

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 160880 B

(21) Patentansøgning nr.: 3761/87

(51) Int.Cl.⁵ C 07 K 7/40
A 61 K 37/26

(22) Indleveringsdag: 20 jul 1987

(41) Alm. tilgængelig: 06 maj 1988

(44) Fremlagt: 29 apr 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 21 jul 1986 DK 3470/86

(71) Ansøger: *Novo Nordisk A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Jan *Markussen; DK, Kjeld *Norris; DK, Liselotte *Langkjær; DK

(74) Fuldmægtig: -

(54) Insulinderivater samt injicerbare opløsninger indeholdende disse

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 3583/84, 3582/84
EP off.g.skrift nr. 133285, 140084

(57) Sammendrag:

3761-87

Insulinderivater, som har en ladning, der er positiv sammenlignet med ladningen af humaninsulin ved neutral pH, kan anvendes til fremstilling af opløsninger med retarderet insulinvirkning. I de hidtil ukendte insulinderivater er en basisk aminosyre substitueret i B27-stillingen og/eller en neutral aminosyre er indsat i A4-, A17-, B13- og/eller B21-stillingen. Den C-terminale i A-kæden, Asn^{A21}, kan være substitueret med en anden aminosyre med henblik på at øge stabiliteten af opløsningerne ved den for farmaceutiske produkter svagt sure pH. Endvidere kan den C-terminale carboxylgruppe i B-kæden være beskyttet med en amido- eller estergruppe. Under forudsætning af at A21 er Asn, er carboxylsyregruppen i B30 fri.

DK 160880 B

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte insulinderivater af den i krav 1 angivne art og hidtil ukendte, injicerbare opløsninger med retarderet insulinvirkning.

Til behandling af diabetes mellitus er der foreslået
5 og anvendt mange forskellige insulinpræparater. Nogle af præparaterne er hurtigtvirkende, og andre præparater har mere eller mindre retarderet virkning. En sådan retarderet virkning kan fås ved indgivelse af insulinet som en suspension af insulin-
krystaller. De krystallinske præparater kan fås ved kry-
10 stallisation af insulin i nærværelse af zink (såsom Lente^{VM}, se Schlichtkrull: Insulin Crystals, Chemical and Biological Studies on Insulin Crystals and Insulin Zinc Suspensions, Munksgaard, 1958) eller ved krystallisation af insulin i nærværelse af zink og protamin (såsom NPH-insulin, se Rep.Steno
15 Mem.Hosp. 1 (1946), 60).

En ulempe ved anvendelsen af de kendte suspensioner af zinkinsulinkrystaller eller af zinkprotamininsulin er nødvendigheden af at ryste hætteglasset for at sikre, at der injiceres den rigtige mængde insulin, og for at sikre, at insulin-
20 koncentrationen i hætteglasset forbliver konstant under anvendelsen deraf. I Penfill^{VM}-ampuller, hvor der ikke må være luft til stede, nødvendiggør insulinsuspensioner med retarderet virkning inkorporering af et fast legeme i ampullen for at muliggøre omrystning. Omrystningen af insulinsuspensioner og
25 insulinopløsninger med luft er i sig selv en uønsket proces, idet insulin har tendens til at denaturere under dannelse af fibriller ved vand-luftgrænseflader. Insulinopløsninger med retarderet virkning er derfor ønskelige.

Opløsninger af insulinderivater med retarderet vir-
30 ning kunne fås fra insulin, som var modificeret i aminogrupperne ved omsætning med phenylisocyanat (såkaldt Isoinsulin, se Hallas-Møller: Chemical and Biological Insulin Studies based upon The Reaction between Insulin and Phenylisocyanate, Køben-

havn 1945). På tilsvarende måde var det angivet, at Al,B29-di-Boc-substitueret insulin (Boc betegner tertiær butyloxycarbonyl) viser retarderet insulinvirkning efter subkutan indgivelse (se Geiger & Enzmann: Proinsulin, Insulin, C-peptide; Proceedings of the Symposium on Proinsulin, Insulin and C-Peptide, Tokushima 1978; Amsterdam-Oxford 1979, 306 - 310). Al,B29-di-Boc-substitueret insulin viste sig at udvise for ringe retarderet virkning til at være klinisk anvendelig.

