

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 150813B



(21) Patentansøgning nr.: 0424/83

(51) Int.Cl.: A 61 K 37/26

(22) Indleveringsdag: 03 feb 1983

(41) Alm. tilgængelig: 06 aug 1983

(44) Fremlagt: 29 jun 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 05 feb 1982 DK 491/82

(71) Ansøger: *NOVO INDUSTRI A/S; Patent- og Varemærkeafdelingen; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Jens Jørgen Veilgaard *Brange; DK Svend *Havelund; DK

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af stabiliserede insulinopløsninger**

(57) Sammendrag:

424-83

Hidtil ukendte farmaceutiske opløsninger af opløst insulin med forbedret fysisk stabilitet fremstilles ved inkorporering i opløsningerne af et i det væsentlige ioniseret zinksalt i en koncentration svarende til et indhold af zinkioner til rådighed for insulinet på mere end 4 Zn^{2+} /hexamer insulin.

Insulinopløsningerne er særlig egnet til anvendelse i pumpeudstyr til kontinuerlig insulinindgift.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af stabiliserede insulinopløsninger, der er
5 specielt tilpasset til anvendelse i pumpeudstyr til kontinuerlig insulinindgift.

Der har i de senere år været ydet en stadig stigende indsats med henblik på udviklingen af bærebare eller implanterbare systemer til kontinuerlig infusion af insulin.
10 Hovedformålet med disse bestræbelser har været at give diabetespatienten mulighed for at administrere insulin på en måde, som er lettere at tilpasse til de døgnmæssige variationer i patientens fysiologiske insulinbehov, end det har været muligt ved konventionel behandling med insulin.

15 Den mekaniske del af en anordning til kontinuerlig insulinindgift omfatter i det væsentlige sådanne elementer som et insulinreservoir, et pumpesystem og et katheter tilpasset efter den valgte administrationsmetode, som sædvanligvis er subkutan, intravenøs eller intraperitoneal.

20 Pumpesystemet kan være automatisk aktiverbart og kan også forsynes med en yderligere manuel regulering af indgiften af insulin, når der er et særligt behov herfor.

Hvis insulinopløsningen tilføres fra en sprøjte, vil denne også sædvanligvis fungere som insulinreservoir.
25 Anordninger af sprøjtetypen bæres sædvanligvis udenpå kroppen. Der er imidlertid også blevet udviklet betydelig mere komplicerede systemer, i hvilke hele den mekaniske enhed er konstrueret med henblik på implantering, sædvanligvis subkutan. Insulinreservoiret vil sædvanligvis være tilpasset til
30 perkutan genopfyldning.

Insulinets tilbøjelighed til udfældning i kommercielt tilgængelige opløsninger, hvorved både de mekaniske dele og infusionskatheteret tilstoppes, har vist sig at udgøre en væsentlig hindring for videreudvikling og klinisk
35 anvendelse af pumpeudstyr til kontinuerlig infusion. Herudover bestræber man sig af nærliggende grunde på at udvikle stadig mindre typer af insulinpumper. Derved opstår der et

behov for mere koncentrerede insulinopløsninger end de, der hidtil har været tilgængelige, hvilket formentlig yderligere medvirker til at forværre de ovennævnte problemer.

Det antages almindeligvis, at forklaringen på
5 udfældningsfænomenet skal søges i insulinets tendens til at danne uopløselige fibriller, især hvis insulinopløsninger anvendes ved højere temperaturer i længere tid. Visse kendsgerninger tyder også på, at enhver art af bevægelse af eller i opløsningen, herunder f.eks. den turbulens, der induceres
10 ved opløsningens passage gennem et lille tværsnit eller en snæver åbning, bevirker insulinfibrillering. Det er indlysende, at insulinopløsninger udsættes for de fleste af eller alle sådanne påvirkninger i enhver form for insulinpumpeudstyr. De kendte insulinpræparaters generelle mangler i så
15 henseende er fyldestgørende dokumenteret i litteraturen, f.eks. i en publiceret oversigtsartikel af W.D. Loughheed et al. (Diabetologia vol. 19 (1980), s. 1 - 9).

For at løse dette problem har det været foreslået at anvende sure insulinopløsninger, der indeholder glutaminsyre eller asparaginsyre, se Diabetes 30, (1981), 83, eller neutrale insulinpræparater, der indeholder en sukkerart, såsom glucose (D.S. Schade et al.: Satellite-Symposium to 16th European Association for the Study of Diabetes-Meeting, Greece, 22. - 23. sept., 1980, side 107). Det er yderligere
25 blevet foreslået at anvende et ikke-ionisk overfladeaktivt middel (H. Thurow: Tysk offentliggørelsesskrift nr. 29 52 119).

Insulin er imidlertid kemisk ustabil i syre selv under legemstemperatur, og kan reversibelt eller irreversibelt reagere med kulhydrater, jfr. J. Brange and S. Havellund, "Properties of Insulin in Solution", in Artificial Systems for Insulin Delivery, Assisi 20. - 23. september, 1981, Editors: P. Brunetti et al. Raven Press, 1983. Endvidere må ovenfor nævnte ikke fysiologiske, overfladeaktive
35 middel betragtes som uønsket i lægemidler til parenteral anvendelse.

