



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324276**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19985978	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.06.19 PCT/DK97/00267
(22)	Inng.dag	1998.12.18	(85)	Videreføringsdag	1998.12.18
(24)	Løpedag	1997.06.19	(30)	Prioritet	1996.06.20, DK, 684/96 1996.08.27, DK, 899/96
(41)	Alm.tilgj	1999.02.19			
(45)	Meddelt	2007.09.17			
(73)	Innehaver	Novo Nordisk A/S, Postboks 3000, 2880 BAGSVÆRD, DK			
(72)	Oppfinner	Per Balschmidt, Espergærde, DK Lone Løgstrup Kimer, Farum, DK Steen Jensen, Dragør, DK			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO			

(54)	Benevnelse	Vandige insulinpreparater som inneholder mannitol.
(56)	Anførte publikasjoner	Acta Pharm. Nord. 4 (3) 149-158 (1992) Centre for Biotechnology, Vol.70, Vinita Gupta, side 209-212 US4439181 WO9500550
(57)	Sammendrag	

Insulinpreparater med utmerket fysisk stabilitet, som omfatter oppløst og/eller utfelt humaninsulin eller en analog eller et derivat derav, og et vannoppløselig, redusert eller ikke-reduserende karbohydrat som inneholder minst 4 karbonatomer i hovedkarbohydratstrukturen, eller et vannoppløselig, ikke-reduserende ester- og/eller eterderivat av et karbohydrat eller redusert karbohydrat, som inneholder minst 4 karbonatomer i hovedkarbohydratstrukturen, eller blandinger derav, er beskrevet.

Innledning

Foreliggende oppfinnelse vedrører vandige insulinpreparater som blant annet omfatter oppløste insulinanaloger og mannitol, og hvor preparatene har utmerket fysisk stabilitet.

Oppfinnelsen bakgrunn

Oppfinnelsens område

Diabetes er en generell betegnelse for sykdommer hos mennesker med for stor urinekskresjon, som ved diabetes mellitus og diabetes insipidus. Diabetes mellitus er en metabolsk sykdom hvor evnen til å utnytte glukose er mer eller mindre fullstendig tapt. Ca 2 % av alle folk lider av diabetes.

Siden innføringen av insulin i 1920-årene har det stadig vært forsøk på å forbedre behandlingen av diabetes mellitus. For å hjelpe til å unngå ekstreme glykeminivåer, praktiserer sukkersykepasienter ofte flerinjeksjonsterapi, hvorved insulin administreres sammen med hvert måltid.

Ved behandlingen av diabetes mellitus er det blitt foreslått og brukt mange varianter av insulinpreparater, slik som vanlig insulin, semilente-insulin, isofaninsulin, insulin-sinksuspensjoner, protaminsinkinsulin og ultralente-insulin. Ettersom sukkersykepasienter behandles med insulin i flere tiår, er det et stort behov for sikre og livskvalitetsforbedrende insulinpreparater. Noen av de kommersielt tilgjengelige insulinpreparater er kjennetegnet ved en hurtig virkningsstart, og andre preparater har en forholdsvis sen start, men oppviser en mer eller mindre langvarig virkning. Hurtigvirkende insulinpreparater er vanligvis oppløsninger av insulin, mens sentvirkende insulinpreparater kan være suspensjoner som insulin i krystallinsk og/eller amorf form, utfelt ved tilsetning av sinksalter alene eller ved tilsetning av protamin eller ved en kombinasjon av begge deler. I tillegg anvender noen pasienter preparater med både en hurtig virkningsstart og en mer langvarig virkning. Et slikt preparat kan være en insulinoppløsning hvor protamininsulinkrystaller er oppslemmet. Noen pasienter fremstiller selv sluttpreparatet ved å blande en insulinoppløsning med et suspensjonspreparat i det forhold som er ønsket av den aktuelle pasient.

Normalt administreres insulinpreparater ved hjelp av subkutan injeksjon. Det som er viktig for pasienten, er virkningsprofilen til insulinpreparatet, som er virkningen av insulin på glukosemetabolismen som funksjon av tiden fra injeksjonen. I denne profilen er blant annet tidspunktet for starten, den maksimale verdi og den totale virkningsvarighet viktig. Mange forskjellige insulinpreparater med forskjellige virkningsprofiler er ønsket og etterspurt av pasientene. En pasient kan, på den samme dag, anvende insulinpreparater med svært forskjellige virkningsprofiler. Den etterspurte virkningsprofil er f eks avhengig av tidspunktet på dagen og sammensetningen av eventuelt måltid som spises av pasienten.

Like viktig er imidlertid den fysiske stabilitet til insulinpreparatene på grunn av den store bruken av pennlignende injeksjonsanordninger, slik som anordninger som inneholder Penfill-patroner, hvor et insulinpreparat er lagret inntil patronen er helt tom. Dette kan vare minst 1-2 uker for anordninger som inneholder 1,5-3,0 ml store patroner.

20 Beskrivelse av teknikkens stand

Den stabile nøytrale insulinsuspensjon ble utviklet av Scott and Fischer (J. Pharmacol. Exp. Ther. 58 (1936), 78) som oppdaget at tilstedeværelsen av et overskudd av protamin og et sinksalt (2 µg sink pr iu (internasjonal enhet) insulin) kunne stabilisere protamininsulinpreparatet, beskrevet av Hagedorn et al.: J. Am. Med. Assn. 106 (1936), 177-180.

