

AG 1 k 17/02



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ OPIS PATENTOWY

Nr 36324

Kl. 30 h, 2/10

Novo Terapeutisk Laboratorium A/S.*)

(Kopenhaga, Dania)

Sposób wytwarzania preparatów insuliny o przedłużonym działaniu

Udzielono patentu z mocą od dnia 3 kwietnia 1951 r.

Pierwszeństwo: 5 kwietnia 1950 r. dla zastrz. 1, 3 — 5, 10 — 14

6 marca 1951 r. dla zastrz. 2, 6 — 9 (Dania)

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania preparatów insuliny o przedłużonym działaniu.

Przedłużone działanie preparatów insuliny zależy od obecności lub od tworzenia się insuliny trudno rozpuszczalnej we krwi przy wartości pH dla niej charakterystycznej. Nierozpuszczalność insuliny osiąga się przez dodanie substancji o odczynie zasadowym, np. protaminy, globiny i surfeny, które tworzą z insuliną związki trudno rozpuszczalne w środowisku obojętnym.

Stwierdzono obecnie, iż można wytwarzać preparaty insuliny o działaniu przedłużonym pomijając stosowanie substancji pomocniczych, które utrudniają wytwarzanie oraz kliniczne zastosowanie preparatów.

*) Właściciel patentu oświadczył, że twórcami wynalazku są Knut Hallas Möller w Holte, Karl Petersen w Kopenhadze oraz Jörgen Schlichtkrul w Holte

Sposobem według wynalazku wytwarza się preparaty insuliny o przedłużonym działaniu przy użyciu czystej, krystalicznej insuliny w postaci zawiesiny o ogólnej zawartości takich metali jak cynk, kobalt, nikiel, kadm, miedź, mangan lub żelazo, potrzebnych do krystalizacji insuliny w ilości około $7,5 \times A \times 10^{-3}$ milirównoważników w 1 litrze, przy czym A oznacza ilość międzynarodowych jednostek insuliny w 1 ml zawiesiny. Wprawdzie Fisher i Scott w naukowych dociekaniach nad znaczeniem obecności cynku w preparatach insuliny protaminowej wytworzyli zawiesinę kryształków insuliny w wodzie destylowanej, [J. Pharmacol. 58, 93 — 104 (1936)] jednak stwierdzili, że zastrzyki wyprodukowanej zawiesiny kryształków insuliny zastosowane podskórnie u królików, dają ten sam wynik co zastrzyki insuliny rozpuszczonej.

Z powyższego wysunięto wniosek, że znana insulina krystaliczna zawierająca 0,4 % cynku roz-

puszcza się łatwo we krwi i cieczy tkankowej przy wartości pH 7,2 dla nich charakterystycznej.

Jeżeli insulinę krystaliczną w postaci zawiesiny w wodzie destylowanej doprowadzi się, np. wodorotlenkiem sodu do wartości pH = 7, cała ilość lub większa część kryształków insuliny ulegnie całkowitemu rozpuszczeniu. Z tych względów, zawiesina insuliny krystalicznej w wodzie destylowanej nie znalazła zastosowania klinicznego.

Stwierdzono obecnie na podstawie doświadczeń biologicznych i klinicznych, że przy użyciu zawiesiny insuliny krystalicznej, otrzymanej sposobem według wynalazku, osiąga się preparat insuliny o przedłużonym działaniu, odpowiadający a nawet przewyższający stopień przedłużonego działania znanych preparatów insulino-wych.

Roztwór insuliny krystalicznej o stężeniu 40 jednostek międzynarodowych (1 ml do którego na każde 100 ml dodano 4 mg cynku w postaci chlorku) nie wykazuje godnego uwagi działania przedłużonego. Jeżeli jednak roztwór doprowadzi się do wartości pH = 5 i zostawi w spokoju, co powoduje wykrystalizowanie wytrąconej insuliny i wytworzenie zawiesiny kryształków, zawiesina wykazuje przedłużone działanie utrzymujące się dłużej niż 24 godziny.

Przyczyna przedłużonego działania preparatów insuliny, otrzymanych sposobem według wynalazku, nie została ściśle ustalona, jednakże przypuszcza się, że insulina zawarta jest w postaci krystalicznej i, że kryształy zawiesiny są trudno rozpuszczalne we krwi przy wartości pH dla niej charakterystycznej.

Jeżeli insulina krystaliczna znajduje się w postaci zawiesiny w ilości, np. 40 jednostek międzynarodowych (1 ml w roztworze chlorku cynku zawierającym, np. 0,008 % cynku o wartości pH = 7), w ośrodku rozpraszającym rozpuszczonej insuliny nie będzie.

Jeżeli ośrodek rozpraszający preparatów, wytworzonych sposobem według wynalazku, posiada wartość pH około 7, lub jest doprowadzony do tej wartości pH, stwierdzono, że kryształki insuliny wyosobnione wykazują zwiększoną zawartość metalu w porównaniu do stałej jej zawartości co w odniesieniu do cynku wynosi około 0,4 %.