Opløsninger af umodificerede insuliner kræver store mængder zinkioner (f.eks. 0,4 - 1 mg/U insulin) for at udvise retarderet virkning (se J.Pharmacol. 55 (1935), 206). Injektion af så store doser zinkioner vil sandsynligvis være smertefuldt, og derfor har sådanne opløsninger aldrig været anvendt i behandlingsøjemed.

Insulins isoelektriske punkt er ca. 5,5, og der er gjort forsøg på at formindske opløseligheden af insulinderivater ved neutralt pH ved at ændre det isoelektriske punkt opad, f.eks. ved i B-kædens N-terminal at indføre basiske aminosyrer såsom lysin eller arginin (se f.eks. tysk offentliggørelses-skrift nr. 2.042.299) eller med det basiske dipeptid, arginyl-arginin (se Geiger & Enzmann, som er anført ovenfor). Opløseligheden af Arg^{B(-1)}-Arg^{B0}-insulin nær dens isoelektriske punkt var imidlertid meget højere end opløseligheden af det til grundliggende insulin.

Japansk patentansøgning nr. 55-144032 angår humaninsulinanaloger, hvori B30-aminosyren er udskiftet med en aminosyre med mindst fem kulstofatomer, og amider og estere deraf. Disse insulinanaloger skulle anvendes til patienter, der havde dannet antistoffer mod pattedyrinsuliner. I den japanske patentansøgning er der beskrevet seks specifikke forbindelser, hvoraf ingen er angivet at have retarderet virkning. Der er ikke beskrevet specifikke, injicerbare præparater i den japanske patentansøgning.

Europæisk patentansøgning nr. 84108442.9 (EP-offentliggørelsesskrift nr. 132.770) angår insulinanaloger, hvori der er knyttet en basisk, organisk gruppe til B30-aminosyren, hvor-

ved der indføres en positiv ladning ved neutral pH. I disse analoger er B30-aminosyren neutral og fortrinsvis threonin som i humaninsulin. Tysk patentansøgning nr. 3.327.709,5 angår en suspension af krystaller af de i ovennævnte europæiske patent-
5 ansøgning angivne derivater samt en aromatisk hydroxyforbindelse. Tysk patentansøgning nr. 3.326.473,2 angår et lægemiddel indeholdende en blanding af insulinforbindelser, blandt hvilke mindst en er beskrevet i ovennævnte europæiske patentansøgning. Europæisk patentansøgning nr. 84110813.7 (EP-offentliggørelses-
10 skrift nr. 140.084) angår forbindelser, der er særdeles nært beslægtede med de i førstnævnte europæiske patentansøgning angivne forbindelser.

Europæisk patentansøgning publikationsnr. 194.864 med prioritet fra 12. marts 1985 angår insulinderivater, hvori den
15 C-terminale B30-rest altid er blokeret med en amido- eller estergruppe, og hvori A21-aminosyren altid er asparagin som i humaninsulin.

Ingen af de i de to foregående afsnit citerede patentansøgninger omhandler forbindelsernes ringe kemiske
20 stabilitet. I ingen af de citerede patentansøgninger er der tale om det specielle substitutionsmønster, som er grundlaget for den foreliggende opfindelse.

Det har nu overraskende vist sig, at insulinderivater med den i krav 1 angivne almene formel I har særdeles fremra-
25 gende kemisk stabilitet og en kombineret kort og retarderet insulinvirkning.

Insulinderivaterne ifølge den foreliggende opfindelse er forskellige fra humaninsulin ved:

a) eventuel tilstedeværelse af en usubstitueret amid-
30 rest i B-kædens C-terminale carboxylgruppe,

b) at den har mindst én ladning mere end humaninsulin ved pH 7, fortrinsvis ikke mere end 4 ladninger mere end humaninsulin ved pH 7,

c) at den C-terminale asparaginrest i A-kæden, Asn^{A21}, kan være udskiftet med en anden naturligt forekommende aminosyre, som der kan kodes for af nucleotidsekvenser,

d) at såfremt en ændring i ladningen fås ved bloke-
5 ring af carboxylgruppen i B30-aminosyren, er A21-aminosyrerest-
sten forskellig fra en asparaginrest.