Protaminsinkinsulin laget i henhold til US- eller europeiske farmakopéer inneholder amorft protaminsinkinsulin samt krystallinsk protaminsinkinsulin. Nyfremstilt protaminsinkinsulin inneholder hovedsakelig amorf utfelling som delvis vil bli omdannet til krystallinske partikler etter lagring, noe som fører til en mer langvarig effekt.

En fullstendig krystallinsk protaminsinkinsulinmodifikasjon betegnet NPH-insulin eller isofaninsulin, ble utviklet av Krayenbühl and Rosenberg (se Rep. Steno Mem. Hosp. Nord. Insulinlab. I (1946), 60; og dansk patent nr. 64.708). De fant at insulin og protamin brakt sammen i isofane mengdeforhold ved en nøytral pH-verdi i nærvær av en liten mengde sink og fenol, eller fenolderivater, eller fortrinnsvis m-kresol, vil danne en

amorf utfelling som etter å ha stått, gradvis men fullstendig omdannes til avlange tetragonale krystaller begrenset i endene av pyramideformede flater. Insulin og lakseprotamin samkrystalliserer i et vektforhold som tilsvarende ca 0,09 ml protaminsulfat pr mg insulin. Sink i en mengde på minst 0,15 µg pr iu og en fenolforbindelse i en konsentrasjon høyere enn 0,1 % er nødvendig for fremstillingen av de tetragonale krystaller.

Til å begynne med ble denne typen krystaller fremstilt ved å anvende svine- og storfeinsulin fra naturlige kilder, men fra 80-årene anvendes også humaninsulin laget ved hjelp av genteknikk eller halvsyntetisk.

Humaninsulin består av to polypeptidkjeder, de såkalte A- og B-kjeder, som inneholder hhv. 21 og 30 aminosyrer. A- og B-kjedene er bundet sammen ved hjelp av to cystindisulfidbroer. Insulin fra de fleste andre arter har en lignende konstruksjon, men behøver ikke å inneholde de samme aminosyrene i de tilsvarende stillingene i kjedene som i humaninsulin.

Utviklingen av fremgangsmåten som er kjent som genteknikk, har gjort det mulig på en lettvinnt måte å fremstille mange forskjellige insulinforbindelser som er analoge med humaninsulin. I disse insulinanalogene er én eller flere av aminosyrene blitt byttet ut med andre aminosyrer som kan kodes for av nukleotidsekvensene. Ettersom humaninsulin, forklart ovenfor, inneholder 51 aminosyrerester, er det åpenbart at et stort antall insulinanaloger er mulig, og det er faktisk blitt fremstilt mange forskjellige analoger med interessante egenskaper. I humaninsulinoppløsninger med en konsentrasjon av interesse for injeksjonspreparater, er insulinmolekylet til stede i assosiert form som en heksamere (Brange et al. Diabetes Care 13, (1990), 923-954). Etter subkutan injeksjon menes det at absorpsjonshastigheten i blodstrømmen er avhengig av molekyllets størrelse, og det er blitt funnet at insulinanaloger med aminosyresubstansjoner som motvirker eller inhiberer denne heksamerdannelsen, har en uvanlig hurtig virkningsstart (Brange et al.) (ibid). Dette er av stor terapeutisk verdi for sukkersykepasienten. Også i krystallene av de langtidsvirkende protamininsulinpreparatene er insulinet funnet å være heksamert (Balschmidt et al.: Acta Cryst. B47, (1991), 975-986).

Farmasøytiske preparater som er basert på analoger av humaninsulin, er f eks kjent fra de følgende publikasjoner:

WO 95/00550 vedrører farmasøytiske preparater basert på insulinkrystaller som omfatter Asp^{B28}-insulin og protamin, og som også utviser hurtig start og langvarig aktivitet når de administreres in vivo. Krystallene kan videre inneholde sinkioner og fenol og/eller m-kresol. Glyserol tilsettes til preparatene som isotonisitetsmiddel.

I US patentskrift nr. 5 461 031 er det beskrevet parenterale farmasøytiske preparater som omfatter en hurtigvirkende, monomer insulinanalog, sink, protamin og et fenolderivat. Formuleringene inneholder dessuten glyserol som virker som et isotonisitetsmiddel.

I US patentskrift nr. 5 474 978 er det beskrevet et hurtigvirkende parenteralt preparat som omfatter et humaninsulinanalogheksamerkompleks bestående av seks monomere insulinanaloger, sinkioner og minst tre molekyler av et fenolderivat. Det foretrukne isotonisitetsmiddel er glyserol.

I Centre for Biotechnology, Vol. 70 Vinita Gupta, sidene 209-212, beskrives forskjellige preparater av bovint insulin som omfatter som additiver karbohydratene valgt fra: sorbitol, xylitol, mannitol og trehalose.

I US patentskrift nr. 4 439 181 beskrives proteinoppløsninger som omfatter 10-90 % (vekt/volum) av en C₄-C₁₈-polyol. Nærmere bestemt er det i eksemplene 1, 2 og 3 beskrevet insulinoppløsninger som omfatter 80, 70 og 50 % glyserol (en C₃-polyol).

I Acta Pharm. Nord. 4(3), 149-158 (1992) omtales forskjellige påvirkninger på den kjemiske stabiliteten til insulin, nærmere bestemt ble porc-, bovin- og humaninsulin studert.