Den foreliggende opfindelse afhjælper de ovenfor nævnte ulemper og vedrører en fremgangsmåde til fremstilling af insulinopløsninger, i hvilke insulinet i sammenligning med konventionelle insulinpræparater udviser en væsentlig 5 formindsket tilbøjelighed til udfældning under de betingelser, der hersker i insulinpumpeudstyr.

Opfindelsen er baseret på den overraskende erkendelse, at zinkioner i visse koncentrationer udøver en høj stabiliserende effekt på neutrale insulinopløsninger.

10 Zink er blevet anvendt i årevis som krystallisationsfremmende metal ved fremstillingen af insulinkrystaller. Insulinkrystaller anvendt til fremstilling af neutrale insulinopløsninger indeholder derfor sædvanligvis zink, jfr. f.eks. britisk patentskrift nr. 840.870, der svarer til 15 dansk patentskrift nr. 95007, og dansk patentskrift nr. 116.527.

Det fremgår imidlertid af det ovennævnte danske patentskrift nr. 95007, at insulinopløsningen bør have et indhold af zinkioner til rådighed for insulin på mindre end 20 $13 \times A \times 10^{-3}$ milli-ækvivalenter zinkioner pr. liter, hvor A angiver antallet af internationale insulinheder pr. ml, svarende til et indhold af zinkioner på mindre end ca. 1 vægt% (beregnet på basis af tørinsulinkrystaller).

I nærværelse af forbindelser, der danner letopløselige forbindelser eller kompleksforbindelser med zink, kan 25 præparaterne indeholde betydeligt mere zink, hvis blot mængden af zinkioner til rådighed for insulinet, og følgelig ikke bundet af sådanne forbindelser, ikke overstiger den ovennævnte øvre grænse.

30 Hvis indholdet af zinkioner til rådighed for insulin overstiger den ovennævnte øvre grænse på ca. 1 vægtprocent, svarende til ca. 5 Zn^{2+} /hexamer insulin, udfælder zinkinsulinkomplekser fra opløsningen.

Da langt den overvejende del af insulin i neutrale 35 opløsninger forekommer som insulinhexamere, er det i nærværende beskrivelse valgt at udtrykke zinkmængden pr. 6 molekyler monomer insulin. Det er uden betydning for denne

beregningsmetode, om der er mere eller mindre mængder af andre associeringsformer af insulin til stede, såsom dimere eller hexamere. Sammenhængen mellem zink²⁺/hexamer insulin og % zink fremgår af følgende ligning:

5

$$\text{Zn}^{2+}/\text{hexamer insulin} = \frac{\% \text{ zink} \times \text{MW}_{\text{ins}} \times 6}{\text{MW}_{\text{Zn}} \times 100}$$

hvor MW står for molekylvægt.

10

For at sikre sig, at en udfældning af zinkinsulin-komplekser undgås, har zinkinsulinindholdet i kommercielle insulinpræparater altid været holdt et godt stykke under den ovennævnte øvre grænse, og en undersøgelse af alle af ansøgerne kendte, kommercielle, neutrale insulinpræparater har vist, at zinkionkoncentrationen i kendte præparater er ca. 2 - 3,5 Zn²⁺/hexamer insulin. Også de i ovennævnte danske patentskrift nr. 95007 fremstillede præparater har et zink-indhold væsentligt under den øvre grænse for udfældning af zink-insulinkomplekser, idet det højeste indhold af zink er på 0,7% zink baseret på tørstofinsulin, hvilket svarer til ca. 3,7 Zn²⁺/hexamer.

15

Det fremgår imidlertid af fig. 1, at insulinpræparater med et zinkionindhold på 2 og endog op til 4 Zn²⁺/hexamer insulin er ustabile under betingelser, der efterligner forholdene for en kontinuerlig insulinindgift, fordi insulin udfælder i løbet af få dage. De i ovennævnte danske patentskrift nr. 95007 beskrevne insulinpræparater er derfor uegnede til kontinuerlig indgift, da de ligger inden for det ustabile område i fig. 1. Dette er yderligere bekræftet ved forsøg, hvor det af ansøgerne er påvist, at et præparat fremstillet som beskrevet i eksempel 2 i dansk patentskrift nr. 95007 og indeholdende 0,7% zink har en stabilitetsfaktor på kun 2,5, hvilket betyder, at præparatet er for ustabil til at kunne anvendes til kontinuerlig indgift.

30

Det er derfor en overraskende erkendelse, at en forøgelse af zinkioner til visse specifikke koncentrationer

35

netop under den øvre grænse for zinkinsulinudfældning på ca. 5 Zn^{2+} /hexamer insulin udøver en stabiliserende effekt på insulinopløsninger under de ovenfor beskrevne betingelser for kontinuerlig insulinindgift.