Ændringen i ladningen fås ved at udskifte en eller flere af aminosyreresterne sammenlignet med humaninsulin og om ønsket ved blokering af carboxylgruppen i B30-aminosyren.

10 Specifikt kan de forbindelser, der er af interesse ved udførelsen af denne opfindelse, karakteriseres som følger: En eller flere af de fire glutaminsyrerester i A4, A17, B13 og B21 er erstattet med en glutaminrest, og/eller threoninresten i B27 er erstattet med L-arginin- eller L-lysinrest, og/eller
15 threoninresten i B30 er erstattet med en lysinrest, den C-terminale carboxylgruppe i B-kæden kan være beskyttet, og asparaginresten i A21 kan være udskiftet med en af de i krav 1 angivne L-aminosyrerester.

Opfindelsen angår også opløsninger af nedenstående
20 forbindelser med formlen I, eventuelt indholdende et kontrolleret zinkionniveau. Derved forbedres og reguleres insulinvirkningens retarderingsgrad. Disse injicerbare opløsninger ifølge opfindelsen er ejendommelige ved, at de som aktiv bestanddel indeholder en forbindelse ifølge krav 1.

25 Den fremragende kemiske stabilitet fremgår af nedenstående tabel IV og V, hvorefter det fremgår, at stabiliteten opnås ved udskiftningen i A21-stillingen (W). De øvrige udskiftninger af aminosyrer giver den ønskede, retarderede virkning. Der er følgelig ved denne opfindelse foretaget flere ændringer
30 i forhold til humaninsulin for at få både forøget kemisk stabilitet og retarderet virkning.

En undergruppe af forbindelser med formel I er hidtil ukendte forbindelser med den almene formel I, hvori A, B, E¹, E², E³, E⁴, X og Y er som angivet i krav 1, R betegner en usubstitueret amidorest, der blokerer den C-terminale carboxyl-
35 gruppe i B-kæden, og W er forskellig fra en asparaginrest.

Sammenlignet med humaninsulin opnås ændringen i ladning ved at udskifte threoninresten i B27-stillingen med en arginin- eller lysinrest og/eller ved at udskifte en vilkårlig af de fire glutaminsyrerester i A4-, A17-, B13- og B21-stillingen med en glutaminrest. Yderligere kan den C-terminale carboxylgruppe i B-kæden være blokeret af en aminogruppe, hvorved den eliminerer den negative ladning af carboxylgruppen. Ydermere kan der indføres en positiv ladning ved at indføre en lysylrest i B30-stillingen.

10 Da forbindelser med formel I kan anvendes i klinikken som opløsninger med retarderet virkning, kan der forekomme et fald i immunogeniciteten i sammenligning med de almindeligt anvendte opløsninger af svine- eller humaninsulin.

Retarderingsgraden kan forøges og reguleres ved til-
15 sætning af zinkioner.

Væsentlige parametre til regulering af retarderingsgraden af insulinvirkningen er koncentrationen af zink og valget af forbindelsen med formel I. Området for det foretrukne zinkindhold strækker sig fra 2 µg til ca. 2 mg/ml, fortrinsvis
20 fra 5 µg til 200 µg/ml zink med udskiftning i B13- og/eller B27-stillingen og fortrinsvis fra ca. 20 til 200 µg/ml med andre analoger i et præparat indeholdende 240 nmol af en forbindelse med formel I pr. ml. Ved anvendelse af andre koncentrationer af forbindelsen med formel I skal zinkindholdet
25 justeres tilsvarende.

