



УКРАЇНА

(19) UA (11) 26874 (13) C1
(51) 6 A 61 K 38/28, A 61 K 31/315ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІД

(54) ПАРЕНТЕРАЛЬНА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ

1

2

(21) 95062794

(22) 14.06 95

(24) 29 12.99

(31) 08/260.634

(32) 16.06.94

(33) US

(46) 29.12 99, Бюл. № 8

(72) Бейкейса Дайан Лі (US), Бремс Девід
Неттлшип (US), Френк Брюс Хілл (US),
Хевел Генрі Екен (US), Пекар Аллен Хьюард
(US)

(73) ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ (US)

(57) 1. Парентеральная фармацевтическая
композиция, отличающаяся тем,
что включает комплекс, содержащий ана-
лог человеческого инсулина, который вк-
лючает: шесть молекул человеческого ин-
сулина, где Pro в позиции B28 замещен
Asp, Lys, Leu, Val или Ala; и Lys в позиции
B29 представляет собой Lys или замещен
Pro, des(B28-B30)-человеческий инсулин;
или des(B27)-человеческий инсулин; два
иона цинка и, по меньшей мере, три мо-
лекулы фенольного производного, выбран-
ного из группы, состоящей из μ -крезола,
фенола или смеси μ -крезола и фенола.2 Парентеральная фармацевтическая
композиция по п. 1, отличающаяся
с я тем, что содержит агент изотонич-ности и физиологически приемлемый бу-
фер.3. Парентеральная фармацевтическая
композиция по п. 1 или 2, отлича-
ющаяся тем, что содержит 3,5 мг/
мл аналога человеческого инсулина, от
14 до 35 мкг/мл цинка, и от 23 до 35 мМ
фенольного производного.4. Парентеральная фармацевтическая
композиция по любому из пп. 1-3, от-
личающаяся тем, что фенольное
производное представляет собой смесь
 μ -крезола и фенола.5. Парентеральная фармацевтическая
композиция по п. 3, отличающаяся
с я тем, что содержит 3,5 мг/мл ана-
лога человеческого инсулина, 19,7 мкг/мл
цинка, 29 мМ μ -крезола, 7 мМ фосфата
натрия и 16 мг/мл глицерина.6. Парентеральная фармацевтическая
композиция по любому из пп. 1-5, от-
личающаяся с я тем, что аналог
человеческого инсулина представляет со-
бой Lys^{B28}Pro^{B29}-человеческий инсулин.7. Парентеральная фармацевтическая
композиция по любому из пп. 1-5, от-
личающаяся с я тем, что аналог
человеческого инсулина представляет со-
бой Asp^{B28}-человеческий инсулин.

Изобретение относится к мономерным
аналогам человеческого инсулина. Более
конкретно, изобретение касается гексамер-
ного комплекса, содержащего аналог ин-
сулина, цинк и фенольное производное.

Со времени введения инсулина в 1920-
х годах делались постоянные попытки усо-

вершенствовать лечение сахарного диа-
бета. Большой прогресс был достигнут в
получении достаточного количества инсу-
лина и степени его чистоты. Были также
разработаны различные препараты с раз-
ным временным действием. Несмотря на
эти достижения, лечение с помощью под-

(19) UA (11) 26874 (13) C1

кожной инъекции не обеспечивает у больного нужную регуляцию и контроль гликемии. Частые отклонения от нормальных уровней гликемии на протяжении жизни больного приводят к гипер- или гипогликемии и длительным осложнениям, включающим ретинопатию, невропатию, нефропатию и микро- и макроангиопатию.

Чтобы избежать появления крайних уровней гликемии диабетика часто практикуют терапию многократного введения инсулина, когда инсулин назначается с каждым приемом пищи. Однако, эта терапия еще не усовершенствована. Самый быстродействующий инсулин, имеющийся в продаже, достигает своего максимального действия слишком поздно после инъекции и его действие длится слишком долго, чтобы оптимально контролировать уровень глюкозы. Недавно были сделаны значительные вклады, чтобы создать препараты инсулина и препараты аналога инсулина, которые меняют кинетику процесса подкожного всасывания. Поскольку все коммерческие фармацевтические препараты инсулина содержат инсулин в самоассоциирующем состоянии и, как правило, в форме цинк-гексамер, считают, что ограничение скорости всасывания инсулина из депо подкожной инъекции в поток крови обязано диссоциации самоагрегирующего гексамера инсулина (Brange и др. в *Diabetes Care*, 13:923-954, 1990).