Dessverre er insulin tilbøyelig til å danne uopløselige og biologisk inaktive fibriller ved hjelp av ikke-kovalent polymerisasjon (jf. f eks Jens Brange, Galenics of Insulin, Springer-Verlag, 1987 og litteraturhenvisninger der). Fibrildannelse fremmes av forhøyede temperaturer, f eks over 30 °C, og ledsagende bevegelser. Denne fibrilleringsprosessen som er svært vanskelig å unngå, gir perioden en øvre grense for hvor lenge insulinpreparatet kan lagres, og følgelig en øvre grense for patronvolumet til Penfills.

Ettersom dannelsen av fibriller generelt krever en monomerisering av insulin, resulterer insulinanaloger som mer motvillig danner di- og heksamerer, i preparater med mindre fysisk stabilitet på grunn av fibrillering.

5 Det er således et formål for foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et insulinpreparat som omfatter en insulinanalog, med forbedret stabilitet.

10 Ifølge oppfinnelsen er dette formål blitt oppnådd ved hjelp av et vandig insulinpreparat som omfatter oppløst insulinanalog og krystaller som omfatter insulinanalog og protamin, og mannitol.

Kort beskrivelse av tegningene

15 Fig 1 er et fotomikrografi (x 1000 forstørrelse) av et preparat ifølge oppfinnelsen som omfatter Asp^{B28}-humaninsulinprotamin-krystaller og mannitol.

Fig 2 er et fotomikrografi (x 1000 forstørrelse) av et preparat ifølge oppfinnelsen som omfatter humaninsulinprotamin-krystaller og mannitol.

20 Fig 3 er en grafisk fremstilling av virkningsprofilen til et preparat ifølge oppfinnelsen som inneholder både oppløst og krystallinsk Asp^{B28}-humaninsulin, og et preparat som inneholder både oppløst og krystallinsk humaninsulin. Begge preparatene inneholder dessuten mannitol. Kurven er blodglukose-
25 responsen etter injeksjon i griser. Figuren viser at den hurtige virkningsstart bevares for det høystabile Asp^{B28}-humaninsulinpreparatet.

Beskrivelse av oppfinnelsen

30 Definisjoner

Med uttrykket "insulinanalog" slik det her er brukt, er det ment humaninsulin hvor én eller flere aminosyrer er blitt delert og/eller erstattet med andre aminosyrer, inkludert ikke-kodbare aminosyrer, eller humaninsulin som omfatter ytterligere
35 aminosyrer, det vil si mer enn 51 aminosyrer.

I den foreliggende sammenheng tilsvarer uttrykket "vannoppløselig" en oppløselighet i vann på minst ca 10 mmol/l, fortrinnsvis minst 50 mmol/l, ved en temperatur på 20 °C.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et vandig insulinpreparat som omfatter:

- a) oppløst insulinanalog og krystaller som omfatter insulinanalog og protamin,
- 5 b) 100-400 mM mannitol,
- c) 5-40 mM av et klorid, og
- d) en fysiologisk tolerert buffer, fortrinnsvis en fosfatbuffer, hvor konsentrasjonen av insulinanalog er 60-3000 nmol/ml, vektforholdet mellom oppløst og krystallinsk insulinanalog er
- 10 30:70 til 70:30, krystallene omfatter sink og en fenolforbindelse, og analogen til humaninsulin er én hvor B28-stillingen er Asp, Lys, Leu, Val eller Ala, og B29-stillingen er Lys eller Pro, eller des(B28-B30)-, des(B27)- eller des(B30)-humaninsulin.

15 Foretrukne utførelsesformer

Ved en bestemt utførelsesform av oppfinnelsen omfatter insulinpreparatet natriumklorid. Det er blitt påvist at tilstedeværelsen av dette halogenidet resulterer i preparater med en enda høyere fysisk stabilitet.

- 20 Ettersom insulinpreparater som omfatter hurtigvirkende analoger av humaninsulin, generelt oppviser en ganske lav fysisk stabilitet, er foreliggende oppfinnelse særlig fordelaktig i forbindelse med preparater som omfatter slike analoger. Insulinpreparatet ifølge oppfinnelsen omfatter således for-
- 25 trinnsvis én eller flere hurtigvirkende analoger av humaninsulin, særlig analoger hvor B28-stillingen er Asp, Lys, Leu, Val eller Ala, og B29-stillingen er Lys eller Pro; eller des(B28-B30)-, des(B27)- eller des(B30)-humaninsulin. Insulinanalogen velges fortrinnsvis av analoger av humaninsulin hvor
- 30 B28-stillingen er Asp eller Lys, og B29-stillingen er Lys eller Pro. De mest foretrukne analoger er Asp^{B28}-humaninsulin eller Lys^{B28}-Pro^{B29}-humaninsulin.

- Ved en utførelsesform av oppfinnelsen omfatter insulinpreparatet krystaller som omfatter insulinanalog og
- 35 protamin, og sink og/eller en fenolforbindelse, slik som fenol, m-kresol eller en blanding derav, hvor mengden av protamin i krystallene tilsvarer 0,20-0,40 protaminbase/100 iu insulinanalog. Forholdet mellom protamin og insulin i krystallene tilsvarer mer foretrukket isofanforholdet.