Den retarderede virkning af opløsninger af forbindelser med formel I i nærværelse af zinkioner tilskrives den lave opløselighed af sådanne forbindelser ved neutralt pH.

pH-værdien af den injicerbare opløsning ifølge denne
30 opfindelse skal fortrinsvis være under den fysiologiske pH-værdi, idet den øvre grænse er den pH-værdi, ved hvilken der sker udfældning. Ved den fysiologiske pH-værdi har forbindelser med formel I ifølge opfindelsen en lav opløselighed. Der er fremstillet stabile opløsninger indeholdende ca. 240 nmol/ml af
35 forbindelser med formel I ved pH-værdi ca. 5,5. Den øvre grænse afhænger af opløsningens bestanddele, dvs. isotonikum, konser-

veringsmiddel og zinkkoncentration og af valget af forbindelse med formel I. Der er ingen nedre grænse for opløsningernes pH-værdi, og den kemiske stabilitet af forbindelserne med formel I, hvor W er forskellig fra en asparaginrest, er høj, selv ved 5 pH 3. Det foretrukne pH-område for de injicerbare opløsninger ifølge denne opfindelse er fra ca. 2,5 til 8,5, mere foretrukket fra ca. 4,5 til 8. Specielt foretrukket er pH-området fra ca. 2,5 til 5,5, især fra ca. 3 til 4,5.

Det er et yderligere aspekt ved denne opfindelse, at 10 den muliggør forøget fleksibilitet for patienterne. Patienten kan med to vandige opløsninger, én indeholdende en forbindelse med formel I og den anden indeholdende et zinksalt, få en ønsket grad af retarderet virkning og en ønsket profil ved at blande de to opløsninger på passende måde. Under anvendelse af 15 to stamopløsninger har patienten følgende mulighed for at vælge én virkning og profil til morgeninjektionen og en anden virkning og profil til afteninjektionen. Zinkopløsningen ifølge opfindelsen indeholder fortrinsvis mellem ca. 2 µg og 20 mg zink pr. ml. Alternativt kan begge stamopløsninger indeholde zink, 20 enten i samme eller forskellige koncentrationer, og/eller begge stamopløsninger kan indeholde en forbindelse med formel I - enten den samme eller forskellige forbindelser.

De injicerbare opløsninger ifølge denne opfindelse har fortrinsvis en styrke på mellem ca. 60 og 6000 nmol/ml af 25 forbindelsen med formel I.

Når W ikke er en L-asparaginrest, kan den være glycin, serin, threonin, asparaginsyre, arginin eller histidin.

I en gruppe af foretrukne forbindelser med formel I er Y en lysinrest.

30 En anden foretrukken udførelsesform for denne opfindelse er præparater, der indeholder en forbindelse med formel I, hvori E^1 , E^2 , E^3 og/eller E^4 er en glutaminrest, og/eller X er Lys eller Arg, og W er Gly, Ser, Thr, His eller Asp, og inden for denne undergruppe af forbindelser med formel I er en

yderligere foretrukken udførelsesform præparater, der indeholder en forbindelse med formel I, hvori gruppen -Y-R er -Thr-NH₂ eller -Lys-NH₂.

Specifikke, foretrukne forbindelser med formel I er

5 hver af de følgende:

- Gly^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 Ser^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 His^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 Asp^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 10 Asp^{A21}, Arg^{B27}, Lys^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 Gly^{A21}, Gln^{B13}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 Ser^{A21}, Gln^{B13}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin og
 Thr^{A21}, Gln^{B13}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin.

En yderligere foretrukket udførelsesform for denne
 15 opfindelse er præparater indeholdende en forbindelse med formel I, i hvilken Y er Thr, R er hydroxy, og W er Gly, Ser, Thr, His eller Asp, og et eksempel på en sådan forbindelse er
 His^{A21}, Arg^{B27}-humaninsulin.

I en gruppe af foretrukne forbindelser med formel I
 20 er E² og E³ en glutaminrest.

I en anden gruppe af foretrukne forbindelser med formel I er X en arginin- eller lysinrest.

I en yderligere gruppe af foretrukne forbindelser med formel I er W Gly, Ser, Thr, His eller Asp.

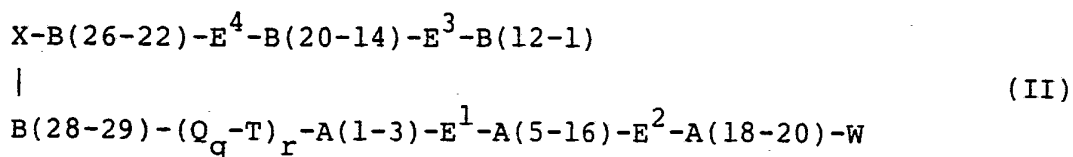
25 Som det er fagmanden bekendt, er ikke alle aminosyre-resterne i humaninsulin essentielle for insulinvirksomheden.