5 Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af en insulinopløsning med en pH-værdi mellem ca. 7 og ca. 8, egnet til anvendelse ved kontinuerlig insulinindgift ved at være fysisk stabil under betingelser for en sådan indgift, og eventuelt omfattende et konserve-
10 ringsmiddel, et middel, der gør opløsningen isotonisk, en puffer og et kompleksdannende middel, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der i nævnte insulinopløsning inkorporeres et i det væsentlige ioniseret zinksalt i en koncentration svarende til et indhold af zinkioner til rådighed
15 for insulin på mere end 4 Zn^{2+} /hexamer insulin, men under grænsen for udfældning af zink-insulinkomplekser.

Med udtrykket "zinkioner til rådighed for insulin" skal der forstås zinkioner, der ikke er bundet til andre forbindelser, som danner kompleksforbindelser med zink,
20 f.eks. citrat, glycin eller phosphat.

Den øvre grænse for zinkionindholdet er den mængde zink, der bevirker udfældning af zinkinsulinkomplekser, d.v.s. ca. 5 Zn^{2+} /hexamer insulin, som nævnt ovenfor.

Ifølge en foretrukket udførelsesform for den fore-
25 liggende opfindelse overstiger indholdet af zinkioner til rådighed for insulin ikke 4,8 Zn^{2+} /hexamer insulin, og indholdet af zinkioner til rådighed for insulin ligger fortrinsvis i området fra ca. 4,2 - ca. 4,5 Zn^{2+} /hexamer insulin.

30 Foretrukne zinksalte er zinkacetat og zinkchlorid.

Ifølge en yderligere foretrukket udførelsesform for opfindelsen anvendes der fenol som konserveringsmiddel og glycerol som middel til at gøre opløsningen isotonisk.

Som nævnt tidligere refererer indholdet af zink
35 til zinkioner, der er til rådighed for insulin. I nærværelse af zinkkompleksdannende midler bindes noget af zinken til det kompleksdannende middel. Da imidlertid indholdet af

zinkioner, der er til rådighed for insulin, stadig skal være over 4 Zn^{2+} /hexamer insulin, må der tilsættes mere zink. Det totale indhold af zink i insulinpræparater, der omfatter et zinkkompleksdannende middel, ligger derfor mere eller mindre 5 over de ovenfor nævnte grænser afhængig af mængden af det anvendte kompleksdannende middel og dettes komplekskonstant.

Det foretrækkes ofte af anvende et zinkkompleksdannende middel, hvorved der sikres et større operabelt område for det totale zinkindhold baseret på insulinindholdet. Hvis f.eks. noget af det udstyr, der anvendes til 10 reservoir, pumpesystem, slanger etc., binder eller frigør zink, vil tilstedeværelsen af et zinkkompleksdannende middel sikre, at indholdet af zinkioner til rådighed for insulin vil ligge indenfor området ifølge den foreliggende opfindelse. 15 se.

Når insulinopløsningen indeholder et zinkkompleksdannende middel har det vist sig, at opløsningen for at være fysisk stabil under betingelserne for en kontinuerlig insulinindgift skal udvise et totalt zinkionindhold på mindst 5 20 Zn^{2+} /hexamer insulin, og i en foretrukket udførelsesform for den foreliggende opfindelse, indstilles det totale zinkindhold til mindst 6 Zn^{2+} /hexamer insulin.

De zinkkompleksdannende midler, der anvendes i de hidtil ukendte insulinopløsninger, bør være opløselige og 25 fysiologisk acceptable.

Egnede zinkkompleksdannende midler er aminosyrer, f.eks. glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin, phenylalanin, prolin, tryptophan, asparagin, glutaminsyre og histidin, og oligopeptider, såsom diglycin.

30 En anden gruppe af egnede zinkkompleksdannende midler er carboxylsyrer, såsom eddikesyre, eller hydroxycarboxylsyrer, såsom citronsyre, 3-hydroxysmørsyre og mælkesyre.

Foretrukne zinkkompleksdannende midler er glycin 35 og citronsyre. Også foretrukne er diglycin og histidin.

Den mindste totale zinkionkoncentration til opnåelse af en væsentlig stabiliserende effekt, d.v.s. en stabi-

litetsfaktor (som defineret i den detaljerede del af beskrivelsen) i området fra 5 - 10, afhænger af hvilket kompleksdannende middel, der anvendes. Imidlertid foretrækkes en stabilitetsfaktor over 10.

5 Hvis der anvendes et svagt kompleksdannende middel, f.eks. glycin 10 mM, opnås der en tydelig stabilisering ved et totalt zinkindhold på ca. 5 Zn^{2+} /hexamer insulin, jfr. tabel I og fig. II, og det foretrukne område for det totale zinkindhold er fra ca. 5 til ca. 8 Zn^{2+} /hexamer
10 insulin.

Tabel I

40 IU svineinsulin per ml i en 10^{-2} molær opløsning af glycin med zinkkoncentrationen varieret, fremstillet analogt
15 med eksempel 7.

Zinkkoncentration (M)	Zn^{2+} per * hexamer insulin	Stabilitets- faktor
20 1,0 10^{-4}	2,4	1
1,8 10^{-4}	4,4	4
2,0 10^{-4}	4,9	7
2,2 10^{-4}	5,4	45
25 2,6 10^{-4}	6,4	49
3,4 10^{-4}	8,4	8
3,8 10^{-4}	9,4	10
4,0 10^{-4}	9,9	15

30 * Totalt indhold af zinkioner.