Чтобы ускорить этот процесс абсорбции были разработаны мономерные аналоги инсулина. Эти мономерные аналоги обладают сравнительно более быстрым началом активности, чем инсулин, сохраняя при этом биологическую активность природного человеческого инсулина. Они обеспечивают быстрое всасывание и приводят время инъекции и пиковое действие инсулина в более близкую временную совместимость с уровнем глюкозы в крови, ассоциируемым с реакцией на прием пищи. Получение различных мономерных аналогов раскрыто у Chance и др., публикация ЕПВ № 383472, и Brange и др., публикация ЕПВ № 214826.

К сожалению, модификации инсулина, которые делают эти аналоги мономерными, также дают высокую степень образования полимера в парентеральных препаратах. Поскольку годность препаратов инсулина нарушается при образовании 1% полимера (Фармакопея США, 1990), сведение к минимуму такого разложения очень важно в снижении нежелательных побочных действий. Поэтому нужны мономерные аналоги, которые бы

были в самоассоциирующем состоянии и образовывали стабильную информацию, при этом сохраняя свойства быстрого всасывания.

5 Добавление ионов некоторых металлов, в основном цинка, усиливают химическую стабильность, заставляя инсулин ассоциироваться и образовывать гексамеры, а именно, Zn (II)-T6 конформацию. Кроме того, фенолы специфически связываются с гексамером инсулина и индуцируют аллостерическое конформационное изменение, когда восемь N-концевых аминокислот В-цепи преобразуются из растянутой конформации в альфа-спираль (Derewenda и др. *Nature*, 338:594-596 (1989)). Такое состояние конформации с фенольной связью известно как Zn (II)-R состояние.

20 В противоположность этим установившимся точкам зрения, что инсулин легко агрегируется в присутствии цинка и образует четкую стабильную структуру Zn-гексамер, ранние исследования мономерных аналогов инсулина выявили, что любая агрегация между цинком и аналогом инсулина отлична от агрегации, наблюдаемой с инсулином. В.Н. Frank. Текст и слайды лекции на Конференции по инсулину "Само-ассоциация и исследование конформации человеческого проинсулина и аналогов инсулина". Йоркский Университет (29 августа - 1 сентября 1989 г.). Кроме того, высокостабильный Zn-гексамерный комплекс, образуемый с инсулином, не наблюдался с мономерными аналогами. Id. Brems и др. *Protein Engineering*, 5:6, 527-533 (1992), раскрывает, что мономерный Lys^{B28}Pro^{B29}-hI меньше склонен к димеризации и самоассоциации в форму с более высокой молекулярной массой, чем человеческий инсулин. Brems и др. продолжает делать вывод, что Asp^{B28}Pro^{B29}-hI, Ala^{B28}Pro^{B29}-hI и Lys^{B28}Pro^{B29}-hI показывают небольшую, или вообще не показывают индуцированную Zn ассоциацию, и что Pro^{B29} инсулин, Lys^{B28} инсулин, Asp^{B28} инсулин и Ala^{B28} инсулин демонстрируют индуцированную Zn ассоциацию, но меньшую, чем Zn-инсулин. Последующие неопубликованные экспериментальные наблюдения настоящими изобретателями предполагают, что ассоциация с цинком наблюдается. Однако такая ассоциация между аналогом и цинком отлична от инсулина. Ассоциация, которая наблюдается с этими аналогами имеет место благодаря множеству форм с высокой молекулярной массой и отлична от преобладающих, четко определенных гексамеров

Zn-инсулин. Поэтому ясно, что мономерные аналоги инсулина не образуют Zn (II)-T₆ конформацию аналогично инсулину.

На фоне этих публикаций настоящее изобретение предлагает получение мономерных аналогов инсулина в виде четко определенного стабильного цинк-фенольного гексамерного комплекса. Этот гексамерный комплекс совершенно отличен от комплексов с инсулином при идентичных условиях. Инсулиновые комплексы с цинком и фенолом имеют Zn (II)-R₆ конформацию. Гексамерный комплекс настоящего изобретения не идентичен этой конформации. И что очень удивительно, гексамерный комплекс аналога инсулина обладает гораздо большей склонностью к диссоциации, чем инсулин. Эта склонность диссоциироваться транслируется в нужное свойство быстрого действия.

