

(19) DANMARK



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **149833 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 1008/82

(51) Int.Cl.⁴: A 61 K 37/26

(22) Indleveringsdag: 09 mar 1982

(41) Alm. tilgængelig: 11 sep 1982

(44) Fremlagt: 13 okt 1986

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 10 mar 1981 GB 8107423 18 sep 1981 DK 4143/81

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

(72) Opfinder: Jens Jørgen Vellgaard *Brange; DK, Svend *Havelund; DK.

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af et opløst
zinkinsulinpræparat, der er fysisk stabilt.**

(57) Sammendrag:

1008-82

Nye farmaceutiske præparater af opløst zinkinsulin med forbedret fysisk stabilitet fremstilles ved at insulin bringes i opløsning sammen med et i det væsentlige ioniseret calcium- eller magnesiumsalt.

De nye insulinpræparater er især egende til anvendelse i insulinpumpe-udstyr.

DK 149833 B

Denne opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af nye stabiliserede insulinpræparater, som specielt er tilpasset til anvendelse i pumpeudstyr til kontinuerlig indgift af insulin. Der har i de senere år været ydet en stadig stigende indsats med henblik på udviklingen af bærebare eller implanterbare systemer til kontinuerlig indgift af insulin. 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 anvendelse af insulin.

Den mekaniske del af en anordning til kontinuerlig indgift af insulin omfatter i det væsentlige sådanne elementer som et insulinreservoir, et pumpesystem og et kateter tilpasset den valgte administrationsmåde, som sædvanligvis er enten subkutan, intravenøs eller intraperitoneal. Pumpesystemet kan være automatisk aktiveret og kan tillige være forsynet med en manuel regulering af insulinindgiften på tidspunkter, hvor der er særligt behov herfor.

Hvis insulinopløsningen tilføres fra en sprøjte, vil denne sædvanligvis også fungere som insulinreservoir. Anordninger af sprøjtetypen bæres sædvanligvis uden på kroppen. Imidlertid er der også udviklet betydeligt mere komplicerede systemer, i hvilke hele den mekaniske enhed er konstrueret med henblik på implantering, sædvanligvis subkutan. Insulinreservoiret vil sædvanligvis være tilpasset til perkutan genopfyldning.

Insulinets tilbøjelighed til udfældning i kommercielt tilgængelige opløsninger, hvorved såvel de mekaniske dele som infusionskateteret tilstoppes, har vist sig at udgøre en væsentlig hindring for videreudvikling og sikre klinisk anvendelse af pumpeudstyr til kontinuerlig indgift. Derudover bestræber man sig af nærliggende grunde på at udvikle stadig mindre typer af insulinpumper. Derved opstår et behov for mere koncentrerede insulinopløsninger end de, der hidtil har været tilgængelige, hvilket yderligere medvirker til at forværre de ovenfor nævnte problemer.

Almindeligvis antages det, at forklaringen på udfældningsfænomenet må søges i insulinets tilbøjelighed til at danne uopløselige fibriller, især hvis insulinopløsninger opbevares ved højere temperaturer i længere tid. Visse kendsgerninger tyder også på, at en hvilken som helst art af be-

vægelse af eller i opløsningen, herunder f.eks. den turbulens, der induceres ved dens passage gennem et lille tværsnit eller snæver åbning, inducerer insulin fibrillering. Det er indlysende, at insulinopløsninger udsættes for de fleste af eller alle sådanne påvirkninger i insulinpumpe-udstyr af en hvilken som helst type. De kendte insulinpræparaters generelle mangler i så henseende er fyldestgørende dokumenteret i litteraturen, f.eks. i en nyligt publiceret oversigtsartikel af W.D. Loughheed et al. (Diabetologia vol. 19 (1980) pp. 1 - 9).

Til løsning af dette problem har det været foreslået at anvende sure insulinopløsninger eller neutrale formuleringer af insulin indeholdende en sukkerart, f.eks. glucose (D.S. Schade et al.: Satellite-Symposium to 16th European Association for the Study of Diabetes-Meeting, Greece 22 - 23 Sept., 1980, p. 107) eller et syntetisk ikke-ionisk overfladeaktivt middel (H. Thurow: DE offentliggørelsesskrift nr. 29 52 119).