Sammenhængen mellem total Zn^{2+} /hexamer insulin, den molære zinkkoncentration og internationale insulinenheder
35 kan beregnes som følger:

$$(\text{Zn}) = X \cdot 0,99 \cdot 10^{-6} \cdot Y \text{ mol/liter, hvor}$$

(Zn) er den molære zinkkoncentration udtrykt i mol/liter,

X = internationale insulinenheder pr. ml. og

Y = Zn^{2+} /hexamer insulin

- 5 Hvis der anvendes et stærkere zinkkompleksdannende middel, f.eks. citronsyre, kræves der et totalt zinkindhold på fra ca. 40 til 200 Zn^{2+} /hexamer insulin for at opnå en betydelig stabilisering, jfr. den følgende tabel II.

Når citronsyre anvendes som kompleksmiddel kan det foretrukne totale zinkindhold ved pH 7,4 i millimol udtrykkes som $0,004 \times A + k \times B$, hvor A er internationale insulinenheder pr. ml og B er den millimolære citratkoncentration. k ligger indenfor området fra 0,5 - 1,0, idet en k-værdi på ca. 0,7 - 0,8 foretrækkes.

15 Tabel II

40 IU svineinsulin pr. ml med varierende zink- og citratkoncentrationer, fremstillet analogt med eksempel 8.

20	Zinkkoncentration (M)	Zn^{2+} pr. * hexamer insulin	Citrat (M)	Stabilitetsfaktor
25	$1,0 \cdot 10^{-4}$	2	10^{-2}	1
	$0,6 \cdot 10^{-2}$	150	10^{-2}	6
	$0,8 \cdot 10^{-2}$	200	10^{-2}	10
	$0,9 \cdot 10^{-2}$	225	10^{-2}	10
	$0,95 \cdot 10^{-2}$	238	10^{-2}	19
30	$1,0 \cdot 10^{-4}$	2	$2,0 \cdot 10^{-3}$	1
	$1,6 \cdot 10^{-3}$	40	$2,0 \cdot 10^{-3}$	6
	$1,8 \cdot 10^{-3}$	45	$2,0 \cdot 10^{-3}$	30
	$2,0 \cdot 10^{-3}$	50	$2,0 \cdot 10^{-3}$	19

35 * Totalt indhold af zinkioner.

Når der anvendes et zinkkompleksdannende middel, er den øvre grænse for det totale zinkindhold den mængde zink, der bevirker en udfældning af zinkinsulinkomplekset, d.v.s. når indholdet af zinkioner, der ikke er bundet af det 5 kompleksdannende middel, overstiger ca. 5 Zn^{2+} /hexamer insulin.

Den i det følgende beskrevne stabilitetstest kan anvendes som et middel til at sikre sig, at der med de anvendte kompleksdannende midler tilvejebringes det 10 foretrukne interval på $4,2 - 4,5 \text{ Zn}^{2+}$ /hexamer insulin til rådighed for insulinet. Det totale zinkindhold i insulinopløsninger, der indeholder kompleksdannende middel, kan forventes at ligge mellem 5 og 10 Zn^{2+} /hexamer insulin, når der anvendes svage kompleksdannende midler, og kan forventes at 15 ligge fra ca. 10 til ca. 200 Zn^{2+} /hexamer insulin, når der anvendes stærke kompleksdannende midler.

Foruden stabilitetstesten kan den øvre grænse for det totale zinkindhold, d.v.s. det zinkindhold, der bevirker en udfældning af zinkinsulinkomplekser, anvendes til at 20 bestemme den mængde totalt zink i en insulinopløsning indeholdende kompleksemiddel, ved hvilken der opnås en væsentlig forøgelse i stabiliteten.

Det har vist sig, at den totale mængde af zinkioner i en insulinopløsning indeholdende kompleksdannende 25 middel kan forventes at være fra ca. 50 til ca. 90% af den mængde zinkioner, der ville bevirke en udfældning af zinkinsulinkomplekser.

Den totale mængde af zinkioner er fortrinsvis fra ca. 60 til ca. 90% og mere foretrukket fra ca. 75 til ca. 30 90% af den mængde zinkioner, der ville bevirke udfældning af zinkinsulinkomplekser.

Neutrale insulinpræparater indeholdende kompleksdannende midler eller puffere, der danner komplekser med zink, er kendt fra beskrivelsen til det ovennævnte danske 35 patent nr. 116.527 og fra beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 1851/80. Det højeste, beskrevne zinkindhold er imidlertid 1% Zn beregnet på vægten af tørinsulin svarende