Brange и др. в Current Opinion in Structural Biology 1:934-940 (1991) раскрывает различные быстродействующие стабильные мономеры инсулина и констатирует, что очевидным способом создания быстродействующего инсулина является препятствование образованию димера или гексамера. Аналогично (Brange и др. в Diabetes Care 13:923-954, 1990) раскрывают, что если инсулин назначается в качестве гексамера, помимо того, что он более медленно подвергается свободной диффузии, гексамер должен быть более пространственно затруднен, чем мономер, в передвижении в подкожном слое и/или в его прохождении через капиллярную мембрану. Кроме того, при подкожной инъекции Zn (II)-R₆ конформация не диссоциируется непосредственно, а должна трансформироваться через Zn (II)-T₆ конформацию. Эти конформационные изменения и, следовательно, диссоциация задерживают начало активности. Поэтому специалист данной области в то время понимал, что попытки химически стабилизировать мономерный аналог инсулина цинком с образованием четкого гексамерного комплекса не принесут успеха или в случае успеха его действие не будет быстрым.

Настоящий препарат представляет собой гексамерный комплекс, индуцируемый цинком-фенолом, который быстро всасывается. Скорость всасывания гексамерного комплекса по меньшей мере в два раза быстрее скорости инсулина. И этот гексамерный комплекс обладает хорошей стабильностью в сравнении с инсулином в отношении химического распада. Поэтому

му неожиданным результатом настоящего изобретения является то, что оно преобразует мономерный аналог инсулина в четкий стабильный цинкфенольный гексамерный комплекс. Примечательно то, что при образовании этот гексамерный комплекс сохраняет быстродействующие свойства, ассоциируемые с мономерным аналогом инсулина. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает парентеральные препараты гексамерного комплекса аналога инсулина, которые стабильны и быстро действуют.

Это изобретение предлагает комплекс аналога человеческого инсулина, который включает: шесть молекул аналога человеческого инсулина, два иона цинка и по меньшей мере три молекулы фенольного производного, выбранного из группы, состоящей из: м-крезола, фенола или смеси м-крезола и фенола; при этом аналоговый комплекс является гексамером. Далее изобретение предлагает препараты парентерального назначения, включающие гексамерный комплекс.

На фиг. 1 представлен график профиля действия Lys^{B28}Pro^{B29}-hi и человеческого инсулина. График показывает среднюю скорость насыщения глюкозой и демонстрирует преимущество настоящего изобретения.

На фиг. 2 представлен график стабильности Lys^{B28}Pro^{B29}-человеческого инсулина. Стабильность представлена измерением образования полимера аналога инсулина в гексамерной ассоциации в сравнении с мономерным Lys^{B28}Pro^{B29}-человеческим инсулином и инсулином. Чертеж демонстрирует преимущества настоящего изобретения.

На фиг. 3 представлен график диссоциации Lys^{B28}Pro^{B29}-человеческого инсулина в гексамерном комплексе. На графике показана ин витро диссоциация сформированного в препаратах инсулина (o): Lys^{B28}Pro^{B29}-hi препарата гексамерного комплекса (Δ); несформированного в препарат инсулина (·); и мономерного Lys^{B28}Pro^{B29}-hi (*) под статическим рассеянием света на 488 нм под углом 90°. Образцы препаратов содержали 0,5 моль Zn на моль белка, 1,25 мг/мл м-крезола и 1,09 мг/мл фенола, 7 мМ фосфата натрия и 16 мг/мл глицерола. Мономерные образцы и образцы несформованные в препарат не содержали дополнительных наполнителей. На чертеже показаны преимущества настоящего изобретения.

Изобретение предлагает мономерный комплекс аналога человеческого инсули-

на в виде гексамера. Термин "мономерный аналог инсулина" или "аналог человеческого инсулина" здесь означает человеческий инсулин, в котором:

Pro в позиции B28 замещен Asp, Lys, Leu, Val или Ala; и Lys в позиции B29 представляет собой лизин или замещен пролином; des(B28-B30) или des(B27).

Мономерные аналоги инсулина описаны у Chance и др., Публикация ЕПВ № 383472 и Brange и др., публикация ЕПВ № 214826, которые включены сюда ссылкой. Мономерные аналоги инсулина менее подвержены димеризации или самоассоциации, чем инсулин.

Специалисту данной области понятно, что возможны и другие модификации. Эти модификации широко приняты в данной области техники и включают замещение остатка гистидина в позиции B10 аспарагиновой кислотой; замещение остатка фенилаланина в позиции B1 аспарагиновой кислотой; замещение остатка треонина в позиции B30 аланином; замещение остатка серина в позиции B9 аспарагиновой кислотой; делецию аминокислот только в позиции B1 или в комбинации с делецией в позиции B2, и делецию треонина из позиции B30.

