Điều kiện bảo quản			
	5°C	25°C	30°C	37°C
0	0,09	0,09	0,09	0,09
7	0,10	0,12	0,14	0,20
14	0,11	0,15	0,18	0,24
21	0,13	0,16	0,28	0,43
28	0,13	0,18	0,26	0,52
36	0,145	0,163	0,333	0,927
44	0,076	0,368	0,676	N/A
54	0,138	0,463	0,78	N/A
66	0,364	0,356	0,525	N/A

Mức tạo thành HMW là dưới 1% đối với tất cả các mẫu cho đến 36 ngày ở 37°C và 66 ngày ở 30°C, cho thấy nguy cơ mất ổn định thấp.

Phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao đảo pha (Reversed phase high-performance liquid chromatography - RP-HPLC) được tiến hành để đánh giá độ tinh khiết của protein ở các thời điểm ổn định bằng hệ thống Agilent 1200 phát hiện bằng UV ở 214 nm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Từng mẫu (5 µL) được tách ở 60 °C bằng thiết bị Symmetry Shield RP18 4,6 x 100 mm (3,5 µM) (Waters, Huntingdon Valley, PA) với tốc độ dòng 0,9 mL/phút với pha động A (axit trifloaxetic 0,1% (TFA) trong nước) và pha động B (0,1% TFA trong axetonitril). Gradient pha động B ở 0, 3, 5, 20, 25, 27 và 30 phút lần lượt là 10, 10, 20, 45, 90, 10 và 10%.

Nồng độ insulin được tính toán bằng cách tích phân diện tích đỉnh insulin và so sánh với chuẩn insulin lispro. Kết quả, báo cáo theo IU/mL, được đưa ra dưới đây.

Thời điểm (ngày)	Điều kiện bảo quản			
	5°C	25°C	30°C	37°C
0	103,2	103,2	103,2	103,2
14	101,8	105,3	104,2	103,2
21	102,7	107,2	105,2	103,2
28	102,9	105,8	103,4	102,2
36	103,4	105,4	102,4	102,6

44	103,1	103,7	103,4	N/A
54	102,6	103,7	104,5	N/A
66	102,8	105,0	104,6	N/A

Quan sát thấy lượng mất mát insulin tối thiểu nếu có đối với tất cả các mẫu cho đến 36 ngày ở 37 °C và 66 ngày ở 30 °C.

Tỷ lệ phần trăm mẫu ngoài đỉnh chính được tính toán bằng cách chia diện tích đỉnh sắc ký chính cho tổng diện tích đỉnh. Kết quả (% ngoài đỉnh chính) được đưa ra dưới đây.

Thời điểm (ngày)	Điều kiện bảo quản			
	5°C	25°C	30°C	37°C
0	0,4	0,4	0,4	0,40
14	0,3	1,4	1,5	2,40
21	0,5	1,2	1,5	2,35
28	0,7	1,4	2,0	2,93
36	0,5	1,1	1,8	2,29
44	0,8	1,6	2,5	N/A
54	1,1	1,9	2,6	N/A
66	1,2	2,3	3,2	N/A

Tỷ lệ phần trăm ngoài diện tích đỉnh chính là dưới 3% đối với tất cả các mẫu ở 37°C trong 36 ngày và dưới 3,5% đối với tất cả các mẫu ở 30°C trong 66 ngày, điều này là chấp nhận được đối với các chế phẩm insulin.

Nghiên cứu dược động học và dược lực học

Sử dụng mười lăm lợn đực Yucatan nhỏ đã thiến, mắc bệnh tiểu đường (do alloxan gây ra) (trung bình 20 tháng tuổi và thể trọng trung bình 42 kg) đã lấp các công tiếp cận mạch trước đó. Các động vật bị tiểu đường này được nhốt riêng và được tùy ý uống nước sạch ở mọi thời điểm. Chúng được cho ăn hai bữa mỗi ngày theo chế độ ăn nuôi nhốt S-9 và được cho dùng insulin cơ bản duy trì thích hợp và qua bữa ăn hai lần mỗi ngày để kiểm soát tình trạng tiểu đường của chúng.

Các đối tượng thử nghiệm (chế phẩm A, B và C trong bảng dưới đây) được bào

chế và vận chuyển qua đêm trong bao bì lạnh đến vị trí thử nghiệm. Đối chứng insulin Humalog là nguyên liệu thương mại 100 IU/mL được bảo quản ở vị trí thử nghiệm.