Imidlertid er insulin kemisk ustabil i syre, selv under legemstemperatur. Endvidere kan det, på reversibel eller irreversibel måde, reagere med kulhydrater. Ydermere kunne det ovenfor nævnte overfladeaktive middel på grund af dets ufysiologiske karakter være at betragte som uønsket i lægemidler til parenteral anvendelse.

De ovenfor nævnte ulemper afhjælpes i henhold til den foreliggende opfindelse, som anviser en fremgangsmåde til fremstilling af nye insulinopløsninger, i hvilke insulinet sammenlignet med konventionelle insulinpræparater udviser en væsentligt formindsket tilbøjelighed til udfældning under de i insulinpumpe-udstyr herskende betingelser.

Det har ifølge opfindelsen vist sig, at calcium- eller magnesiumioner i visse koncentrationer kan udøve en stabiliserende effekt på insulinopløsninger. Dette er en overraskende iagttagelse, idet calcium analogt med andre divalente metalioner almindeligvis er kendt for at danne tungt opløselige komplekser med insulin og at nedsætte zinkinsulinets opløselighed ved neutral pH (J.E. Pitts et al.: Insulin, Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormones, p. 674 (Walther de Gruyter & Co. 1980); S.O. Emdin et al.: Diabetologia 19 (1980) pp. 174 - 182).

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til fremstilling af et zinkinsulinpræparat, der er egnet til anvendelse i insulinpumpe-udstyr ved at være fysisk stabilt under de deri herskende betingelser, hvilken fremgangsmåde er særegen derved, at zinkinsulin bringes i opløsning sammen med i det væsentlige ioniseret calcium eller magnesium i en koncentration, der i det mindste er ca. 0.4×10^{-3} molær, og hvor koncentrationen ikke overstiger molariteter på ca. 10^{-2} , 3×10^{-3} og 2×10^{-3} for insulinkoncentrationer svarende til henholdsvis 5, 50 og 1000 internationale insulinenheder pr. ml, at pH instilles på 7 - 8, at der endvidere tilsættes et konserveringsmiddel og, om ønsket, et ikke-ioniserende middel til regulering af osmotisk tryk og/eller en puffer, som ikke danner komplekse eller tungtopløselige forbindelser med calcium- eller magnesiumioner.

I henhold til en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen tilsættes calcium- eller magnesiumionerne i form af et salt af saltsyre, svovlsyre, eller saltpetersyre. I henhold til yderligere en foretrukken udførelsesform er det tilsatte salt et calciumsalt.

Insulinopløsningernes stabilitet (målt ved hjælp af den i det efterfølgende beskrevne metode) øges almindeligvis med stigende koncentration af Ca^{++} eller Mg^{++} op til et punkt, hvor næsten øjeblikkelig udfældning af insulin kan forekomme. Ved stuetemperatur, hvor insulinets opløselighedsforhold er tilnærmelsesvis sammenlignelige med de tilsvarende ved temperaturen for stabilitetstesten (se nedenfor), falder den øvre koncentrationsgrænse for Ca^{++} eller Mg^{++} , der ikke medfører udfældning, fra ca. 10^{-2} molær til ca. 3×10^{-3} molær over et insulinkoncentrationsinterval svarende til fra 5 til 50 internationale enheder pr. ml, og til omkring 2×10^{-3} over koncentrationsintervallet svarende til fra 50 til 1000 internationale enheder pr. ml.