Все сокращения аминокислот, используемые в этом раскрытии, приняты Ведомством США по патентам и товарным знакам, как изложено в разделе 37 Кодекса Федеральных правил, §1.822 (в) (2). Наиболее предпочтительным мономерным аналогом инсулина является Lys^{B29}Pro^{B28}-человеческий инсулин (B28 - Lys . B29 - Pro).

Термин "лечение", здесь описывает манипуляции и уход за больным с целью борьбы с заболеванием, состоянием или нарушением и включает назначение соединения настоящего изобретения, чтобы воспрепятствовать появлению симптомов или осложнений, смягчая симптомы или осложнения или снимая заболевание, состояние или нарушение.

Термин "агент изотоничности" относится к агенту, который физиологически переносим и придает нужную тоничность препарату, чтобы воспрепятствовать току воды через клеточную мембрану. Для таких целей при известных концентрациях обычно используют соединения, такие как глицерин.

Термин "фенольное производное" или "фенольный" означает μ -крезол, фенол или смесь μ -крезола и фенола. Желательно, чтобы это был μ -крезол.

Термин "физиологически переносимый буфер" известен. Физиологически переносимый буфер - предпочтительно фосфатный буфер, такой как фосфат натрия. Другие физиологически переносимые буферы включают TRIS, ацетат натрия или цитрат натрия. Выбор и концентрация буфера известна в области техники.

Аналоги инсулина настоящего изобретения комплексуются с ионами цинка и производным фенола, чтобы образовать стабильную гексамерную конформацию. И цинк, и производное фенола являются важными компонентами в получении комплекса, который стабилен и способен быстро диссоциироваться и начать действовать. Гексамерный комплекс состоит из двух ионов цинка на гексамер аналога человеческого инсулина и по меньшей мере трех молекул производного фенола, выбранного из группы, состоящей из μ -крезола, фенола или смеси μ -крезола и фенола.

Растворимый мономерный аналог преобразуется в гексамерный комплекс растворением мономерного аналога в разбавителе, содержащем производное фенола при pH около 7,5 и добавлении цинка. Цинк преимущественно добавляется в виде соли. Примеры солей цинка включают ацетат цинка, бромид цинка, хлорид, фторид, йодид и сульфат цинка. Специалисту известны многие другие соли цинка, которые также могут использоваться в способе настоящего изобретения. Предпочтительно используются ацетат цинка или хлорид цинка, так как эти соли не добавляют новых химических ионов к коммерчески приемлемым способам.

Растворению аналога может способствовать то, что обычно называют кислотным растворением, т.е. pH снижается до около 3,0-3,5 физиологически приемлемой кислотой, лучше HCl, которая помогает растворению мономерного аналога. Другие физиологически приемлемые кислоты включают уксусную кислоту, лимонную кислоту и фосфорную кислоту. Затем pH доводится физиологически приемлемым основанием, лучше гидроксидом натрия до около 7,4-7,5. Другие физиологически приемлемые основания включают гидроксид калия и гидроксид аммония.

Гексамерный комплекс можно ввести в стабильные быстродействующие парентеральные препараты. Концентрация аналога инсулина в препарате составляет около 0,5-20 мг/мл; лучше около 1,2-17,5 мг/мл; еще лучше около 3,5 мг/мл. В общем концентрация цинка составляет

около 10–50 мг/мл. Оптимальная концентрация цинка в препарате от 14 до 35 мг/мл, где два иона цинка связаны с каждым гексамером. В сформованном препарате гексамерный комплекс связывает до семи фенолов. Обычно при формировании в препарат шесть фенолов связываются с гексамером, т.е. желателно добавить к препарату избыточное количество фенола. Фенол действует еще и как консервант. Поэтому предпочтительная концентрация составляет около 23–35 мМ, лучше 29 мМ, причем лучше, если фенолом будет м-крезол.

К препарату можно добавить в качестве изотонического агента глицерин. Концентрация изотонического агента составляет диапазон, известный в области техники для препаратов инсулина, предпочтительно около 16 мг/мл. pH препарата буферизуется физиологически переносимым буфером, предпочтительно фосфатным буфером, таким как фосфат натрия.

До изобретения публикации констатировали, что для быстрого всасывания необходимо избегать агрегации. Поэтому совершенно неожиданным было то, что гексамерный аналог в препарате обеспечивает быстрое начало действия. В отличие от инсулина, препарат гексамерного комплекса аналога инсулина не оказывает отрицательного действия на время, необходимое, чтобы достичь пиковой концентрации аналога инсулина в сыворотке. На фиг. 1 показана средняя скорость насыщения глюкозой при приеме препарата больными, содержащего мономерный $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ (без цинка); препарата гексамера $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$; и обычного человеческого инсулина. Препарат гексамерного комплекса сохраняет быстрое действие мономерного $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$. Скорость всасывания более высокая, чем у обычного человеческого инсулина. Таким образом, результаты на фиг. 1 показывают: первое, гексамерный $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ и мономерный $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ имеют аналогичные скорости всасывания; второе, и гексамерный и мономерный $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ имеют более высокие скорости всасывания, чем инсулин.