til ca. $5,5 \text{ Zn}^{2+}$ /hexamer insulin. Ansøgerne har reproduceret eksempel 2 og 6 i dansk patentskrift nr. 116 527, jfr. de efterfølgende eksempler 9 og 10. Det fremgår heraf, at de kendte præparater udviser en stabilitetsfaktor på kun henholdsvis 3,5 og 1. Det kan derfor indirekte sluttes, at disse præparaters indhold af zink til rådighed for insulin, d.v.s. zink, der ikke er bundet til det kompleksdannende middel, ligger under 4 Zn^{2+} /hexamer insulin. Dette skyldes, at de kendte præparater begge indeholder kompleksdannende midler, nemlig henholdsvis phosphatpuffer og citratpuffer. En del af zinken vil derfor være bundet til det kompleksdannende middel og er derfor ikke til rådighed for insulinet, og de kendte præparater er som påvist uegnede til kontinuerlig insulin indgift, idet de har for ringe fysisk stabilitet til en sådan indgift. De øvrige eksempler i dansk patentskrift nr. 116.527 beskriver præparater med et zinkindhold på mellem 0,1 og 0,5% zink (total zink). Disse præparater ligger derfor uden for det ifølge den foreliggende opfindelse foretrukne område.

Koncentrationen af insulin i opløsningen fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse ligger fortrinsvis i området fra 5 - 750 I.U. og især fra 40 - 500 I.U. pr. ml. Insulinopløsningerne kan f.eks. fremstilles ved at opløse krystallinsk zinkinsulin, f.eks. en højtrenset form for insulin, såsom "monokomponent" insulin (jfr. britisk patentskrift nr. 1.285.023) i vand i nærværelse af en syre, f.eks. saltsyre. En vandig opløsning af konserveringsmidlet, f.eks. fenol eller en alkylfenol, såsom cresol, eller methylparahydroxybenzoat, fremstilles særskilt og kan om ønsket også indeholde et middel til regulering af osmotisk tryk, såsom glycerol, fortrinsvis i en mængde beregnet til at gøre den endelige opløsning isotonisk, og om ønsket et zinkkompleksdannende middel, såsom citrat eller glycin. Denne opløsning sættes derpå til den sure insulinopløsning efterfulgt af tilsætning af en base, f.eks. natriumhydroxidopløsning, til indstilling til en neutral pH-værdi. I nærværende ansøgning forstås der ved neutral pH-værdi en pH-værdi i området fra

ca. 7 - ca. 8. Den beregnede mængde af zinksaltet, f.eks. zinkacetat, pufferen (om ønsket) f.eks. TRIS, og det zink-kompleksdannende middel kan tilsættes på dette trin, hvorefter pH-værdien genjusteres. Zinksaltet kan alternativt
5 inkorporeres i den sure insulinopløsning før dennes neutralisation. Den fremkomne opløsning fyldes til slut op til det ønskede rumfang med vand, steriliseres ved filtrering og overføres derpå til sterile ampuller.

10 Stabilitetstest

De således fremstillede insulinopløsninger underkastes en stabilitetstest under forcerede betingelser på følgende måde:

Ampuller med et rumindhold på 12,5 ml, der hver
15 indeholder en 10 ml prøve af opløsningen og er forsynet med en gummihætte, anbringes lodret på en rysteplatform (Type 01 T623TBSH02, indkøbt hos HETO, Birkerød, Danmark), som er fuldstændig neddyppet i et vandbad, der holdes ved en temperatur på $41^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Platformen udsættes for en vandret
20 rystebevægelse med en frekvens på 100 rpm og en amplitude på 50 mm.

Opalescensen af prøverne måles med regelmæssige tidsintervaller på et Fischer DRT 1000 nephelometer udstyret med en ampuladaptor. Fibrilleringstiden defineres som den
25 tid, der hengår, indtil prøven udvikler en turbiditet på 10 nephelometriske turbiditetsenheder (NTU).

Hver test udføres med testprøver og kontrolprøver uden tilsat zinksalt (4 - 5 ampuller af hver), der behandles side om side. Kontrolprøverne svarer til testprøverne bort-
30 set fra, at kontrolprøverne indeholder ca. 2 Zn^{2+} /hexamer insulin, idet zinkindholdet i kontrolprøverne stammer fra krystalliseringen af insulinet. Stabilitetsfaktoren beregnes som forholdet mellem de gennemsnitlige fibrilleringstider for henholdsvis testprøver og kontrolprøver:

35 Opfindelsen skal forklares i yderligere detaljer under henvisning til tegningen, på hvilken

Fig. 1 viser stabilitetsfaktoren ved 40°C som en funktion af zinkionkoncentrationen (100 I.U. svineinsulin pr. ml. fremstillet ifølge eksempel 1), og

Fig. 2 viser stabilitetsfaktoren ved 41°C som en funktion af det totale indhold af zinkioner i nærværelse af et svagt kompleksdannende middel (40 I.U. svineinsulin pr. ml. i 10 mM glycine fremstillet analogt med eks. 7).

Det fremgår af fig. 1, at stabiliteten af insulinopløsningen forøges drastisk, når zinkionindholdet er over 4 Zn^{2+} /hexamer insulin.

I nærværelse af et svagt kompleksdannende middel opnås en væsentlig forøgelse af stabiliteten ved et højere zinkionindhold, f.eks. over 5 Zn^{2+} /hexamer insulin, fordi noget af zinken er bundet til det kompleksdannende middel og følgelig ikke er til rådighed for insulinet.