Stwierdzone przedłużone działanie preparatów, otrzymanych sposobem według wynalazku, może być wobec tego wynikiem obecności lub wytwarzania się kryształków insuliny o zwiększonej zawartości metalu.

Z tego względu wywnioskowano, że można również osiągnąć przedłużone działanie preparatu przez zawieszenie kryształków insuliny o zwiększonej zawartości metalu w ośrodku rozpraszającym nie zawierającym metalu.

W celu wytworzenia preparatu o przedłużonym działaniu wystarcza aby w ośrodku rozpraszającym panowały takie warunki, w których kryształki wykazujące zwiększoną zawartość metalu byłyby trudno rozpuszczalne we krwi i w cieczy tkankowej przy wartości pH dla nich charakterystycznej.

Sposób według wynalazku jest również znamienny tym, że stosuje się ośrodek rozpraszający o takim składzie, w którym zawieszone kryształki insuliny wykazują zwiększoną zawartość pożądanego metalu, przy pH ośrodka zawiesiny wynoszącym lub doprowadzonym do wartości 7.

Jeżeli wytwarza się preparat z insuliny krystalicznej zawierającej około 0,4 % cynku lub odpowiednią ilość innego z poprzednio wymienionych metali, ośrodek zawiesiny winien wykazywać taką zawartość wymienionych metali, aby będące w stanie zawiesiny kryształki insuliny przy wartości pH ośrodka równej 7 posiadały zawartość metalu ponad 0,10 milirównoważników (1 g kryształków).

Jednakże stwierdzono, że aby otrzymać przedłużone działanie preparatów wytwarzanych sposobem według wynalazku, korzystnie jest przygotować kryształki insuliny o zawartości metalu około 0,20 milirównoważników (1 g kryształków, to znaczy, np. około 0,65 % cynku), przy założeniu, że insulina została wykrystalizowana przy użyciu cynku. Jeżeli zawartość cynku w kryształach wynosi, np. w przybliżeniu 1 %, wytwarzany preparat wykazuje przedłużone działanie równe przedłużonemu działaniu preparatów insuliny cynkowo-protaminowej. Przy większej zawartości cynku można otrzymać działanie bardziej przedłużone.

Co się tyczy zawartości metalu w ośrodku wodnym zawiesiny, należy zaznaczyć, że ze wzrostem zawartości metalu w ośrodku zawiesiny trzeba zwiększyć zawartość insuliny aby utworzyły się kryształki o zamierzonej zwiększonej zawartości metalu. Jeżeli zawiesinę doprowadzi się do zawartości 40 jednostek międzynarodowych insuliny (1 ml, otrzymuje się kryształki insuliny o zawartości cynku około 2,3 % przy wartości pH ośrodka równej 7) ośrodek doprowadza się do wspomnianego pH przy użyciu wodorotlenków alkalicznych (i przy zawartości cynku w ośrodku wynoszącej 0,008 %). Jeżeli ośro-

dek zawiera 10 jednostek międzynarodowych insuliny (1 ml, otrzymuje się insulinę krystaliczną o zawartości cynku około 2,6 %, a przy zawartości insuliny 80 jednostek międzynarodowych) 1 ml, otrzymuje się kryształki insuliny o zawartości około 1,8 % cynku, przy czym we wszystkich tych przypadkach zawartość cynku w kryształkach przed ich zawieszeniem wynosi około 0,4 %. Przy z góry określonej ilości kryształków insuliny na jednostkę objętości ośrodka zawiesiny, wzrastająca zawartość metalu w ośrodku wywołuje wzrost zawartości metalu w kryształkach. Jeżeli ośrodek zawiesiny posiada wartość pH wynoszącą około 7 lub jest do tej wartości pH doprowadzony, można w zwykłych warunkach związać, np. do 2,7 % cynku, co odpowiada liczbie grup kwasowych cząsteczki insuliny. Podobne stosunki odnoszą się do innych metali.

Przyjąwszy, że ośrodek zawiesiny nie zawiera substancji o większym powinowactwie chemicznym do wymienionych metali niż kryształki insuliny i, że te posiadają zwykłą zawartość metalu, ośrodek powinien zawierać najmniej jeden z wymienionych metali w ilości najmniej $7,5 \times A \times 10^{-3}$ milirównoważników (1 litr, przy czym A oznacza ilość międzynarodowych jednostek insuliny) 1 ml dodanych do ośrodka.

Przy najczęściej w praktyce używanym stężeniu insuliny, wynoszącym około 40 jednostek międzynarodowych (1 ml i przy ośrodku zawiesiny zawierającym cynk w ilości 0,002 %, oraz przy wprowadzeniu kryształków insuliny o zawartości cynku około 0,4 %), znajdujące się w zawiesinie kryształki insuliny będą zawierały około 1,1 % cynku przy wartości pH ośrodka zawiesiny równej 7. Przy zawartości cynku w ośrodku zawiesiny wynoszącej 0,004 %, kryształki zawierają około 1,7 % cynku, przy zawartości cynku w ośrodku zawiesiny wynoszącej 0,008 %, zawartość cynku w kryształkach insuliny wynosi około 2,2 %.