Препарат, включающий комплекс аналога инсулина в виде гексамера, стабилен. В сравнительных исследованиях мономерный $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ показывает наибольшую степень разложения с увеличением на 1,63% в неделю образования полимера в течение 6 нед. Человеческий инсулин, несформованный в препарат,

претерпевает образование полимера в меньшей степени – 0,61% в неделю. Однако в препарате степень образования высокомолекулярного полимера снижается до 0,095% для инсулина в неделю. $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ в препарате в виде гексамерного комплекса демонстрирует сниженную степень образования высокомолекулярного полимера в 0,11% в неделю, которая сравнима со степенью инсулина в препарате. Эти исследования приведены в примере 1 и показаны на фиг. 2.

Аналог инсулина настоящего изобретения можно получить любой из множества известных технологий синтеза пептида, включающих классические методы (растворение), твердофазные методы, полусинтетические методы и последние методы рекомбинантной ДНК. Например, Chance и др., Публикация ЕПВ № 383472 и Brange и др., Публикация ЕВР № 214826, раскрывают получение разных мономерных аналогов.

Следующие примеры и препараты предлагаются для дальнейшей иллюстрации получения аналогов инсулина и изобретения. Объем изобретения не следует рассматривать как состоящий только из следующих примеров.

Препаративный пример 1 получения массы белка.

Несформованные в препарат образцы инсулина и $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ готовились с концентрацией 3,5 мг/мл в 7 мМ фосфата натрия и с 1,25 мг/мл м-крезола или без него, 1,09 мг/мл фенола и 16 мг/мл глицерола, в зависимости от проводимого эксперимента. Образцы $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ в виде гексамерного комплекса готовились идентичным образом, за исключением того, что был добавлен цинк, 19,7 мг/мл. Все образцы проходили через кислотную стадию до pH 3,0, когда в серии препаратов был добавлен цинк. Затем pH доводилось до 7,4. Концентрации белка определялись до добавления фенолов УФ абсорбционной спектроскопией с использованием двухлучевого спектрофотометра AVIV, модель 14 DS. Концентрации белка рассчитывались, как описано у Frank B.H., Pekar A.H. и Veros A.I. (1972) Diabetes, 21 (Suppl. 2), 486–491.

Пример 1. Химическая стабильность.

Разложение инициировалось инкубированием инсулина и мономерного и гексамерного $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$, сформованных и несформованных в препараты при 30°C. Сформованные инсулин и гексамер $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-HI}$ содержали: 3,5 мг/мл бел-

ка, 16 мг/мл глицерола, 7 мМ двусосновного гептагидрата натрий фосфата, 1,25 мг/мл м-крезола, 1,09 мг/мл фенола и 0,0245 мг/мл окиси цинка при pH от 7,3 до 7,4. Несформованные инсулин и мономерный $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ содержали: 3,5 мг/мл белка, 16 мг/мл глицерола, 7 мМ двусосновного гептагидрата натрий фосфата, 1,25 мг/мл м-крезола и 1,09 мг/мл фенола при pH от 7,3 до 7,4. Через 7 дн. образцы удалялись из инкубационной камеры и оценивались на образование видов с высокой молекулярной массой с использованием ВЭЖХ исключения размера. Анализ проводился введением 20 м образцов в колонну Dupont Zorbax GF-250 Special (9,4x250 мм) с использованием смеси 0,4 М бикарбоната аммония и ацетонитрила в качестве элюента (скорость потока 0,5 мл/мин при окружающей температуре и обнаружении на 214 нм). Процентное образование полимера определяется из соотношения пика высокомолекулярной массы к общей площади мономера и высокомолекулярных пиковых величин. Результаты показаны на фиг. 2.

Пример 2. Статическое светорассеяние.