Tên chế phẩm	Chế phẩm
Insulin lispro + treprostinil 1 ng (Chế phẩm A)	94 U/mL insulin lispro (3,5 mg/mL) 13 ng/mL treprostinil (~1 ng/lọn hoặc 0,026 ng/kg) 7 mM natri phosphat 16 mg/mL glyxerin 3,15 mg/mL m-cresol 0,3 mM kẽm độ pH 7,4
insulin lispro + treprostinil 10 ng (Chế phẩm B)	93 U/mL insulin lispro (3,5 mg/mL) 128 ng/mL treprostinil (~10 ng/lọn hoặc 0,26 ng/kg) 7 mM natri phosphat 16 mg/mL glyxerin 3,15 mg/mL m-cresol 0,3 mM kẽm độ pH 7,4
insulin lispro + treprostinil 400 ng (Chế phẩm C)	93 U/mL insulin lispro (3,5 mg/mL) 5 pg/mL treprostinil (~400 ng/lọn hoặc 10 ng/kg) 7 mM natri phosphat 16 mg/mL glyxerin 3,15 mg/mL m-cresol 0,3 mM kẽm độ pH 7,4
Humalog	100 U/mL insulin lispro 1,88 mg/mL natri phosphat dibazơ 16 mg/mL glyxerin 3,15 mg/mL meta-cresol 0,3 mM kẽm độ pH 7,4

Các đối tượng thử nghiệm được bảo quản trong tủ lạnh cho đến khi cho dùng liều và sau đó đưa trở lại tủ lạnh sau khi việc cho dùng liều ở tất cả các động vật hoàn thành. Trong giai đoạn cho dùng liều các đối tượng thử nghiệm được giữ trong hộp cách ly khi không được hút ra.

Thử nghiệm này là thiết kế lai bốn cách. Thiết kế này cho phép mỗi động vật riêng rẽ được dùng một trong số ba đối tượng thử nghiệm và insulin đối chứng bằng cách cho dùng liều một đối tượng thử nghiệm vào mỗi ngày thử nghiệm (4 lần mỗi lần cách nhau 7 ngày).

Vào ngày trước khi thử nghiệm, các động vật này được cho ăn một nửa khẩu phần hằng ngày của chúng và được dùng 0,2 U/kg Humalog Mix 75/25 Insulin làm liều duy trì buổi sáng của chúng. Tất cả các động vật thử nghiệm được cho nhịn ăn qua đêm và không được dùng insulin buổi tối hoặc bữa ăn của chúng trước khi dùng thuốc vào ngày thử nghiệm.

Vào buổi sáng ngày thử nghiệm, tất cả các động vật được cột chặt vào dải băng và được tiếp cận qua các cổng tiếp cận mạch của chúng (được tạo ra để lấy mẫu máu) và kiểm tra về độ mở. Các động vật này được chia ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị (4 nhóm $n=3-4$ mỗi nhóm tạo ra $n=15$ cho mỗi nhóm điều trị trước khi loại ra bất kỳ). Sau khi thu hai mẫu máu mốt cơ sở (-30 và -20 phút), các động vật được đưa trở lại bãi rào của chúng và cho ăn ~300 g chế độ ăn S-9. Hai động vật bị loại ra khỏi nhóm điều trị bằng insulin lispro + treprostinil 10 ng vì không đáp ứng tiêu chuẩn về glucoza huyết mốt cơ sở trên 200 mg/dL, và một động vật bị loại ra khỏi việc phân tích dữ liệu của nhóm đó vì giá trị liều insulin trước >10000 pM, dẫn đến $n=12$ cho nhóm điều trị. Một động vật bị loại ra khỏi nhóm điều trị bằng insulin lispro + treprostinil 1 ng vì không đáp ứng tiêu chuẩn về glucoza huyết mốt cơ sở trên 200 mg/dL, dẫn đến $n=14$ cho nhóm điều trị đó.

Hai mươi phút sau khi bữa ăn được tiêu thụ hoàn toàn, các động vật được tiêm dưới da bằng đối tượng thử nghiệm 0,2 U/kg (dựa trên nồng độ insulin, trung bình 9 đơn vị/lợn) vào bên sườn (0 phút) bằng xi lanh insulin Terumo (0,5 ml kim 1/2"). Tất cả động vật thử nghiệm được cho tùy ý tiếp cận nước sạch trong suốt giai đoạn thu máu còn lại.