Jeżeli pożądané jest, aby będące w zawiesinie kryształki insuliny były nasycone cynkiem, np. zawierały około 2,7 % cynku, ośrodek zawiesiny powinien, w wyżej wymienionych warunkach, zawierać znacznie więcej cynku, mianowicie około 0,03 %.

Wartość pH ośrodka zawiesiny jest jednym z czynników posiadających decydujący wpływ na rozpuszczalność kryształków insuliny w ośrodku i na zwiększenie zawartości metalu w kryształkach. Przy założeniu, że ośrodek nie zawiera substancji posiadających szczególne właściwości zmniejszające rozpuszczalność kryształów, w preparatach do praktycznego użycia nie można

przeszkodzić rozpuszczaniu się wszystkich kryształków insuliny znajdujących się w stanie zawiesiny w ośrodku o wartości pH wyższej niż 9. Poza tym, powyżej tej wartości pH, trudno jest wytwarzać preparaty o wystarczającej trwałości. Także w normalnych warunkach, nie można przeszkodzić rozpuszczaniu się kryształów przy wartości pH ośrodka zawiesiny niższej niż 3—4. Wskutek tego, o ile ośrodek zawiesiny nie zawiera substancji, posiadających szczególne właściwości zmniejszania rozpuszczalności insuliny, należy utrzymywać wartość pH ośrodka we wspomnianych granicach.

Jak wynika z rozważań przytoczonych powyżej, zawiesina zawiera kryształki insuliny o zwiększonej zawartości metalu jeżeli ośrodek zawiesiny posiada wartość pH około 7, pod warunkiem, że ośrodek nie zawiera substancji o większym powinowactwie chemicznym do wymienionych metali niż kryształki insuliny.

W celu uzyskania przedłużonego działania, nie jest konieczne aby świeżo wytworzona zawiesina zawierała *in vitro* kryształki insuliny o zwiększonej zawartości metalu.

Zwiększoną zawartość metalu można osiągnąć przez zmianę wartości pH ośrodka zawiesiny do 7. Przypuszczalnie przyczyną tego jest zmiana wysokości wartości pH do około 7, zachodząca przy wstrzyknięciu takiej zawiesiny, w której kryształki insuliny o zwiększonej zawartości metalu tworzą się *in vivo*. Stwierdzono na podstawie doświadczeń klinicznych, że dwie zawiesiny o identycznym składzie, z których jedna jest doprowadzona do wartości pH = 4,5, druga do pH = 7 wykazują takie samo przedłużone działanie. Analiza ilości metalu zawartego w znajdujących się w stanie zawiesiny kryształkach insuliny wykazała, że kryształki insuliny o wartości pH = 4,5 zawierają normalną ilość metalu, natomiast kryształki o wartości pH = 7 zawierają zwiększoną ilość metalu. Wobec tego dalszą cechą znamioną wynalazku jest to, że ośrodek wodny zawiesiny posiada odczyn kwaśny lub jest do niego doprowadzany.

Sposobem według wynalazku można ośrodek zawiesiny doprowadzić do pożądanéj wartości pH za pomocą substancji buforowych lub ich mieszaniny.

Przy wyborze substancji buforowych i innych domieszek ośrodka wodnego zawiesiny należy wziąć pod uwagę rozmaite czynniki. Stwierdzono, że obecność w ośrodku zawiesiny pewnych anionów wpływa na przedłużone działanie preparatów insuliny, prawdopodobnie ze względu

na wpływ anionów na rozpuszczalność kryształków insuliny w ośrodku, jak również na zdolność kryształków do adsorbowania metali z ośrodka zawiesiny lub do utrzymania zwiększonej zawartości metalu. Jeżeli np. insulina krystaliczna znajduje się w stanie zawiesiny w wodnym roztworze zawierającym 0,008 % cynku (w postaci chlorku) i 1/120 molowego roztworu fosforanu sodu, doprowadzonym do wartości $\text{pH} = 5$, a następnie do $\text{pH} = 7$, kryształki rozpuszczają się całkowicie lub częściowo bez wiązania cynku.

To samo będzie miało miejsce jeżeli zamiast soli fosforanowej użyje się jako buforu cytrynianu. Jednakże, jeżeli zamiast cynku użyje się niklu, przy zmianie wartości pH do 7 w obecności fosforanu, kryształki insuliny nie rozpuszczają się lecz zaabsorbują nikiel z ośrodka zawiesiny.

Przypuszcza się, że jony fosforanowe posiadają większe powinowactwo chemiczne do jonów cynku niż kryształki insuliny i wskutek tego w środowisku obojętnym wiążą jony cynkowe. W przypadku obecności jonów niklu, jony fosforanowe nie wiążą ich w takim stopniu, aby uniemożliwić reakcję z kryształkami insuliny.