Svine- og okseinsulin, der m.h.t. aminosyrerester er forskellig fra humaninsulin, er da også blevet brugt til
 behandling af diabetikere. Der forekommer betydelige variatio-
 30 ner i insulinmolekylet fra art til art. Således kan mange aminosyrerester i humaninsulinmolekylet ændres, uden at der sker en utilladelig formindskelse af insulinaktiviteten, heriblandt nogle rester med indflydelse på molekylets isoelektriske punkt.

Det er indlysende, at grupperne betegnet E^1 , E^2 , E^3 , E^4 , R, W, X og Y skal vælges således, at den resulterende forbindelse med formel I er farmaceutisk acceptabel.

I de kendte, bifasiske insulinpræparater er det almindeligt at kombinere hurtigtvirkende, opløst insulin med krystallinsk insulin med retarderet virkning i samme injektion. Under anvendelse af forbindelser med formel I ifølge denne opfindelse kan der opnås en tilsvarende kombineret hurtig og retarderet virkning med en opløsning af en enkelt forbindelse med formel I. Forholdet mellem hurtig virkning og retarderet virkning aftager, når opløsningens zinkionkoncentration forøges.

Forbindelser med formel I kan fremstilles ved en transpeptidering, i hvilken en biosyntetisk precursorforbindelse, som har de korrekte insulindisulfidbroer, og som har den almene formel II:



hvor Q er en peptidkæde med q aminosyrer, q er et helt tal fra 0 til 33, T er Lys eller Arg, r er nul eller én, og A , B , E^1 , E^2 , E^3 , E^4 , W og X er hver som beskrevet i krav 1, omsættes med en aminoforbindelse med den almene formel III:



hvor Y og R hver er som angivet i krav 1, under anvendelse af trypsin eller et trypsinlignende enzym som katalysator i en blanding af vand og organiske opløsningsmidler analogt som beskrevet i USA-patentskrift nr. 4.343.898. En foretrukken forbindelse med formel III til brug ved denne metode er Thr-NH_2 . Blandt de trypsinlignende enzymer er lysylendopeptidase fra *Achromobacter lyticus* anvendelig.

Forbindelsen med formel II kan udtrykkes i en værts-
organisme såsom gær i lighed med beskrivelsen i europæisk
patentansøgning publikationsnr. 163.529 under anvendelse af et
gen med de korrekte codoner til de pågældende aminosyrer. Det
5 gen, der koder for det hidtil ukendte insulinderivat, indsættes
så i en egnet udtryksvektor, der, når den overføres til gær, er
i stand til at udtrykke den ønskede forbindelse. Det udtrykte
produkt isoleres derefter fra cellerne eller kulturvæsken, af-
hængigt af om det er udskilt fra cellerne eller ikke.

10 Ændringer i A4-, A17-, A21-, B13-, B21- eller B27-
stillingen kan hensigtsmæssigt foretages ved gensplejsning,
idet den ønskede C-terminale rest i B-kæden indføres ved try-
psinkatalyseret semisyntese.

Fordelen ved at indføre de yderligere, positive lad-
15 ninger inden for rammerne af insulinmolekylets 51 aminosyrer
for at lave de hidtil ukendte forbindelser med formel I i ste-
det for at forlænge B-kæden ud over pattedyrinsulins 30 rester
er, at fremstillingen bliver lettere. Ved den semisyntetiske
transpeptidering bruges der et stort molært overskud af amino-
20 syreamidet eller aminosyreesteren. Hvis der ved transpetide-
ringsreaktionen skulle bruges dipeptidamid eller -ester, ville
enten prisen eller opløseligheden eller begge dele forhindre
anvendelsen af et stort overskud, og udbyttet af produktet
bliver følgelig lavere.