Sink er fortrinnsvis til stede i en mengde på 10-40 µg Zn/100 iu insulin, mer foretrukket 15-35 µg Zn/100 iu insulin. Henholdsvis fenol og m-kresol er fortrinnsvis til stede i en mengde som tilsvarer 0-4 mg/ml. En blanding av 1,4-2,0 mg/ml m-kresol og 5 0,6-2,0 mg/ml fenol er imidlertid mest foretrukket.

Et foretrukket insulinpreparat ifølge oppfinnelsen omfatter:

- a) 240-1200 nmol/ml insulinanalog;
- b) mannitol ved en konsentrasjon på 150-250 mM, mer 10 foretrukket 180-230 nM;
- c) natriumklorid ved en konsentrasjon på 5-20 nM; og
- d) som en fysiologisk tolerert buffer, fortrinnsvis en fosfatbuffer, dinatriumfosfatdihydrat i en mengde på 1-4 mg/ml.

15 Preparatet ifølge oppfinnelsen kan dessuten inneholde én eller flere forbindelser som vanligvis anvendes som isotonisitettsmidler, slik som glyserol.

pH-verdien i insulinpreparatet er fortrinnsvis i området 7,0-7,8.

20 En fremgangsmåte for fremstilling av et insulinpreparat som inneholder både oppløst og krystallinsk insulinanalog, omfatter de følgende trinn:

- a) tilveiebringelse av en sur oppløsning som omfatter en analog av humaninsulin, sink og en subisofan mengde protamin;
- 25 b) tilveiebringelse av en alkalisk oppløsning som omfatter et stoff som virker som en buffer ved fysiologisk pH; hvor minst én av de ovenfor nevnte oppløsninger omfatter en fenolforbindelse;
- c) blanding av den sure og alkaliske oppløsning og 30 eventuelt regulering av pH til en verdi i området 6,5-8,0, fortrinnsvis 7,0-7,8; og
- d) la den resulterende suspensjon stå for utfelling.

Ved hjelp av denne fremgangsmåten kan det fås et insulinpreparat som inneholder både oppløst og krystallinsk insulinanalog, på en svært enkel måte. Dessuten består utfellingen 35 av den resulterende suspensjon vanligvis av stavformede krystaller, noe som er fordelaktig i såkalte premiks-insulinpreparater.

Vektforholdet mellom insulinanalog og protamin i oppløsningen ifølge trinn a) er valgt slik at det i sluttpro-

duktet oppnås et vektforhold mellom oppløst og krystallinsk insulinanalog i området 30:70 til 70:30. Nærmere bestemt omfatter oppløsningen ifølge trinn a) fortrinnsvis 120-6000 nmol/ml insulinanalog og 0,01-5,0 mg/ml protamin.

5 Oppløsningen i trinn a) omfatter videre sink, fortrinnsvis i en mengde som tilsvarer 10-40 µg sink/100 iu insulin, mer foretrukket 15-35 µg sink/100 iu insulin.

Ved en foretrukket utførelsesform omfatter oppløsning a) og/eller oppløsning b) natriumklorid, i en mengde som tilsvarende svarer fortrinnsvis 5-20 mM i sluttproduktet.

10 pH i den sure oppløsning i trinn a) er fortrinnsvis under 5, mer foretrukket i området 2-3,5.

Insulinanalogen er fortrinnsvis Asp^{B28}-humaninsulin eller Lys^{B28}Pro^{B29}-humaninsulin, enda mer foretrukket Asp^{B28}-humaninsulin.

15 Fenolforbindelsen som anvendes i oppløsningen i trinn a) og/eller trinn b), er fortrinnsvis fenol, m-kresol eller en blanding derav.

Bufferstoffet som anvendes i den alkaliske oppløsning i 20 trinn b), er fortrinnsvis dinatriumfosfatdihydrat.

Suspensjonen beholdt i trinn d) får fortrinnsvis stå ved en temperatur i området 5 °C til 40 °C, mer foretrukket 20 °C til 30 °C, enda mer foretrukket 30 til 34 °C, for utfelling.

Denne oppfinnelsen er ytterligere illustrert ved hjelp 25 av de følgende eksempler.

Eksempel 1

Preparat 1

Et insulinpreparat som både inneholder oppløst og 30 krystallinsk Asp^{B28}-humaninsulin, ble fremstilt på den følgende måte:

Oppløsning A:

En oppløsning av Asp^{B28}-humaninsulin ved 200 iu/ml 35 konsentrasjon fremstilt ved å oppløse 76,5 mg Asp^{B28}-humaninsulin i vann ved å tilsette til det 326 µl 0,2 N saltsyre og 163 µl sinkkloridoppløsning (0,4 mg/ml). Så ble 6,35 protaminsulfat i oppløsning tilsatt til insulinoppløsningen mens det ble blandet, og en blanding bestående av 17,2 mg m-kresol, 15 mg fenol og

455 mg mannitol, ble tilsatt til denne oppløsningen mens det ble blandet. pH i den resulterende, klare oppløsning ble målt til pH = 2,6-2,9, og vann ble tilsatt inntil 10 ml. Oppløsningen ble ekvilibrert ved 28-32 °C.

5

Oppløsning B:

25 mg dinatriumfosfatdihydrat ble oppløst i vann for injeksjon. 17,2 mg m-kresol, 15 mg fenol og 455 mg mannitol ble tilsatt under blanding. pH i den resulterende, klare oppløsning ble målt til 9, og vann ble tilsatt inntil 10 ml. Oppløsningen ble ekvilibrert ved 28-32 °C.