Den totale molære koncentration af andre metallsalte end saltene af calcium eller magnesium, som f.eks. natrium-salte, overstiger fortrinsvis ikke 0.01, og tilstedeværelsen af anioner, der danner bundfald eller komplekser med calcium eller magnesium, som f.eks. fosfat, gluconat, citrat eller acetat, undgås fortrinsvis. Dersom det er ønskeligt at bringe insulinopløsningen isotoni og pufferkapacitet, opnås førstnævnte fortrinsvis ved hjælp af en ikke-elektrolyt, f.eks. glycerol, og sidstnævnte ved hjælp af en ikke-kompleksende puffer, f.eks. TRIS. I henhold til en foretrukken udførelsesform anvendes svine- eller okseinsulin eller humant insulin, hvis zinkindhold ikke er højere end 1% på vægtbasis (beregnet på basis af tørinsulinkrystaller). Det foretrukne interval for opløsningens insulinkoncentration er fra 5 til 1500 internationale enheder pr. ml, og mere foretrukket end fra 40 til 1000 internationale enheder pr. ml.

Insulinopløsningerne i henhold til den foreliggende opfindelse kan f.eks. fremstilles ved at opløse krystallinsk zinkinsulin, f.eks. en højtrenset form for insulin, såsom "monocomponent" insulin (se britisk patentskrift nr. 1.285.023) i vand i nærværelse af syre, f.eks. saltsyre. En vandig opløsning af konserveringsmidlet, f.eks. fenol eller en alkyl fenol, såsom cresol, eller methylparahydroxybenzoat, fremstilles særskilt. Om ønsket tilsættes et middel til regulering af osmotisk tryk, f.eks. glycerol, fortrinsvis i en mængde, som er beregnet til at gøre den endelige opløsning isotonisk. Denne opløsning sættes derefter til den sure insulinopløsning, hvorefter der tilsættes en base, f.eks. natriumhydroxyopløsning til indstilling af pH på neutralpunktet, hvorved forstås en pH værdi i intervallet fra ca. 7 til ca. 8. Den beregnede mængde af calcium- eller magnesiumsalt, f.eks. calciumchloriddihydrat eller magnesiumchloridhexahydrat og (om ønsket) pufferen f.eks. TRIS, kan tilsættes på dette trin, efterfulgt af genjustering af pH. Alternativt kan calcium- eller magnesiumsaltet opløses i den sure insulinopløsning forud for dennes neutralisation. Endelig fyldes den resulterende opløsning op til det beregnede volumen med vand, sterilfiltreres og overføres derefter til sterile ampuller.

STABILITETSTEST

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

Ampuller med 12 ml rumindhold, hver indeholdende en 10 ml prøve af opløsningen og forsynet med en gummi-hætte, anbringes lodret på en rysteplatform (Type 01 T623TBSH02, indkøbt hos HETO, Birkerød, Danmark), som er fuldstændig neddykket i et vandbad, der holdes ved en temperatur på 41°C

- 7 -

+ 0,1°C. Platformen udsættes for en vandret rystebevægelse med en frekvens på 100 rpm og en amplitude på 50 mm.

Med regelmæssige tidsintervaller måles prøvernes opalescens ved hjælp af et Fischer DRT 1000 nephelometer, forsynet med en ampul-adapter. Fibrilleringstiden defineres som den tid, der hengår indtil prøven udvikler en turbiditet på 10 nephelometriske turbiditetsenheder (NTU). Hver test udføres med prøver og kontrolprøver, sidstnævnte uden tilsætning af calcium- eller magnesiumsalt (4 - 5 ampuller af hver), der behandles side om side. Stabilitetsfaktoren beregnes som forholdet mellem de gennemsnitlige fibrilleringstider for henholdsvis prøverne og kontrolprøverne.

Yderligere detaljer angående udøvelsen af den foreliggende opfindelse er gengivet i de efterfølgende eksempler. I eksemplerne blev vand og vandige opløsninger steriliseret, sidstnævnte ved filtrering, og de efterfølgende operationer gennemførtes under aspektiske betingelser.

Eksempel 1

500 I.E. insulin pr. ml i 2×10^{-3} molær opløsning af calciumklorid.

Krystallinsk monocomponent svineinsulin (7,44 g) med et zinkindhold på 0,4 % og en totalaktivitet på 200.000 I.E. blev opløst i vand (250 ml) indeholdende saltsyre (6,5 ml normal), efterfulgt af tilsætning af en vandig opløsning (100 ml) indeholdende glycerol (6,4 g) og fenol (0,8 g). Opløsningens pH blev indstillet på 7,5 med natriumhydroxid opløsning, og dens totalrumfang til 400 ml med vand. Til et delrumfang af denne opløsning (100 ml) tilsattes 29,4 mg calciumchloriddihydrate, hvorefter den resulterende opløsning blev sterilfiltreret og derefter aseptisk overført til

ampuller (10 ml). Stabilitetsfaktor: > 25.