Z tego względu, przy wytwarzaniu preparatów o przedłużonym działaniu silnie działających, przy użyciu substancji buforowej w celu doprowadzenia ośrodka zawiesiny do odpowiedniej wartości pH , należy używać takiej substancji buforowej, której anion w środowisku obojętnym, nie wiąże metalu wchodzącego w grę.

Ustalona rozpuszczalność kryształków insuliny daje korzyści, ponieważ umożliwia wytwarzanie preparatów insuliny wykazujących częściowo szybkie działanie, częściowo działanie przedłużone. Ośrodek zawiesiny może posiadać taki skład i kwasowość, że może zawierać insulinę rozpuszczoną lub w postaci bezpostaciowego osadu.

Można z góry zapewnić obecność insuliny rozpuszczonej lub wytrąconej jako bezpostaciowy osad, dopuszczając do rozpuszczenia się części kryształków insuliny i następnie wytrącając ją jako osad bezpostaciowy. W związku z tym, dalszą cechą znamioną wynalazku jest to, że używa się ośrodka zawiesiny zawierającego w nadmiarze insulinę rozpuszczoną lub w postaci bezkształtnego osadu lub że uzyskuje się taki ośrodek zawiesiny przez dodanie kryształków insuliny.

Insulinę o szybkim działaniu można również otrzymać przez dodanie do ośrodka zawiesiny

anionów powodujących rozpuszczalność kryształków insuliny w środowisku obojętnym.

Zmieniając w ośrodku zawiesiny zawartość cynku lub podobnych metali, pH , zawartość anionów oraz zawartość rozpuszczonej insuliny lub insuliny wytrąconej jako bezpostaciowy osad, umożliwia się, zgodnie z wynalazkiem otrzymanie preparatów insuliny, wykazujących zarówno przedłużone działanie o zamierzonej długości trwania jak i w zamierzonym stopniu szybkie działanie insuliny rozpuszczonej. Wynalazek jest również oparty na spostrzeżeniu, że przedłużone działanie wytwarzanej zawiesiny kryształków insuliny zależy od ich wielkości. Stwierdzono na podstawie biologicznych doświadczeń, przeprowadzonych zgodnie z wynalazkiem na pozbawionych trzustki psach, że kryształki insuliny o wielkości około 10μ w zawieszynie zawierającej cynk w omówionych ilościach wykazują przedłużone działanie w tym samym stopniu co insulina cynkowo-protaminowa, zaś kryształki o wielkości $25 - 100 \mu$ wykazują jeszcze bardziej przedłużone działanie.

Fakt ten należy brać pod uwagę stosując ziarnka krystalicznej insuliny o odpowiedniej wielkości. Do wytwarzania preparatów insuliny można używać kryształków insuliny otrzymywanych przy użyciu jakiegokolwiek sposobu krystalizacji dającego pożądane wyniki. Spośród dotąd znanych sposobów najkorzystniejsza jest tak zwana metoda cytrynianowa - opisana, np. w patencie duńskim nr 70270. Z innych korzystnych sposobów wymienić należy, np. sposób opracowany przez Scotta [Biochemical J. 28, 1952 (1934)] i późniejsze sposoby z niego wyprowadzone. Do wytwarzania ośrodka zawiesiny wykazującego zawartość wymienionych metali, można używać wody destylowanej z dodatkiem jednego z wymienionych metali, np. w postaci soli. Do użytku klinicznego jest jednak korzystniej stosować izotoniczne ośrodki zawiesiny.

Właściwości izotoniczne ośrodka wodnego można osiągnąć przez dodatek substancji takich jak np. glukoza, chlorek sodu lub gliceryna. W celu zachowania trwałości preparatów insulinowych należy dodawać do nich jednego lub więcej ośrodków konserwujących stosowanych zwykle do cieczy do wstrzykiwania, np. fenolu i jego pochodnych, estru metylowego kwasu p-hydroksybenzoowego (nipagina), estru propylowego kwasu p-hydroksybenzoowego i octanu fenylortęciowego.

Różne przykłady ośrodków wodnej zawiesiny stosowanych do wytwarzania preparatów insulinowych sposobem według wynalazku i wykazu-

jących zawartość wymienionych metali podano poniżej.

Przykład I. Ośrodek zawiesiny składający się z roztworu izotonicznego do którego dodano środka konserwującego oraz jednego z poprzednio wymienionych metali posiada skład następujący:

0,9 % chlorku sodu
0,1 % nipaginy
0,004 % cynku (jako chlorku)

Jeżeli ten ośrodek zawiesiny doprowadzi się do wartości $\text{pH} = 6-7$ zwykle kryształki insuliny będą w nim jeszcze trudniej rozpuszczalne niż w czystej wodzie, natomiast kryształki o zwiększonej zawartości cynku tworzą się przez ich zawieszenie. Jeśli kryształki zawierające pierwotnie około 0,4% cynku doda się w takiej ilości, że ośrodek zawiesiny zawiera 40 międzynarodowych jednostek (1 ml), kryształki będące w stanie zawiesiny zawierają około 1,7% cynku.