10

Blanding av oppløsning A og B:

Oppløsning B ble tilsatt til oppløsning A og pH ble igjen regulert til 7,30. Den resulterende suspensjon fikk stå ved 30 °C i 6 dager for krystallisering.

15

I det resulterende preparat var vektforholdet mellom utfelt og oppløst insulin 70:30.

Preparatet ble innført i 1,5 ml Penfill-patroner.

20

Eksempel II**Preparat 2**

25

Et insulinpreparat inneholdende både oppløst og krystallinsk Asp^{B28}-humaninsulin ble fremstilt på den følgende måte:

i) Krystallinsk fraksjon

Oppløsning A:

30

35

En oppløsning av Asp^{B28}-humaninsulin ved 200 iu/ml konsentrasjon ble fremstilt ved å oppløse 190,3 mg Asp^{B28}-humaninsulin i vann ved å tilsette til denne 813 µl 0,2 N saltsyre og 410 µl sinkkloridoppløsning (0,4 mg/ml). Så ble 16,1 mg protaminsulfat i oppløsning tilsatt til insulinoppløsningen mens det ble blandet, og en blanding bestående av 43,0 mg m-kresol, 37,5 mg fenol og 909 mg mannitol, og 14,6 mg natriumklorid ble tilsatt til denne oppløsningen mens det ble blandet. pH i den resulterende, klare oppløsning ble målt til pH = 2,6-2,9, og

vann ble tilsatt inntil 22 ml. Oppløsningen ble ekvilibrert ved 32 °C.

Oppløsning B:

5 62,4 mg dinatriumfosfatdihydrat ble oppløst i vann.
43,0 mg m-kresol, 37,5 mg fenol, 909 mannitol og 14,6 mg
natriumklorid ble tilsatt under blanding. pH i den resulterende,
klare oppløsning ble målt til 9, og det ble tilsatt vann inntil
22 ml. Oppløsningen ble ekvilibrert ved 32 °C.

10

Blanding av oppløsning A og B:

Oppløsning B ble tilsatt til oppløsning A og pH ble
igjen regulert til 7,30, og vann ble tilsatt inntil 50 ml. Den
resulterende suspensjon fikk stå ved 32 °C i 4 dager for
15 krystallisasjon.

I det resulterende preparat er vektforholdet mellom
utfelt og oppløst insulin 70:30.

Preparatet ble innført i 1,5 ml Penfill-patroner.

20 Eksempler III-VI**Preparater 3-6**

Insulinpreparater som inneholder både oppløst og
krystallinsk Asp^{B28}-humaninsulin, ble fremstilt som beskrevet i
eksempel II, bortsett fra at mengden mannitol som ble brukt i
25 oppløsning A og B, var henholdsvis 818 mg, 1005 mg, 1047 mg og
1137 mg.

Preparatene ble innført i 1,5 ml Penfill-patroner.

Eksempel VII30 **Preparat 7**

Et insulinpreparat inneholdende både oppløst og
krystallinsk Lys^{B28}Pro^{B29}-humaninsulin ble fremstilt på den
følgende måte:

35 i) Krystallinsk fraksjon

Oppløsning A:

En oppløsning av Lys^{B28}Pro^{B29}-humaninsulin ved 200 iu/ml
konsentrasjon ble fremstilt ved å oppslemme 69,7 mg Lys^{B28}Pro^{B29}-

humaninsulin i vann. En blanding bestående av 16,0 mg m-kresol, 6,5 mg fenol, 364 mg mannitol og 25,1 mg dinatriumdifosfatdihydrat ble tilsatt til denne oppløsningen mens det ble blandet. Så ble 50 µl sinkkloridoppløsning (10 mg/ml) tilsatt. pH i den resulterende, klare oppløsning ble igjen regulert til 7,40, og vann ble tilsatt inntil 10 ml. Oppløsningen ble ekvilibrert ved 15 °C.

Oppløsning B:

En oppløsning av protaminsulfat ble fremstilt ved å oppløse 7,61 mg protaminsulfat og 25,1 mg dinatriumfosfatdihydrat i vann. 16,0 mg m-kresol, 6,5 mg fenol og 364 mg mannitol ble tilsatt under blanding. Denne oppløsningen ble tilsatt til protaminsulfatoppløsningen mens det ble blandet. pH i den resulterende, klare oppløsning ble igjen regulert til 7,40, og vann ble tilsatt inntil 10 ml. Oppløsningen ble ekvilibrert ved 15 °C.

Blanding av oppløsning A og B:

Oppløsning B ble tilsatt til oppløsning A og pH ble igjen regulert til 7,30. Den resulterende suspensjon fikk stå ved 15 °C i 3 dager for krystallisasjon.

ii) Oppløst fraksjon

En oppløsning av Lys^{B28}Pro^{B29}-humaninsulin ble fremstilt ved å oppløse 34,9 mg Lys^{B28}Pro^{B29}-humaninsulin i vann ved å tilsette til denne 33 µl 1 N saltsyre og 25 µl sinkkloridoppløsning (10 mg/ml). Så ble en blanding bestående av 26,1 mg natriumfosfatdihydrat, 6,5 mg fenol, 16,0 mg m-kresol og 364 mg mannitol tilsatt til insulinoppløsningen mens det ble blandet. pH i den resulterende, klare oppløsning ble målt til pH = 7,3, og vann ble tilsatt inntil 10 ml.