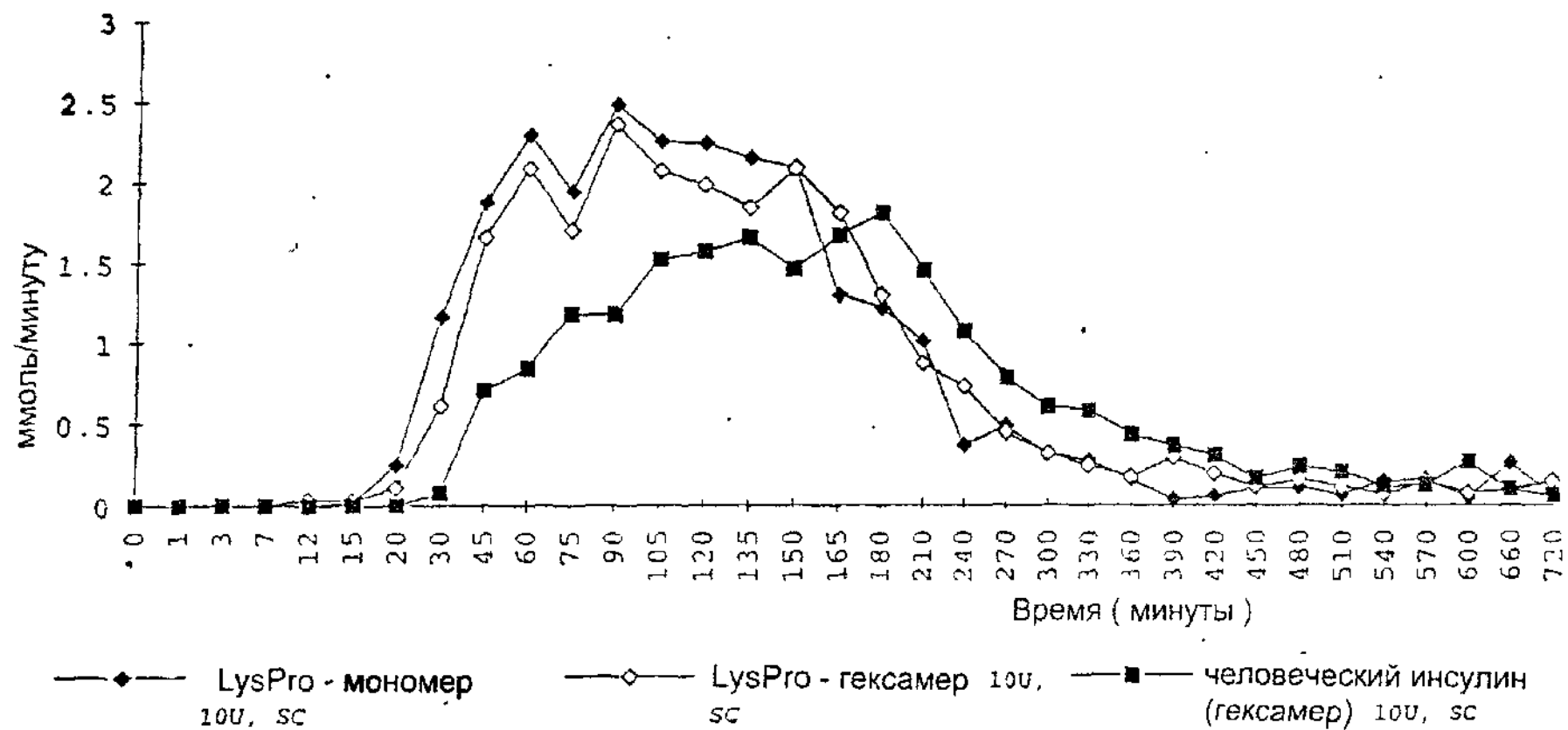
Свойства диссоциации мономерного $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$, $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ в виде гексамерного комплекса и инсулина определялись *ин витро* с использованием статического светорассеяния. Как описано выше, готовились три раствора массы белка, сформованного и несформованного в препараты, за исключением того, что несформованные в препараты растворы массы белка не содержали цинка, глицерола или консервантов. Используя эти 3,5 мг/мл массы, готовилась серия разбавлений как для инсулина, так и для $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ с охватом диапазона концентрации белка от 3,5 до 0,2 мг/мл. Все разбавления делались до окончательного объема в 10 мл 7 мМ буфера фосфата натрия, pH 7,4, с тем, чтобы имитировать подкожный очаг после инъекции. Все растворы фильтровались через 0,2 мм фильтры Гельмана с низким связыванием белка до проведения измерений на статическое светорассея-

ние (SLS). Концентрация белка для этих образцов определялась с использованием хроматографии с обращенной фазой.