Przy użyciu kryształków insuliny znacznie większych niż 10 μ , korzystnie jest dodać do ośrodka stabilizatora, który podnosi lepkość ośrodka zawiesiny do takiego stopnia, że kryształki utrzymywane są w stanie zawiesiny w ciągu odpowiedniego okresu czasu po wstrząśnięciu ampułki.

Jako stabilizatora zawiesiny można użyć, np. wysokocząsteczkowych polisacharydów. Można także używać innych utrwalaczy, które w danych warunkach są nieczynne w stosunku do kryształków insuliny i innych składników ośrodka zawiesiny.

Przykład II. Do wodnego roztworu substancji izotonicznej dodano środka konserwującego, jednego z wymienionych metali i stabilizatora zawiesiny. Skład był następujący:

0,9 % chlorku sodu
0,2 % trójkrezolu
0,005 % niklu (jako chlorku)
5 % dekstranu zdepolimeryzowanego.

Wartość pH doprowadzono za pomocą ługu sodowego do 6—7. Kryształki insuliny nie zawierające niklu będąc zawieszone w tym roztworze w takiej ilości, aby ośrodek zawiesiny zawierał 40 jednostek międzynarodowych/1 ml, zawierają nikiel.

Wspomniano poprzednio, że ośrodek wodnej zawiesiny może zawierać substancję buforową lub mieszaninę takich substancji, częściowo w celu uregulowania i utrzymania pH ośrodka, częściowo w celu spowodowania szybkiego działania preparatu *in vivo*. Jako przykłady sub-

stancji buforowych można wymienić octany, borany, cytryniany, dwuetylobarbiturany, fosforany, jabłeczany lub ich mieszaniny. Z wymienionych substancji buforowych fosforany i cytryniany można korzystnie używać do spowodowania szybkiego działania preparatów.

Przykład III. Ośrodek zawiesiny składający się z wodnego roztworu substancji izotonicznej do którego dodano środka konserwującego, jednego z wymienionych metali oraz substancji buforowej posiada następujący skład:

0,8 % chlorku sodu
0,1 % nipaginy
0,008 % cynku (jako chlorku)
1/120 molowego roztworu octanu sodu

Wartość pH doprowadzono przy użyciu CHI do około 5.

Zwykle kryształki insuliny wykazują w tym ośrodku zawiesiny małą rozpuszczalność podobnie jak w ośrodku zawiesiny według przykładu I. Jeżeli kryształki insuliny zawierające około 0,4 % cynku znajdują się w ośrodku w postaci zawiesiny w takiej ilości aby zawiesina zawierała 40 międzynarodowych jednostek/1 ml i jeżeli pH ośrodka zawiesiny doprowadzi się do wartości 7, np. przy użyciu NaOH , zawieszono kryształki zawierają około 2,2 % cynku.

Przykład IV. Ośrodek wodnej zawiesiny posiadający taką samą kwasowość jak ciecz tkankowa ciała ludzkiego oraz izotoniczny z krwią posiada następujący skład:

1,3 % części objętościowych gliceryny
0,1 % nipaginy
0,002 % cynku
1/120 molowego roztworu kwasu dwuetylobarbiturowego

Wartość pH doprowadzono przy użyciu NaOH do około 7,2. Mniej niż 2 jednostki międzynarodowe insuliny/1 ml przechodzą w tym ośrodku zawiesiny do roztworu. Jeżeli w ośrodku znajdują się kryształki insuliny zawierające około 0,4 % cynku w stanie zawiesiny w takiej ilości aby ośrodek zawierał 40 jednostek międzynarodowych/1 ml, kryształki zawierają około 1,1 % cynku.

Przykład V. Ośrodek wodnej zawiesiny o słabo zasadowym odczynie posiada następujący skład:

1,3 % części objętościowych gliceryny
0,1 % nipaginy
0,016 % cynku (jako chlorku)
1/120 molowego roztworu kwasu borowego

Wartość pH doprowadzono przy użyciu NaOH do około 8.

Także w tym ośrodku zawiesiny do roztworu przechodzi mniej niż 2 jednostki międzynarodowe insuliny/1 ml. Jeżeli w ośrodku znajdują się w stanie zawiesiny kryształki insuliny zawierające około 0,4 % cynku w takiej ilości aby ośrodek ten zawierał 40 międzynarodowych jednostek/1 ml i jeżeli doprowadzi się go do wartości $\text{pH} = 7$, np. przy użyciu HCl , kryształki insuliny zawierają około 2,5 % cynku.

Przykład VI. Przygotowuje się wodny ośrodek zawiesiny zawierający

0,8 % chlorku sodu
0,1 % nipaginy
0,001 % cynku (jako chlorku)
1/120 molowego roztworu octanu sodu

i doprowadza się pH do wartości 5 przy użyciu HCl .