6 ml av den oppløste fraksjon ble tilsatt til 14 ml av den krystallinske fraksjon, og pH ble regulert til 7,30.

I det resulterende preparat var vektforholdet mellom utfelt og oppløst insulin 70:30.

Preparatet ble innført i 1,5 ml Penfill-patroner.

Eksempel VIII**Preparat 8**

Et insulinpreparat inneholdende både oppløst og krystallinsk humaninsulin ble fremstilt på den følgende måte:

5

i) Krystallinsk fraksjon

Oppløsning A:

En oppløsning av humaninsulin ble fremstilt ved å
10 oppløse 69,7 mg humaninsulin i vann ved å tilsette til det 65 µl
1 N saltsyre og 26 µl sinkkloridoppløsning (10 mg/ml). Så ble
6,0 mg protaminsulfat i oppløsning tilsatt til insulinoppløs-
ningen mens det ble blandet, og en blanding bestående av 15,0 mg
fenol og 17,2 mg m-kresol ble tilsatt til oppløsningen mens det
15 ble blandet. pH i den resulterende, klare oppløsning ble målt
til pH = 2,7-3,2, og vann ble tilsatt inntil 10 ml.

Oppløsning B:

24,9 mg natriumfosfatdihydrat ble oppløst i vann. 15 mg
20 fenol, 17,2 mg m-kresol, 728 mg mannitol og 11,7 mg natrium-
klorid ble tilsatt under blanding. pH i den resulterende, klare
oppløsning ble regulert til pH = 9, og vann ble tilsatt inntil
10 ml.

Oppløsning B ble tilsatt til oppløsning A og pH ble
25 regulert til 7,30. Den resulterende suspensjon fikk stå ved 22-
24 °C inntil den neste dag.

ii) Oppløst fraksjon

En oppløsning av humaninsulin ble fremstilt ved å
30 oppløse 34,9 mg humaninsulin i vann ved å tilsette til den 33 µl
1 N saltsyre og 13 µl sinkkloridoppløsning (10 mg/ml). Så ble en
blanding bestående av 12,5 mg natriumfosfatdihydrat, 15 mg
fenol, 17,2 mg m-kresol, 364 mg mannitol og 5,8 mg natriumklorid
tilsatt til insulinoppløsningen mens det ble blandet. pH i den
35 resulterende, klare oppløsning ble målt til pH = 7,3, og vann
ble tilsatt inntil 10 ml.

6 ml av den oppløste fraksjon ble tilsatt til 14 ml av
den krystallinske fraksjon, og pH ble regulert til 7,30.

I det resulterende preparat var vektforholdet mellom utfelt og oppløst insulin 70:30.

Preparatet ble innført i 1,5 ml Penfill-patroner.

5 Eksempel IX

Preparat 9

Et insulinpreparat inneholdende både oppløst og krystallinsk Asp^{B28}-humaninsulin ble fremstilt på den følgende måte:

10 **Oppløsning A**

En oppløsning av Asp^{B28}-humaninsulin ved 200 iu/ml konsentrasjon ble fremstilt ved å oppløse 189,9 mg Asp^{B28}-humaninsulin i vann ved å tilsette til den 163 µl 1 N saltsyre og 163,5 µl sinkkloridoppløsning (10 mg/ml). Så ble 11,5 mg protaminsulfat i oppløsning tilsatt til insulinoppløsningen mens det ble blandet, og en blanding bestående av 44,3 mg m-kresol, 38,6 mg fenol og 1048 mg mannitol, og 7,3 mg natriumklorid ble tilsatt til denne oppløsningen mens det ble blandet. pH i den resulterende, klare oppløsningen ble målt til 15 pH = 2,6-2,9, og vann ble tilsatt inntil 25 ml. Oppløsningen ble 20 ekvilibrert ved 22-24 °C.

Oppløsning B:

62,3 mg dinatriumfosfatdihydrat ble oppløst i vann. 25 44,3 mg m-kresol, 38,6 mg fenol, 1048 mg mannitol og 7,3 mg natriumklorid ble tilsatt under blanding. pH i den resulterende, klare oppløsning ble målt til 9, og vann ble tilsatt inntil 25 ml. Oppløsningen ble ekvilibrert ved 22-24 °C.

30 **Blanding av oppløsning A og B:**

Oppløsning B ble tilsatt til oppløsning A, og pH ble igjen regulert til 7,30. Den resulterende suspensjon fikk stå ved 32 °C i 2 dager før krystallisasjon.

I det resulterende preparat var vektforholdet mellom 35 utfelt og oppløst insulin 50:50.

Preparatet ble innført i 1,5 ml Penfill-patroner.

Eksempel X (sammenligning)**Preparat 10**

Et insulinpreparat inneholdende både oppløst og
5 krystallinsk Asp^{B28}-humaninsulin ble fremstilt på den følgende
måte:

Oppløsning A:

En oppløsning av Asp^{B28}-humaninsulin ved 200 iu/ml
10 konsentrasjon ble fremstilt ved å oppløse 76,5 mg Asp^{B28}-
humaninsulin i vann ved å tilsette til den 326 µl 0,2 N saltsyre
og 163 µl sinkkloridoppløsning (0,4 mg/ml). Så ble 6,35 mg
protaminsulfat i oppløsning tilsatt til insulinoppløsningen mens
det ble blandet, og en blanding bestående av 17,2 mg m-kresol,
15 15,0 mg fenol og 160 mg glyserol ble tilsatt til denne
oppløsningen mens det ble blandet. pH i den resulterende, klare
oppløsning ble målt til pH = 2,6-2,9, og vann ble tilsatt inntil
10 ml. Oppløsningen ble ekvilibrert ved 28-32 °C.