Yderligere detaljer angående udøvelsen af den foreliggende opfindelse fremgår af de efterfølgende eksempler.

I eksemplerne blev vandige opløsninger og vand steriliseret førstnævnte ved filtrering, og de efterfølgende operationer blev udført under aseptiske betingelser.

Eksempel 1

100 I.U. svineinsulin pr. ml indeholdende 4,2 Zn^{2+} /hexamer insulin.

Krystallinsk monokomponent svineinsulin (264 mg) med et zinkindhold på 0,4% og en total aktivitet på 10.000 I.U. blev opløst i vand (50 ml) indeholdende saltsyre (325 μl normal), hvorpå der blev tilsat en vandig opløsning (25 ml) indeholdende 1,6 g glycerol og 200 mg fenol. pH-værdien af opløsningen blev indstillet til 7,5 ved hjælp af en natriumhydroxidopløsning. Zinkacetat (1,56 ml 10 mM opløsning) blev tilsat, og pH-værdien blev genjusteret til 7,5, og det totale rumfang blev fyldt op til 100 ml med vand. Den

fremkomne opløsning blev steriliseret ved filtrering og derpå overført aseptisk til ampuller (10 ml).

Stabilitetsfaktor: > 15.

5

Eksempel 2

500 I.U. svineinsulin pr. ml indeholdende 4,2 Zn^{2+} /hexamer insulin.

10

Krystallinsk monokomponent svineinsulin (20,75 g) indeholdende 0,4% zink og med en total aktivitet på 550.000 I.U. blev opløst i 550 ml vand indeholdende saltsyre (10 ml normal).

15

Til en prøve af denne opløsning (50 ml) blev der sat zinkacetat (78 μl molær opløsning) efterfulgt af tilsætning af 25 ml af en vandig opløsning indeholdende 1,6 g glycerol og 200 mg fenol. pH-værdien af opløsningen blev indstillet til 7,4 ved hjælp af natriumhydroxidopløsning, og det totale rumfang blev indstillet til 100 ml med vand. Den fremkomne opløsning blev steriliseret ved filtrering og derpå aseptisk overført til ampuller (10 ml).

20

Stabilitetsfaktor: 5.

25

Eksempel 3

100 I.U. humaninsulin pr. ml indeholdende 4,3 Zn^{2+} /hexamer insulin.

30

Krystallinsk monokomponent humaninsulin (1,67 g) indeholdende 0,4% zink og med en total aktivitet på 45.000 I.U. blev opløst i 225 ml vand indeholdende saltsyre (1,46 ml normal). Til en prøve af denne opløsning (25 ml) blev der sat zinkacetat (100 μl 0,1 molær opløsning), hvorpå der blev tilsat 10 ml af en vandig opløsning indeholdende 0,8 g gly-

35

cerol og 0,1 g fenol. pH-værdien af opløsningen blev indstillet til 7,4 ved hjælp af natriumhydroxidopløsning, og rumfanget blev indstillet til 50 ml med vand. Den fremkomne opløsning blev steriliseret ved filtrering og derpå aseptisk overført til ampuller (10 ml).

Stabilitetsfaktor: 26.

Eksempel 4

10

100 I.U. svineinsulin pr. ml indeholdende 4,5 Zn^{2+} /hexamer insulin.

15

Proceduren var analog med den i eksempel 1 beskrevet med undtagelse af, at 1,89 ml af en 10 mM zinkacetatopløsning blev tilsat for at tilvejebringe 4,5 Zn^{2+} /hexamer insulin.

20 Stabilitetsfaktor: > 33.

Eksempel 5

40 I.U. humaninsulin pr. ml indeholdende 4,2 Zn^{2+} /hexamer insulin.

Krystallinsk monokomponent humaninsulin (741 mg) indeholdende 0,4% zink og med en total aktivitet på 20.000 I.U. blev opløst i 60 ml vand indeholdende saltsyre (640 μl normal) og zinkacetat (3,96 ml 0,01 M). 400 ml af en vandig opløsning indeholdende 1 g fenol og 8 g glycerol blev tilsat, hvorpå pH-værdien blev indstillet til 7,45 ved hjælp af en natriumhydroxidopløsning, og rumfanget blev fyldt op til 500 ml med vand. Opløsningen blev steriliseret ved filtrering og derpå overført aseptisk til ampuller (10 ml).

Stabilitetsfaktor: 34.

Eksempel 6

5 100 I.U. humaninsulin pr. ml indeholdende 4,2
Zn²⁺/hexamer insulin i 10⁻² molær TRIS.

Krystallinsk monokomponent humaninsulin (1852 mg)
10 indeholdende 0,4% zink og med en total aktivitet på 50.000
I.U. blev opløst i 60 ml vand indeholdende saltsyre (1600 µl
normal) og zinkacetat (99 µl molær). 400 ml af en vandig
opløsning indeholdende 1 g fenol og 8 g glycerol blev til-
sat, hvorpå pH-værdien blev indstillet til 7,45 med TRIS
15 (606 mg) og natriumhydroxidopløsning, og rumfanget blev
indstillet til 500 ml med vand. Den fremkomne opløsning blev
steriliseret ved filtrering og derpå aseptisk overført til
ampuller (10 ml).