Huyết áp được kiểm tra bằng dụng cụ Cardell Monitor (bảng vòng đo huyết áp

thứ y trên đuôi) ở -30 và 0 (trước khi dùng liều) phút làm mốc cơ sở và sau đó ở 30 và 60 phút sau khi dùng liều. Ba lần đo liên tiếp được tiến hành ở mỗi thời điểm +/- 5 phút. Dữ liệu được trình bày là trung bình của ba số đo cho mỗi lợn riêng rẽ.

Loại mẫu máu (2,0 mL mỗi mẫu) được thu thập từ mỗi động vật ở các thời điểm sau: -30, -20 (sau đó ngay sau khi cho ăn), 0 (ngay trước khi dùng liều), 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 240, và 360 phút sau khi dùng liều dưới da (sc).

Không quan sát thấy biến cố bất lợi trong khoảng thời gian thử nghiệm. Glucoza huyết được theo dõi theo thời gian thực bằng đường kế cầm tay và tất cả các động vật được quan sát thường quy về các dấu hiệu lâm sàng của chứng hạ đường huyết. Huyết áp được ghi lại ở các thời điểm -30 và 0 phút để làm giá trị mốc cơ sở và sau đó theo dõi ở 30 và 60 phút sau khi dùng liều để đánh giá tỷ lệ hạ huyết áp. Không có thay đổi đáng kể nào xảy ra. Không có lưu ý nào về phản ứng tại vị trí tiêm cục bộ.

Các mẫu máu (chất chống đông: không [huyết thanh]) được giữ ở nhiệt độ môi trường trong ít nhất 30 phút nhưng không quá 2 giờ để cho phép đông máu. Huyết thanh sau đó được tách ra bằng cách ly tâm và chia thành hai phần phân ước và bảo quản lạnh đông ở khoảng -70°C .

Nồng độ glucoza trong huyết tương được xác định bằng thiết bị Cobas c311 Clinical Chemistry Analyzer tự động (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana). Tiến hành phân tích phương sai một chiều tiếp theo là thử nghiệm Dunnett để so sánh trung bình nhóm bằng JMP 9 Statistical Discovery bằng SAS trên glucoza so với đối chứng Humalog với độ tin cậy ở $p < 0,05$. Nồng độ glucoza trong huyết thanh (mg/dL) sau khi điều trị bằng các chế phẩm đối chứng và các chế phẩm thử nghiệm (0,2 U/kg ở thời điểm 0) được đưa ra trong Bảng sau đây.

Thời gian (phút)	Humalog		insulin lispro + 1 ng treprostinil		insulin lispro + 10 ng treprostinil		insulin lispro + 400 ng treprostinil	
	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn
-30	285,6	9,4	303,3	11,1	299,8	12,7	299,3	13,9
-20	295,5	9,5	316,2	12,5	311,2	14,4	312,3	13,5
0	304,1	9,0	327,2	12,2	325,5	14,6	320,5	15,5
5	310,7	9,4	331,0	11,5	335,3	14,7	320,6	16,0
10	311,3	9,5	331,0	11,9	325,2	12,9	312,9	16,2
15	316,9	7,8	332,3	12,4	314,2	14,8	304,1	16,0
30	287,6	15,2	293,8	23,2	263,5	24,8	233,5	22,8
45	260,7	19,9	245,3	28,0	196,9	26,4	178,9	23,5
60	234,1	23,0	210,8	28,0	148,0	24,4	136,0	22,8
75	202,6	24,6	154,9	26,1	103,9	18,9	98,9	20,8
90	161,1	22,4	112,4	20,4	71,4	15,5	68,7	16,8
105	127,6	20,5	91,4	16,9	58,1	13,7	51,7	11,3
120	115,2	19,5	69,8	12,9	53,5	14,3	45,4	10,4
150	97,1	17,5	55,6	9,9	47,7	9,8	50,1	11,1
180	79,4	16,5	50,1	11,3	62,9	16,6	60,4	17,0
240	82,2	18,5	62,4	14,8	88,4	21,5	84,5	22,9
360	130,5	24,7	122,3	23,3	163,2	28,2	144,1	26,0