Oppløsning B:

25 25 mg dinatriumfosfatdihydrat ble oppløst i vann.
17,2 mg m-kresol, 15,0 mg fenol og 160 mg glyserol ble tilsatt
under blanding. pH i den resulterende, klare oppløsning ble målt
til 9, vann ble tilsatt inntil 10 ml. Oppløsningen ble
25 ekvilibrert ved 28-32 °C.

Oppløsning B ble tilsatt til oppløsning A, og pH ble
igjen regulert til 7,30. Den resulterende suspensjon fikk stå
ved 28-32 °C i 2 dager for krystallisasjon.

I det resulterende preparat var forholdet mellom utfelt
30 og oppløst insulin 70:30.

Preparatet ble innført i 1,5 ml Penfill-patroner.

Eksempel XI**Fysiske spenningstester**

35 5 prøver av hvert insulinpreparat ble innført i
Penfill-patroner og underkastet den følgende fysiske
spenningstest:

Penfill-patronene ble festet til en rotator som ble
plassert i en inkubator, og det ble rotert 360° i 4 timer pr dag

med en frekvens 30 rotasjoner pr minutt, og ved en konstant temperatur på 37 ± 2 °C. Penfill-patronene ble lagret ved en temperatur pp 37 ± 2 °C når de ikke ble rotert.

Penfill-patronene ble inspisert makroskopisk 5 ganger ukentlig og endringer i utseendet til preparatet ble notert i henhold til følgende prinsipper:

i) Patroner inneholdende en hvit suspensjon som etter agitasjon på nytt lot seg oppslemme, og som var fri for klumper og granuler, ble klassifisert som "ikke fibrillert".

ii) Patroner som inneholder en suspensjon med klumper og/eller granuler som ikke lar seg oppslemme på nytt etter omrøring og/eller avsetning på patronveggen, ble antatt å være "fibrillert". Dette ble bekreftet ved tilsetning av 6 μ l 6 N HCl til patronen; Fibrillerte patroner er visuelt ikke klare etter tilsetning av syre.

Rotasjon av patronene ble fortsatt til alle prøvene var fibrillert.

Resultatene er oppsummert i den følgende tabell I.

Tabell I

Preparat nr.	Preparat	Gjennomsnittlig antall dager inntil fibrillering	Første dag med fibrillering
1	Asp ^{B28} -insulin 30/70 7 mM fosfat 250 mM mannitol	20	20
2	Asp ^{B28} -insulin 30/70 7mM fosfat 200 mM mannitol 10 mM natriumklorid	23	23
3	Asp ^{B28} -insulin 30/70 7 mM fosfat 180 mM mannitol 10 mM natriumklorid	21	17
4	Asp ^{B28} -insulin 30/70 7 mM fosfat 220 mM mannitol 10 mM natriumklorid	19	17
5	Asp ^{B28} -insulin 30/70 7 mM fosfat 230 mM mannitol 10 mM natriumklorid	21	18
6	Asp ^{B28} -insulin 50/50 7 mM fosfat 250 mM mannitol 10 mM natriumklorid	22	22
9	Asp ^{B28} -insulin 30/70 7 mM fosfat 230 mM mannitol 10 mM natriumklorid	>30	>30
10 (sammen- ligning)	Asp ^{B28} -insulin 30/70 7 mM fosfat 174 mM glyserol	11	9

P a t e n t k r a v

1. Vandig insulinpreparat,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter:
a) oppløst insulinanalog og krystaller som omfatter insulin-
analog og protamin,
b) 100-400 mM mannitol,
c) 5-40 mM av et klorid, og
10 d) en fysiologisk tolerert buffer, fortrinnsvis en fosfatbuffer,
hvor konsentrasjonen av insulinanalog er 60-3000 nmol/ml,
vektforholdet mellom oppløst og krystallinsk insulinanalog er
30:70 til 70:30, krystallene omfatter sink og en fenolforbind-
else, og analogen til humaninsulin er én hvor B28-stillingen er
15 Asp, Lys, Leu, Val eller Ala, og B29-stillingen er Lys eller
Pro, eller des(B28-B30)-, des(B27)- eller des(B30)-humaninsulin.

2. Insulinpreparat ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at analogen til humaninsulin
20 er Asp^{B28}-humaninsulin eller Lys^{B28}Pro^{B29}-humaninsulin.