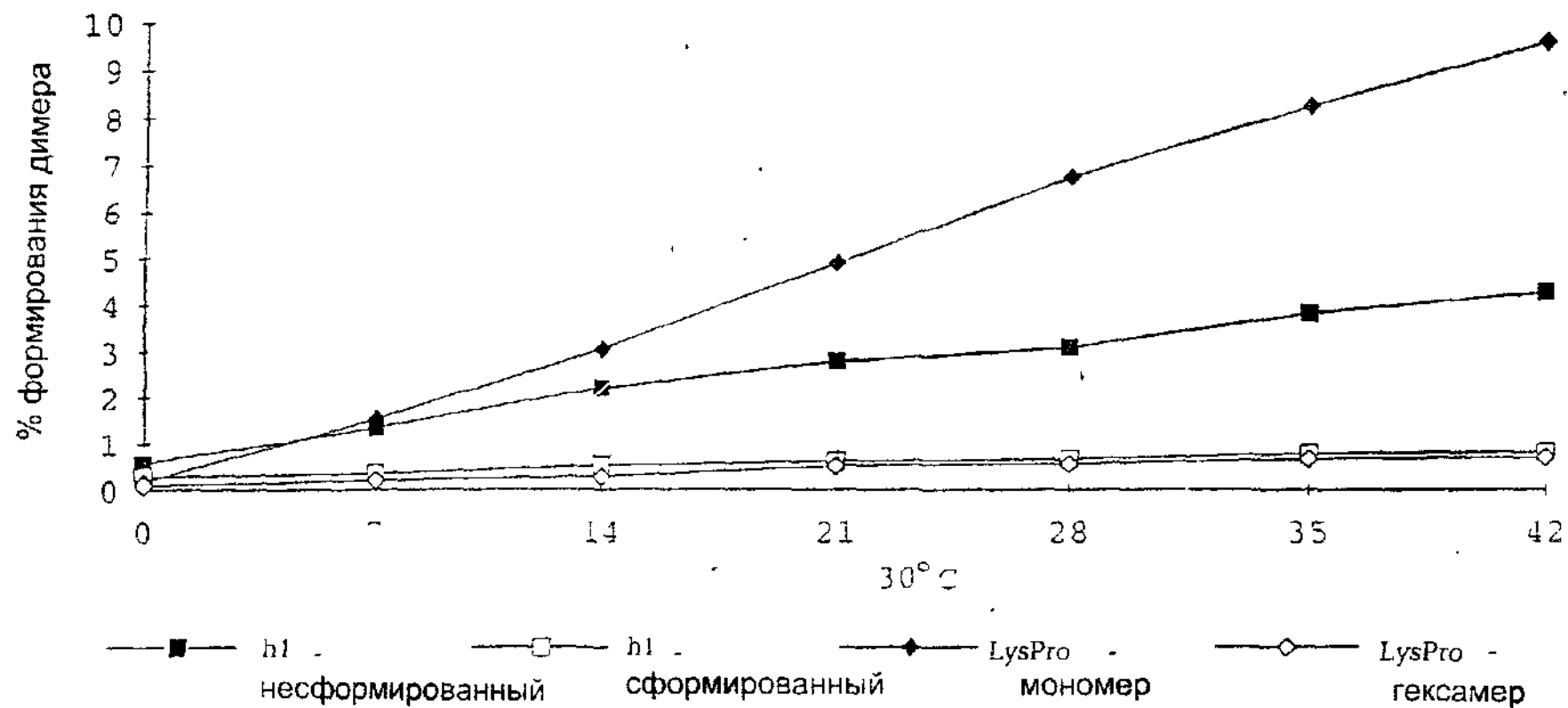
Для анализа образцов, сформованных в препараты, контрольные пробы с растворителем без белка готовились для каждой серии образцов белка. Эти контрольные пробы содержали наполнители в той же концентрации, что и соответствующие серии белковых образцов. Для анализа несформованных в препарат образцов использовалась одна контрольная проба с 7 мМ фосфата натрия. Использование этих соответствующих контрольных проб с растворителем гарантировало, что данные отражают только рассеяние растворенного вещества, и ничего больше из-за измерений в растворителе.

Эксперименты по статическому светорассеянию проводились с использованием автокоррелятора и гониометра Brookhaven Instruments 2030AT. Все измерения проводились с отверстием в 1 мм под углом рассеяния 90° с использованием ионного лазера аргона Lexel модели 3500, установленного на 488 нм. Температура поддерживалась на 25°C температурной баней Neslab RTE-110. Сигнал на трубке фотоэлектронного умножителя калибровался с использованием 0,1 мм профильтрованного толуола.