Jeżeli w ośrodku znajdują się w postaci zawiesiny kryształki insuliny o zawartości cynku około 0,4 % w takiej ilości aby ośrodek ten zawierał 40 jednostek międzynarodowych/1 ml, zawieszono kryształki zawierają około 0,8 % cynku, przy założeniu, że wartość pH ośrodka zawiesiny doprowadzono przy użyciu NaOH do 7.

Przykład VII. Przygotowano roztwór wodny zawierający

0,8 % chlorku sodu
0,1 % nipaginy
0,008 % niklu (jako chlorku)
1/120 molowego roztworu fosforanu sodu

i doprowadzono go przy użyciu HCl do wartości $\text{pH} = 7$.

Jeżeli w roztworze znajdują się w postaci zawiesiny kryształki insuliny o zawartości niklu około 0,3 % w takiej ilości aby zawiesina zawierała 40 międzynarodowych jednostek/1 ml, kryształki te wykazują zwiększoną zawartość niklu.

Przykład VIII. Przygotowano roztwór wodny zawierający

1,3 % części objętościowych gliceryny
0,2 % trójkrezolu
0,014 % kadmu (jako chlorku)
1/120 molowego roztworu octanu sodu

i doprowadzono roztwór do wartości $\text{pH} = 5$ przy użyciu HCl .

Jeżeli znajdujące się w postaci zawiesiny kryształki insuliny o zawartości cynku około 0,4 %

znajdują się w ośrodku w takiej ilości aby zawiesina zawierała 40 jednostek międzynarodowych/1 ml, kryształki te wykazują zawartość około 3 % Cd , przyjąwszy, że wartość pH zawiesiny doprowadzono przy użyciu NaOH do 7.

Przykład IX. Przygotowano roztwór wodny zawierający

0,8 % chlorku sodu
0,1 % nipaginy
0,006 % miedzi (jako chlorku)
1/120 molowego roztworu octanu sodu

i doprowadzono wartość pH do 6 przy użyciu HCl . Jeżeli kryształki insuliny o zawartości cynku około 0,4 % znajdują się w stanie zawiesiny w ośrodku w takiej ilości aby zawartych było 40 jednostek międzynarodowych/1 ml ośrodka zawiesiny, znajdujące się w stanie zawiesiny kryształki zawierają miedź.

Ośrodek zawiesiny kryształków insuliny w wyżej wymienionych przykładach posiada taki skład, że kryształki są praktycznie nierozpuszczalne w ośrodku. Preparaty insulinowe otrzymane tym sposobem odznaczają się przede wszystkim przedłużonym działaniem. Można jednak jak uprzednio wspomniano wytwarzać preparaty o częściowo przedłużonym i częściowo szybkim działaniu.

Przykład X. Przygotowano roztwór zawierający

1,3 % części objętościowych gliceryny
0,1 % nipaginy
0,008 % cynku (jako chlorku)
1/120 molowego roztworu octanu sodu

i doprowadzono wartość pH do 4 przy użyciu HCl .

Jeżeli kryształki insuliny o zawartości cynku około 0,4 % znajdują się w tym roztworze w stanie zawiesiny w ilości 40 międzynarodowych jednostek/1 ml, $1/3$ ilości kryształków insuliny przechodzi do roztworu, w wyniku czego ośrodek zawiesiny zawiera 12 — 14 międzynarodowych jednostek rozpuszczalnej insuliny/1 ml.

Przy podskórnym lub domięśniowym wstrzykiwaniu otrzymanej zawiesiny, uzyskuje się działanie częściowo szybko dzięki obecności rozpuszczonej insuliny, częściowo przedłużone dzięki zawartości kryształków insuliny będących w stanie zawiesiny.

Przykład XI. Przygotowuje się wodny roztwór chlorowodoru zawierający

- 1,3 % części objętościowych gliceryny
- 0,1 % nipaginy
- 0,008 % cynku (jako chlorku)
- 1/120 molowego roztworu kwasu dwuetylobarbiturowego
- 0,087 % insuliny (23 jednostki międzynarodowe (1 mg) rozpuszczonej w HCl

i przy użyciu NaOH doprowadza się wartość pH roztworu do około 7, przy której rozpuszczalna insulina wytrąca się ilościowo jako bezpostaciowy osad (20 jednostek międzynarodowych/1 ml).

Jeżeli w powstałym ośrodku znajdują się kryształki insuliny w stanie zawiesiny, osiąga się przy wstrzykiwaniu podskórnym lub domięśniowym jej działanie szybkie oraz przedłużone.

W wyżej wymienionych przykładach dodawano metale w postaci chlorków. Nie ma jednak żadnych przeszkód w dodawaniu metali w postaci innych nieorganicznych lub organicznych związków jak siarczany, azotany, octany, cytryniany, wodorotlenki, tlenki lub związki złożone, lub też w postaci czystego metalu pod warunkiem, że użyty metal lub jego związek będzie znajdował się w takim stanie w warunkach panujących w ośrodku aby tworzące się kryształki insuliny mogły go wiązać.