Insulin cộng với treprostinil dẫn đến sự gia tăng phụ thuộc liều đáp ứng hạ glucoza so với Humalog đơn độc. Insulin cộng với treprostinil cũng dẫn đến mức độ hạ glucoza lớn hơn từ mốc cơ sở so với Humalog đơn độc. Độ thay đổi glucoza trung bình từ mốc cơ sở (mốc cơ sở = trung bình của các mẫu ở -30 và -20 phút) ở Tmax trung vị của Humalog (90 phút) là -129 mg/dL đối với Humalog, -197 mg/dL đối với insulin lispro +1 ng treprostinil, -234 mg/dL đối với insulin lispro + 10 ng Treprostinil, và -237 mg/dL đối với insulin lispro + 400 ng treprostinil. Việc so sánh glucoza trung bình bằng phương pháp Dunnett chứng tỏ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa mẫu insulin lispro + 400 ng treprostinil so với đối chứng Humalog ngay ở thời điểm 45 phút ($p=0,0148$). Đến thời điểm 60 phút và qua 150

phút sự giảm glucoza đối với insulin lispro + 400 ng treprostinil và insulin lispro + 10 ng treprostinil khác biệt về mặt thống kê so với đối chứng Humalog. Không có sự khác biệt rõ ràng hoặc về mặt thống kê (Dunnett) trong huyết áp tâm thu hoặc tâm trương trung bình ở mốc cơ sở (-30 & 0 phút) hoặc sau khi điều trị bằng liều bất kỳ trong số ba liều insulin lispro + treprostinil so với đối chứng Humalog.

Về mặt dược động học, mức insulin đối với tất cả các mẫu PK huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm miễn dịch (radioimmunoassay - RIA) insulin tổng số. Giới hạn định lượng trên và dưới của thử nghiệm lần lượt là 20 pM và 5000 pM. Các giá trị dưới giới hạn định lượng dưới được lấy là 20 pM. Các phép phân tích dược động học không ngăn được tiến hành bằng cách sử dụng Phoenix WinNonlin v6.3.

Chế phẩm		T _{max} (phút)	C _{max} (nM)	AUC _{INF} (phút*nM)	CL/F (mL/phút/kg)
Humalog N=15	Trung bình	83,7	0,732	117	11,4
	Sai số chuẩn	13,0	0,0964	11,0	1,01
	Trung vị	90,0	0,699	106	11,3
insulin lispro + treprostinil 1 ng (Chế phẩm A) N=14	Trung bình	75,0	0,922	127	10,1
	Sai số chuẩn	12,9	0,0759	9,63	0,838
	Trung vị	60,0	0,898	137	8,78
insulin lispro + treprostinil 10 ng (Chế phẩm B) N=12	Trung bình	48,8	1,53	154	8,57
	Sai số chuẩn	5,58	0,247	15,4	0,711
	Trung vị	45,0	1,15	131	9,14
insulin lispro + treprostinil 400 ng (Chế phẩm C) N=15	Trung bình	49,0	1,20	144	8,95
	Sai số chuẩn	6,46	0,127	12,0	0,578
	Trung vị	30,0	1,14	134	8,98

Các chữ viết tắt Tmax - thời gian để đạt nồng độ insulin tối đa, Cmax - nồng độ insulin tối đa, AUC_{INF} - diện tích dưới đường cong nồng độ insulin từ 0 đến vô cùng, CL/F - độ thanh thải/độ sinh khả dụng.

Việc kết hợp insulin lispro với treprostinil dẫn đến sự gia tăng phụ thuộc liều về profin dược động học của insulin, so với Humalog đơn độc. Các giá trị Tmax trung vị là 90 phút, 60 phút, 45 phút và 30 phút lần lượt đối với Humalog đơn độc, insulin lispro + treprostinil 1 ng, insulin lispro + treprostinil 10 ng và insulin lispro + treprostinil 400 ng. Việc bổ sung treprostinil cũng dẫn đến sự gia tăng Cmax của insulin so với Humalog đơn độc. Cmax sớm hơn và cao hơn phù hợp với mong đợi về tốc độ hấp thu tăng. Tổng mức phơi nhiễm với insulin (AUC_{INF}) cao hơn khoảng 30% đối với cả ba nhóm chứa treprostinil, so với Humalog đơn độc.

Tổng hợp lại, sự gia tăng cả profin dược động học của insulin và profin glucoza thu được khi treprostinil được sử dụng cùng với insulin lispro cho thấy rằng treprostinil tạo thuận lợi cho việc hấp thu insulin nhanh hơn, so với Humalog đơn độc. Những cải thiện về tác dụng theo thời gian đạt được mà không có ảnh hưởng rõ ràng nào đến huyết áp ở các động vật này.