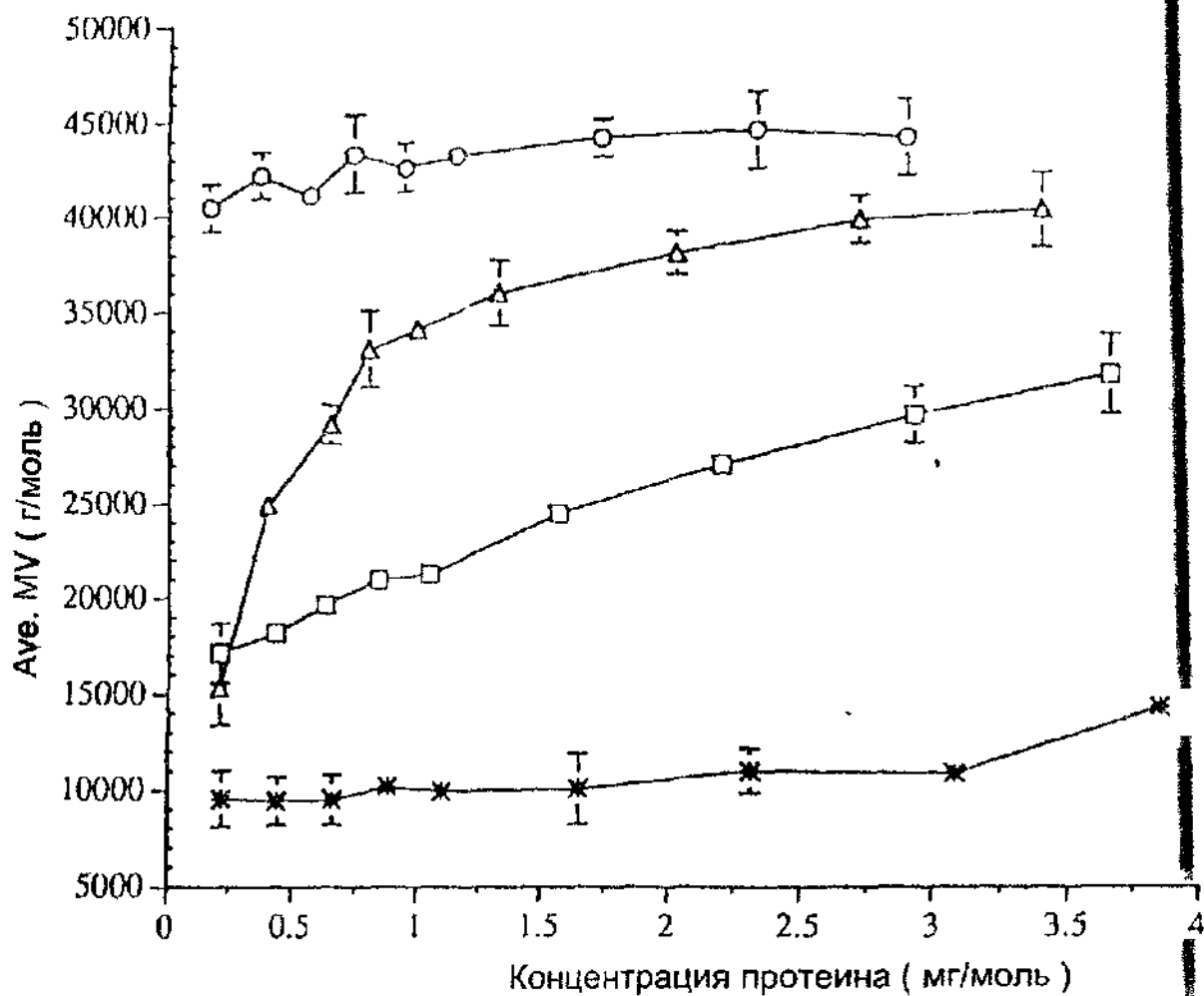
Усредненные молекулярные массы рассчитывались из уравнений, описанных у Cantor, C.R. и Schimmel, P.R., Biophysical Chemistry, W H Freeman and Company, Нью-Йорк, стр. 838-843 (1982). На фиг. 3 показаны результаты исследования светорассеяния. *Ин витро* профили диссоциации $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ в виде гексамерного комплекса и инсулина совершенно разные. Результаты аналога инсулина демонстрируют быструю диссоциацию, что обеспечивает более скорое всасывание, чем человеческий инсулин. Даже если оба препарата включают гексамерные состояния ассоциации и препараты одинаково стабильны к химическому разложению, гексамер $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}\text{-hI}$ имеет большую склонность к диссоциации, чем инсулин.



Фиг.1



Фиг.2



Фиг.3

Упорядник

Техред М. Келемеш

Коректор М. Куль

Замовлення 537

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