Należy dalej zwrócić uwagę, że zmiany pH ośrodka po wprowadzeniu kryształków insuliny w stan zawiesiny, wspomniane w niektórych przykładach, należy traktować jedynie jako czynność dodatkową.

Ośrodek zawiesiny jest gotowy do użycia przy takiej wartości pH do jakiej został doprowadzony w czasie wytwarzania.

W wymienionych przykładach kryształki insuliny wytwarza się oddzielnie z zastosowaniem antyseptycznej krystalizacji, następnie z zachowaniem antyseptycznych warunków dodaje się kryształki do gotowego jałowego ośrodka wodnej zawiesiny.

Sposobem według wynalazku można krystalizować insulinę także w gotowym ośrodku zawiesiny w sposób opisany w niżej podanych przykładach.

Przykład XII. 174 mg insuliny rozpuszcza się w 20 ml 0,01 n kwasu solnego i dodaje się w niżej podanej kolejności

- 20 ml 4 % roztworu chlorku sodu
- 10 ml 1/12 molowego roztworu octanu sodu
- 50 ml roztworu zawierającego 0,004 % cynku
- 0,2 % nipaginy

Następnie obniża się wartość pH do około 5 kwasem solnym i wytworzoną zawiesinę umiesz-

cza się w ampulce. Jeżeli pozostawi się zawiesinę w spokoju, wytrącona insulina przechodzi w krystaliczną.

Sposobem według wynalazku jako ośrodek zawiesiny można używać cieczy macierzystej z krystalizacji insuliny, przy czym do cieczy macierzystej dodaje się wszelkich brakujących substancji jak substancji izotonicznych, cynku lub podobnych metali, substancji stabilizujących oraz substancji regulujących wartość pH.

Przykład XIII. 174 mg krystalicznej insuliny rozpuszcza się w 20 ml 0,01 n HCl i do roztworu dodaje się 20 ml 4 % roztworu chlorku sodu oraz 10 ml 1/12 molowego roztworu octanu sodu. Następnie doprowadza się wartość pH roztworu do około 5,5. Po ukończeniu krystalizacji dodaje się 50 ml roztworu związku cynku zawierającego 0,016 % cynku i 0,2 % nipaginy. W razie potrzeby reguluje się wartość pH otrzymanej zawiesiny. Zgodnie z wynalazkiem można dodać metalu przed lub po przeprowadzeniu kryształków insuliny w stan zawiesiny.

Można więc wyjść z aseptycznie wytwarzanych kryształków insuliny, zawieszonych w wodnym ośrodku, do których dodaje się później odpowiedniego metalu.

Przykład XIV. 174 mg kryształków insuliny zawieszają się w 50 ml ośrodka wodnej zawiesiny zawierającego

- 1,6 % chlorku sodu
- 0,2 % nipaginy
- 1/60 molowego roztworu octanu sodu

i doprowadza się wartość pH do 5,5 przez dodanie HCl. Do tej zawiesiny dodaje się 50 ml związku cynku w roztworze o takiej samej kwasowości, zawierającego 0,016 % cynku. Można użyć roztworu cynku o innej kwasowości niż ośrodek zawiesiny, w tym przypadku uregulowanie wartości pH utworzonej zawiesiny można przeprowadzić później.

Przy zmianie pH ośrodka zawiesiny do 7, kryształki insuliny będące w stanie zawiesiny zawierają około 2,2 % cynku, przy założeniu, że kryształki zawierały uprzednio około 0,4 % cynku.

Podobnie można całkowicie lub częściowo zapewnić zawartość metalu w zawiesinie przez używanie kryształków insuliny wykazujących zwiększoną zawartość metalu.

Przykład XV. Przygotowuje się roztwór zawierający

1,3 % części objętościowych gliceryny

0,1 % nipaginy

1/120 molowego roztworu octanu sodu

i doprowadza się wartość pH do 5 przy użyciu HCl.

Jeżeli 1,7 g kryształków insuliny o zawartości cynku około 2 % znajduje się w stanie zawiesiny w 1 litrze tego wodnego ośrodka, kryształki pozostają nierozpuszczone, lecz część cynku przechodzi do roztworu w ośrodku, w wyniku czego zawiera cynk.

Podane powyżej przykłady należy traktować jedynie jako wyjaśniające istotę wynalazku, którego zasadniczą cechą jest wytworzenie zawiesiny kryształków insuliny, wykazujących zawartość omawianych metali większą niż zawartość w dotychczas znanych preparatach.