Eksempel 2

500 I.E.-insulin pr. ml i 3×10^{-3} og 0,02 molær opløsning af henholdsvis calciumchlorid og TRIS.

Krystallinsk monocomponent svineinsulin (3,72 g) med et zinkindhold på 0,4 % og en total aktivitet på 100.000 I.E. opløstes i vand (125 ml) indeholdende saltsyre (3,25 ml normal opløsning), efterfulgt af tilsætning af en vandig opløsning (50 ml) indeholdende glycerol (3,2 g) og fenol (0,4 g). pH blev indstillet på 7,5 ved hjælp af en opløsning af natriumhydroxid. Derefter blev tilsat TRIS (0,48 g) og calciumchlorid (88 mg dihydrat). pH genindstilledes på 7,5 med saltsyre, hvorefter der fyldtes op til et totalrumfang på 200 ml med vand. Den resulterende opløsning blev sterilfiltreret og derefter overført under aseptiske betingelser til ampuller (10 ml). Stabilitetsfaktor: 5,1.

Eksempel 3

500 I.E. insulin pr. ml i $0,5 \times 10^{-3}$ molær opløsning calciumchlorid.

Krystallinsk monocomponent svineinsulin (5,58 g) med et zinkindhold på 0,4 % og en totalaktivitet på 150.000 I.E. opløstes i vand (150 ml) indeholdende saltsyre (4,9 ml normal) og calciumchlorid (22 mg dihydrat), efterfulgt af tilsætning af en vandig opløsning (100 ml) indeholdende glycerol (4,8 g) og fenol (0,6 g). Opløsningens pH indstilledes på 7,5 med en opløsning af natriumhydroxid og totalrumfanget på 300 ml med vand. Den resulterende opløsning sterilfiltreredes og overførtes derefter aseptisk til ampuller (10 ml). Stabilitetsfaktor: 2,3.

Eksempel 4

500 I.E. insulin pr. ml i 2×10^{-3} molær opløsning calciumchlorid.

Fremgangsmåden var analog med den i eksempel 3 beskrevne, dog med den forskel, at der blev tilsat 88 mg calciumchloriddihydrate, hvorved der til vejebragtes en opløsning indeholdende 0,002 M calciumchlorid. Stabilitetsfaktor: > 25.

Eksempel 5

200 I.E. insulin pr. ml i 2×10^{-3} molær opløsning af calciumchlorid.

300 ml af en insulinopløsning fremstillet i henhold til eksempel 4 blev fortyndet med 450 ml af en neutral vandig opløsning indeholdende glycerol (7,2 g), fenol (0,9 g) og calciumchlorid (132 mg dihydrat). Den resulterende insulinopløsning med et indhold på 200 I.E. pr. ml blev sterilfiltreret og aseptisk overført til ampuller (10 ml). Stabilitetsfaktor: 12.

Eksempel 6

40 I.E. insulin pr. ml i 2×10^{-3} molær opløsning af calciumchlorid.

Krystallinsk monocomponent svineinsulin med et zinkindhold på 0,4 % og en totalaktivitet på 40.000 I.E. opløstes i 120 ml vand indeholdende saltsyre (1280 μ l normal), efterfulgt af tilsætning af en vandig opløsning (730 ml) af fenol (2 g) og glycerol (16 g). En vandig opløsning (40 ml) indeholdende natriumhydroxid (2000 μ l af normal opløsning) blev tilsat, efterfulgt af tilsætning af en vandig opløsning (15 ml) indeholdende calciumchlorid (220 mg dihydrat). Tilsidst indstilledes pH på 7,4 ved hjælp af natriumhydroxidopløsning, og totalrumfanget på 1000 ml med vand. Opløsningen sterilfiltreredes og overførtes derefter aseptisk til ampuller (10 ml). Stabilitetsfaktor: 3.