1/3

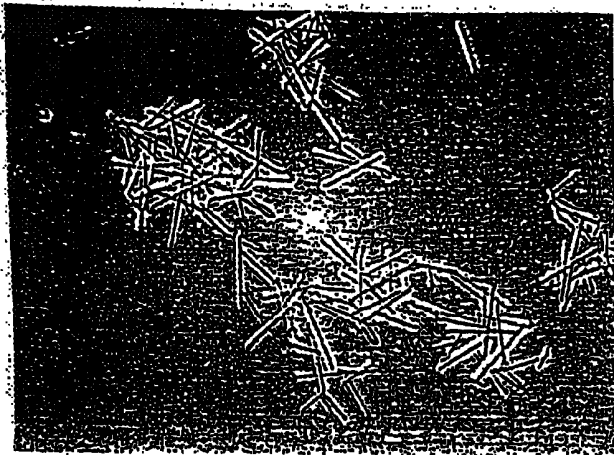


FIG. 1

2/3

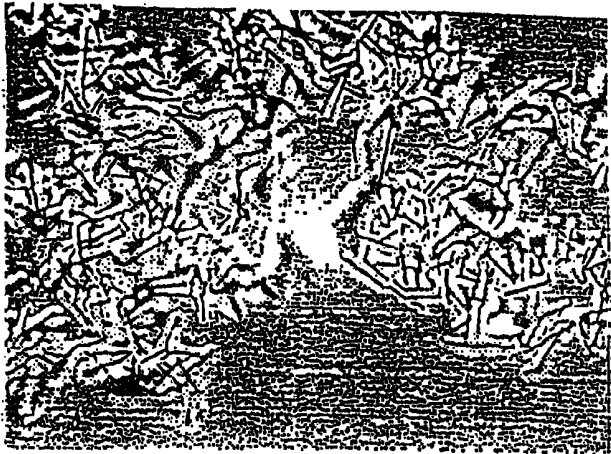


FIG. 2

BLODGLUKOSE HOS 8 GRISER
Humaninsulin og AspB28-humaninsulin

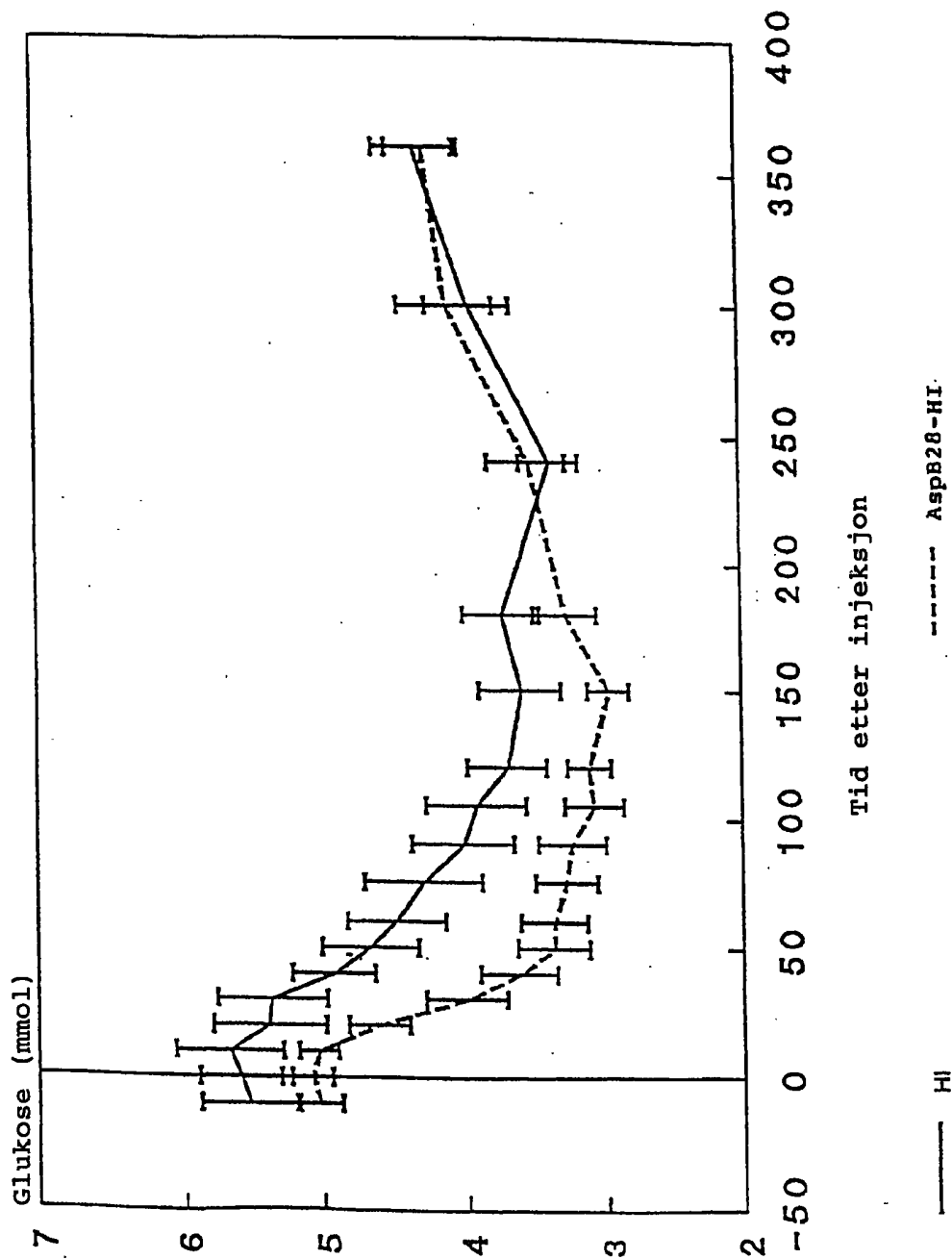


FIG. 3