Các nghiên cứu được mô tả trên đây chứng tỏ rằng việc bổ sung lượng nhỏ treprostinil vào chế phẩm chứa insulin lispro có thể tạo ra Tmax sớm hơn và Cmax cao hơn trong profin dược động học của insulin cũng như hiệu quả giảm glucoza sớm hơn và lớn hơn, và các chế phẩm như vậy đủ ổn định.

Trình tự

Chuỗi A insulin người

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

Chuỗi B insulin người

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

Chuỗi B insulin lispro

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

Chuỗi B insulin aspart

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

Chuỗi B insulin glulisin

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa insulin và treprostinil, trong đó nồng độ treprostinil là từ 0,01 đến 30 μM .
2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó insulin được chọn từ nhóm gồm insulin người, insulin lispro, insulin aspart và insulin glulisin.
3. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó insulin là insulin lispro.
4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nồng độ insulin là từ 40 đến 500 IU/mL.
5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó nồng độ insulin là khoảng 100 IU/mL.
6. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó nồng độ treprostinil là từ 0,05 đến 26 μM .
7. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó dược phẩm này chứa thêm một hoặc nhiều chất bảo quản.
8. Dược phẩm theo điểm 7, trong đó một hoặc nhiều chất bảo quản được chọn từ nhóm gồm phenol, meta-cresol, và rượu benzylic.
9. Dược phẩm theo điểm 8, trong đó chất bảo quản là meta-cresol.
10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó nồng độ meta-cresol là từ 2,5 mg/mL đến 3,8 mg/mL.
11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó nồng độ meta-cresol là khoảng 3,15 mg/mL.
12. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó dược phẩm này chứa thêm chất tạo trương lực.
13. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó chất tạo trương lực được chọn từ nhóm gồm glyxerol và natri clorua.
14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó chất tạo trương lực là glyxerol.
15. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó nồng độ glyxerol là từ 5 đến 20 mg/mL.
16. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó dược phẩm này chứa thêm một hoặc nhiều chất làm ổn định.

17. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm gồm kẽm, natri clorua, canxi clorua, và arginin.

18. Dược phẩm theo điểm 17, trong đó chất làm ổn định là kẽm.

19. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó nồng độ kẽm là từ 0,00525 mg/mL đến 0,131 mg/mL.

20. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19, trong đó dược phẩm này chứa thêm chất đệm.

21. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20, trong đó độ pH của chế phẩm là từ 7,0 đến 7,8.

22. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, trong đó độ pH của chế phẩm là khoảng 7,4.

23. Dược phẩm chứa:

- a. insulin lispro với nồng độ từ 40 đến 500 IU/mL,
- b. treprostinil với nồng độ từ 0,01 đến 30 μ M,
- c. meta-cresol với nồng độ từ 2,5 đến 3,8 mg/mL,
- d. glyxerol với nồng độ từ 5 đến 20 mg/mL,
- e. kẽm với nồng độ từ 0,00525 đến 0,131 mg/mL, và
- f. độ pH của dược phẩm là từ 7,0 đến 7,8.

24. Dược phẩm theo điểm 23, trong đó nồng độ insulin lispro là khoảng 100 IU/mL; nồng độ treprostinil là từ 0,05 đến 26 μ M; nồng độ meta-cresol là khoảng 3,15 mg/mL; độ pH của dược phẩm là khoảng 7,4.

25. Vật phẩm sản xuất chứa dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24.

26. Vật phẩm sản xuất theo điểm 25, trong đó vật phẩm này là lọ dùng nhiều lần.

27. Vật phẩm sản xuất theo điểm 25, trong đó vật phẩm này là bút tiêm tái sử dụng được.

28. Vật phẩm sản xuất theo điểm 25, trong đó vật phẩm này là dụng cụ bơm để truyền insulin liên tục dưới da.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

<120> DƯỢC PHẨM TÁC DỤNG NHANH CHỨA INSULIN VÀ VẬT PHẨM SẢN XUẤT CHỨA
DUỐC PHẨM NÀY

<130> X20206

<150> 61/990402

<151> 2014-05-08

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 2

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr
 20 25 30

<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr
 20 25 30

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr
 20 25 30