Z tego względu zakres wynalazku obejmuje wprowadzanie w stan zawiesiny kryształków insuliny o zwiększonej zawartości jednego z omawianych metali w ośrodku odpowiednim do wstrzykiwań i nie wykazującym zawartości omawianych metali po zawieszeniu w nim kryształków. Jako przykład takich ośrodków można wymienić wodę destylowaną i oleje takie jak olej oliwkowy, sezamowy i arachidowy. Należy zauważyć, że preparaty insulinowe wytwarzane sposobem według wynalazku, jeśli to jest wymagane, można dostarczać na rynek w dwóch ampułkach, z których jedna zawiera ośrodek zawiesiny a druga kryształki insuliny o zwiększonej zawartości wspomnianych metali.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania preparatów insuliny o przedłużonym działaniu, znamieny tym, że wytwarza się zawiesinę kryształków insuliny wykazującą zawartość metali koniecznych do krystalizacji insuliny, takich jak cynk, kobalt, nikiel, kadm, miedź, mangan lub żelazo w ilości powyżej $7,5 \times A \times 10^{-3}$ milirównoważników/1 litr, przy czym A oznacza ilość międzynarodowych jednostek insuliny/1 ml zawiesiny.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że stosuje się ośrodek zawierający wspomniane metale lub do ośrodka wprowadza się wspomniane metale przez dodanie kryształków insuliny.
3. Sposób według zastrz. 2, znamieny tym, że stosuje się ośrodek zawiesiny zawierający takie metale i ewentualnie substancję buforową, aby zawieszone kryształy insuliny wykazywały zwiększoną zawartość wymienionych metali przy wartości pH ośrodka za-

wiesiny wynoszącej około 7 lub doprowadzonej do tej wartości.

4. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że stosuje się ośrodek zawiesiny o takiej zawartości metalu wspomnianego, aby kryształy insuliny przy zawartości pH = 7 ośrodka wykazywały zawartość w przybliżeniu powyżej 0,10 milirównoważników, najkorzystniej powyżej 0,20 milirównoważników (1 g kryształków).
5. Sposób według zastrz. 1 — 4, znamieny tym, że stosuje się ośrodek wodnej zawiesiny zawierający co najmniej jeden ze wspomnianych metali w ilości najmniej $7,5 \times A \times 10^{-3}$ milirównoważników/1 litr, przy czym A wskazuje ilość międzynarodowych jednostek insuliny/1 ml ośrodka.
6. Sposób według zastrz. 1 — 5, znamieny tym, że stosuje się ośrodek wodnej zawiesiny o wartości pH około 7, lub doprowadza się pH ośrodka do tej wartości.
7. Sposób według zastrz. 1 — 5, znamieny tym, że stosuje się ośrodek wodnej zawiesiny posiadający odczyn kwaśny lub doprowadza się ośrodek do takiego odczynu.
8. Sposób według zastrz. 6 lub 7, znamieny tym że ośrodek zawiesiny doprowadza się za pomocą substancji buforowej lub mieszaniny substancji buforowych do odpowiedniej wartości pH.
9. Sposób według zastrz. 8, znamieny tym, że stosuje się substancje buforowe, których aniony nie wiążą metalu przy odczynie obojętnym.
10. Sposób według zastrz. 1 — 9, znamieny tym, że stosuje się ośrodek zawiesiny zawierający insulinę rozpuszczoną lub wytrąconą jako bezpostaciowy osad, lub wzbogacony w insulinę przez dodanie kryształków.
11. Sposób według zastrz. 10, znamieny tym, że stosuje się ośrodek zawiesiny, do którego dodaje się anionów wpływających na rozpuszczalność kryształków insuliny przy odczynie obojętnym.
12. Sposób według zastrz. 1 — 11, znamieny tym, że stosuje się ziarenka krystalicznej insuliny o oznaczonej wielkości.
13. Sposób według zastrz. 1 — 12, znamieny tym, że stosuje się izotoniczny ośrodek zawiesiny.
14. Sposób według zastrz. 1 — 13, znamieny tym, że stosuje się środek konserwujący zawiesinę.
15. Sposób według zastrz. 12, znamieny tym, że stosuje się środek stabilizujący zawiesinę.

16. Sposób według zastrz. 1 – 15, znamienny tym, że krystalizację insuliny przeprowadza się w ośrodku zawiesiny.
17. Odmiana sposobu według zastrz. 1 – 16, znamienna tym, że jako ośrodek zawiesiny stosuje się ciecz macierzystą z krystalizacji insuliny, do której dodaje się brakujących substancji, np. substancji izotonicznych, cynku lub podobnego metalu, substancji stabilizujących zawiesinę i (lub) substancji warunkujących wartość pH.
18. Sposób według zastrz. 1 – 17, znamienny tym, że kryształki insuliny znajdują się w stanie zawiesiny przed dodaniem wspomnianych jonów metalicznych.
19. Sposób według zastrz. 1 znamienny tym, że kryształki insuliny o zwiększonej zawartości najmniej jednego z wymienionych metali, przeprowadza się w stan zawiesiny w ośrodku wodnym lub olejowym stosowanym do wstrzykiwań i nie wykazującym przed zawieszeniem kryształków zawartości omawianych metali.

Novo Terapeutisk
Laboratorium A/S

Zastępca: Kolegium Rzeczników Patentowych