Eksempel 7

500 I.E. insulin pr. ml i 2×10^{-3} molær opløsning af magnesiumchlorid.

- 10 -

Krystallinsk monocomponent svineinsulin (3,72 g) med et zinkindhold på 0,4 % og en totalaktivitet på 100.000 I.E. opløstes i vand (125 ml) indeholdende salt-syre (3,25 ml normal), efterfulgt af tilsætning af en vandig opløsning (50 ml) indeholdende glycerol (3,2 g) og fenol (0,4 g). pH indstilledes på 7,5 ved hjælp af natriumhydroxid opløsning. Magnesiumchlorid (81 mg hexahydrat), tilsattes, pH blev genindstillet på 7,5 med natriumhydroxid og totalrumfanget indstillet på 200 ml med vand. Den resulterende opløsning blev sterilfiltreret og derefter aseptisk overført til ampuller (10 ml). Stabilitetsfaktor: 6.

Eksempel 8

100 I.E. insulin pr. ml i 2×10^{-3} molær opløsning af magnesiumchlorid.

Krystallinsk monocomponent svineinsulin (3,72 g) med et zinkindhold på 0,4 % og en totalaktivitet på 100.000 I.E. opløstes i vand (125 ml) indeholdende salt-syre (3,25 ml normal), efterfulgt af tilsætning af en vandig opløsning (800 ml) indeholdende glycerol (16 g) og fenol (2 g). pH blev indstillet på 7,5 med natriumhydroxidopløsning. Magnesiumchlorid (407 mg hexahydrat) blev tilsat, pH blev genindstillet på 7,5 og totalrumfanget indstillet på 1000 ml med vand. Den resulterende opløsning blev sterilfiltreret og derefter aseptisk overført til ampuller (10 ml). Stabilitetsfaktor: 4.

Eksempel 9

100 I.E. humant insulin pr. ml i 2×10^{-3} molær opløsning af calciumchlorid.

Krystallinsk semisyntetisk humant insulin, fremstillet efter den i britisk patentansøgning nr. 2.069.502 A beskrevne metode (2,04 g) med et zinkindhold på 0,4 % og en totalaktivitet på 55.000 I.E. blev opløst i vand (275 ml) indeholdende saltsyre (1,8 ml normal). Til et delrumfang af denne opløsning (25 ml) tilsattes calcium-

- 11 -

chloriddihydrat (14,7 mg) efterfulgt af tilsætning af en vandig opløsning (20 ml) indeholdende glycerol (0,8 g) og fenol (0,1 g). Opløsningens pH indstilledes på 7,4 med natriumhydroxidopløsning og totalrumfanget på 50 ml med vand. Den resulterende opløsning blev sterilfiltreret og derefter aseptisk overført til ampuller (10 ml). Stabilitetsfaktor: 7.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et opløst zinkinsulinpræparat, der er egnet til anvendelse i insulinpumpeudstyr ved at være fysisk stabilt under de deri herskende betingelser, hvilken fremgangsmåde er k e n d e t e g n e t ved, at zinkinsulin bringes i opløsning sammen med i det væsentlige ioniseret calcium eller magnesium i en koncentration, der i det mindste er ca. $0,4 \times 10^{-3}$ molær, og hvor koncentrationen ikke overstiger molariteter på ca. 10^{-2} , 3×10^{-3} og 2×10^{-3} for insulinkoncentrationer svarende til henholdsvis 5, 50 og 1000 internationale insulinenheder pr. ml, at pH indstilles på 7 til 8, at der endvidere tilsættes et konserveringsmiddel og, om ønsket, et ikke-ioniserende middel til regulering af osmotisk tryk og/eller en puffer, som ikke danner komplekse eller tungt opløselige forbindelser med calcium- eller magnesiumioner.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det tilførte calcium eller magnesium er i form af et salt af saltsyre, svovlsyre eller salpetersyre.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at det tilførte salt er et calciumsalt.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 1851/80

DK patenter nr. 63000, 88353, 95007, 98342

US patent nr. 3102077.