20 Stabilitetsfaktor: 16.

Eksempel 7

40 I.U. svineinsulin pr. ml i $2,6 \cdot 10^{-4}$ og 10⁻²
25 molær opløsning af henholdsvis zink og glycin. Zn²⁺/hexamer
insulin = 6,4.

Krystallinsk monokomponent svineinsulin (1,49 g)
30 indeholdende 0,4% zink og med en total aktivitet på 40.000
I.U. blev opløst i 120 ml vand indeholdende saltsyre (1280
µl normal) efterfulgt af tilsætning af 730 ml af en vandig
opløsning indeholdende 2 g fenol, 8 g glycerol og 751 mg
glycin. pH-værdien blev indstillet til 7,5 ved hjælp af
35 natriumhydroxidopløsning. Zinkacetat (160 µl molær) blev
tilsat, pH-værdien blev indstillet til 7,5, og rumfanget
blev indstillet til 1000 ml med vand. Opløsningen blev ste-

riliseret ved filtrering og derpå overført aseptisk til ampuller (10 ml).

Stabilitetsfaktor: 49.

5

Eksempel 8

40 I.U. svineinsulin pr. ml i $1,8 \cdot 10^{-3}$ og $2 \cdot 10^{-3}$ molær opløsning af henholdsvis zink og citrat. Zn^{2+} /hexamer insulin = 45

Krystallinsk monokomponent svineinsulin (746 mg) indeholdende 0,4% zink og med en total aktivitet på 20.000 I.U. blev opløst i 60 ml vand indeholdende saltsyre (640 μl normal). 400 ml af en vandig opløsning indeholdende 1 g fenol og 8 g glycerol blev tilsat, og pH-værdien blev indstillet til 7,5 med natriumhydroxidopløsning. Citronsyre (210 mg monohydrat) og zinkacetat (850 μl molær) blev til-

15 I.U. blev opløst i 60 ml vand indeholdende saltsyre (640 μl normal). 400 ml af en vandig opløsning indeholdende 1 g fenol og 8 g glycerol blev tilsat, og pH-værdien blev indstillet til 7,5 med natriumhydroxidopløsning. Citronsyre (210 mg monohydrat) og zinkacetat (850 μl molær) blev til-

20 sat, og pH-værdien blev indstillet til 7,5. Opløsningen blev steriliseret ved filtrering og derpå overført aseptisk til ampuller (10 ml).

Stabilitetsfaktor: 30.

25

Eksempel 9 (sammenligning)

40 I.U. okseinsulin pr. ml i 13,3 mM natriumphosphatopløsning. (Total zink 1% $\sim 5,5 \text{ Zn}^{2+}$ /hexamer insulin).

30

Eksempel 2 i dansk patentskrift nr. 116.527 blev reproduceret. Zinkindholdet blev indstillet til ca. 5,5 Zn^{2+} /hexamer insulin ved tilsætning af zinkacetat, og pH-værdien blev indstillet til 6,91. Opløsningen blev steriliseret ved filtrering og derpå overført aseptisk til ampuller (10 ml).

Stabilitetsfaktor: 3,5

Eksempel 10 (sammenligning)

5 40 I.U. okseinsulin pr. ml i 10 mM citratopløs-
ning. (Totalt zink 1% $\sim$ ca. 5,5 Zn^{2+} /hexamer insulin).

Eksempel 6 i dansk patentskrift nr. 116.527 blev
10 reproduceret. Zinkindholdet blev indstillet til ca. 5,5
 Zn^{2+} /hexamer insulin ved tilsætning af zinkacetat, og pH-
værdien blev indstillet til 7,5. Opløsningen blev sterilise-
ret ved filtrering og derpå overført aseptisk til ampuller
(10 ml).

15

Stabilitetsfaktor: 1

5 PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en insulinopløsning med en pH-værdi mellem ca. 7 og ca. 8 egnet til
10 anvendelse ved kontinuerlig insulinindgift ved at være fysisk stabil under betingelser for en sådan indgift og eventuelt omfattende et konserveringsmiddel, et middel til at gøre opløsningen isotonisk, en puffer og et kompleksdannende middel, k e n d e t e g n e t ved, at der i nævnte
15 insulinopløsning inkorporeres et i det væsentlige ioniseret zinksalt i en koncentration svarende til et indhold af zinkioner til rådighed for insulin på mere end 4 Zn^{2+} /hexamer insulin, men under grænsen for udfældning af zink-insulin-komplekser.

20

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der inkorporeres et i det væsentlige ioniseret zinksalt i en koncentration svarende til et indhold af zinkioner til rådighed for insulinet på mere end 4 Zn^{2+} /hexamer insulin og mindre end ca. $4,8 \text{ Zn}^{2+}$ /hexamer insulin.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der inkorporeres et i det væsentlige ioniseret zinksalt i en koncentration svarende til et indhold af
30 zinkioner til rådighed for insulinet på fra ca. 4,2 til ca. $4,5 \text{ Zn}^{2+}$ /hexamer insulin.

4. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at det anvendte zinksalt
35 er zinkacetat eller zinkchlorid.

5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at der som præserveringsmiddel tilsættes fenol og som middel til at gøre opløsningen isotonisk tilsættes glycerol.

5

6. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at insulinkoncentrationen indstilles til at ligge i området fra ca. 5 til 750, fortrinsvis fra 40 til 500 internationale insulinenheder pr.

10 ml.

7. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at det totale zinkindhold indstilles til mindst 5 Zn^{2+} /hexamer insulin, når opløsningen indeholder et zinkkompleksdannende middel.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at det totale zinkindhold indstilles til mindst 6 Zn^{2+} /hexamer insulin.

20

9. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at der som zinkkompleksdannende middel tilsættes glycin eller citronsyre.

25 10. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at det totale zinkindhold i tilfælde af et svagt kompleksdannende middel indstilles til at ligge i området fra ca. 5 til ca. 8 Zn^{2+} /hexamer insulin.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 1851/80

DK fremlæggeskrift nr. 116527

DK patent nr. 95007

US patent nr. 3091573.

FIG. 1

100 IU svineinsulin pr. ml

Stabilitetsfaktor

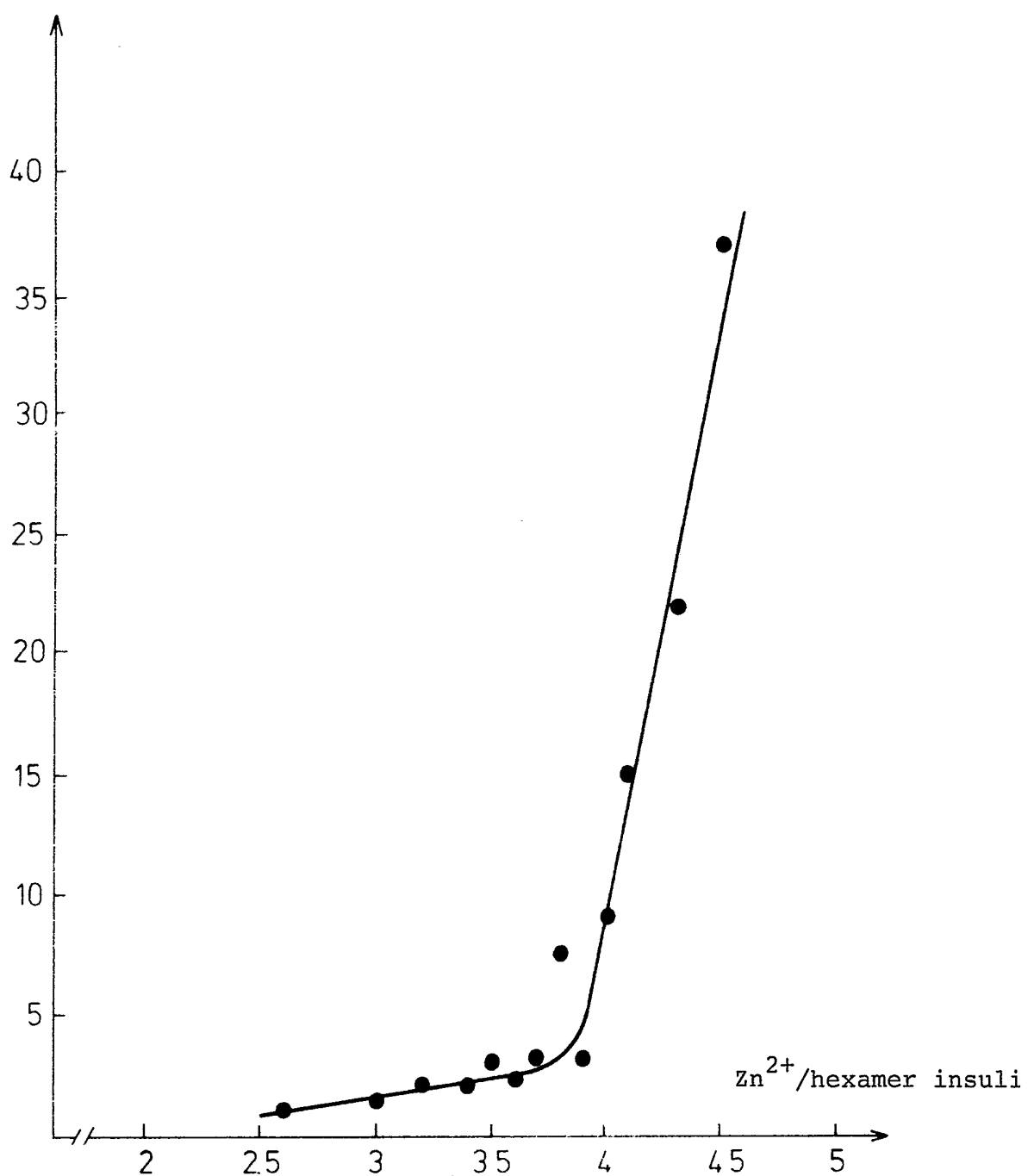


FIG. 2

40 IU svineinsulin pr. ml i 10 mM glycin

Stabilitetsfaktor