25 Insulinpræparater ifølge denne opfindelse fremstilles
ved at opløse en forbindelse med formel I i et vandigt medium
under svagt sure betingelser, f.eks. i en koncentration på 240
eller 600 nmol/ml. Det vandige medium gøres isotonisk, f.eks.
med natriumchlorid, natriumacetat eller glycerol. Endvidere kan
30 det vandige medium indeholde zinkioner i en koncentration på
indtil ca. 30 $\mu\text{g Zn}^{++}$ pr. nmol af forbindelsen med formel I,
puffere såsom acetat, citrat og histidin og konserveringsmidler
såsom m-cresol, nipagen eller phenol. Det endelige insulinpræ-
parats pH-værdi afhænger af antallet af ladninger, der er æn-
35 dret i forbindelsen med formel I, koncentrationen af zinkioner,
koncentrationen af forbindelsen med formel I og af, hvilken

forbindelse med formel I der er valgt. pH-værdien indstilles til en værdi, der er egnet til administration som f.eks. ca. 2,5 - 4,5, hvorved udfældning undgås. Insulinpræparatet steriliseres ved sterilfiltrering.

- 5 Insulinpræparaterne ifølge denne opfindelse anvendes analogt med anvendelsen af de kendte insulinpræparater.

De heri anvendte forkortelser for aminosyrerne er de, som er angivet i J.Biol.Chem. 243 (1968), 3558. Aminosyrerne, der er beskrevet i denne beskrivelse, er i L-konfiguration. I
10 formel I og andre steder heri er A(1-3) Gly-Ile-Val, A(5-6) er Gln-Cys osv., jfr. aminosyresekvensen for humaninsulin. Med mindre andet er angivet, er insulinarten i denne beskrivelse humaninsulin.

Syntese af insulinforbindelser

- 15 Insulinudgangsmaterialet var en insulinprecursor, som var udtrykt i gær som beskrevet i europæisk patentansøgning publikationsnr. 163.529.

Insulinprecursorerne blev udvundet fra fermentationsvæskerne ved adsorption til LiChroprep^{VM} RP-18 som beskrevet i
20 eksempel 7 i den samme europæiske patentansøgning. Precursorerne elueredes fra søjlen med 0,2 M KCl, 0,001 M HCl i 33% (rumfang/rumfang) ethanol. Insulinprecursorerne blev krystalliseret fra den opsamlede fraktion ved successivt at tilsætte vand (1 rumfang pr. rumfang af det opsamlede), fast trinatriumcitrat
25 til opnåelse af en molaritet på 0,05 M og til sidst zinkacetat til opnåelse af en molaritet på 0,006 M. pH-værdien blev justeret til 6,8, og blandingen henstod natten over ved 4°C. Krystallerne blev isoleret ved centrifugering, vasket med vand og tørret i vakuum.

- 30 Beskyttede aminosyrer og beskyttede peptider til enzymatisk semisyntese var enten fremstillet ved standardmetoder eller indkøbt (almindelige synteser) fra enten Nova Biochem eller Bachem, begge Schweiz.

Bogstaverne VM efter et navn angiver, at det er et varemærke.

I udgangsmaterialet i eksemplerne 1 til og med 14 blev $(Q_g-T)_r$ fra formel II valgt til Ala-Ala-Lys og fremstillet som beskrevet for gærplasmid pMT610 i eksempel 10 i europæisk patentansøgning publikationsnr. 163.529. Nucleotider, der koder for Gln^{B13}, Gln^{A17}, Arg^{B27}, Lys^{B27}, Asp^{A21}, Gly^{A21}, His^{A21}, Ser^{A21} og Thr^{A21} blev udskiftet i pMT610 ved site specifik mutagenese under anvendelse af fremgangsmåden i Nucl.Acids.Res. 10 11 (1983), 5103 - 5112.

Eksempel 1

Syntese af Gln^{B13}, Arg^{B27}-humaninsulin

Der sættes 25 ml 25,5% (rumfang/rumfang) vand i DMF (25,5 ml vand, DMF op til 100 ml) til en suspension af 5 g
15 Gln^{B13}, Arg^{B27}, B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21)-insulinprecursor i 50 ml 2 M Thr-OBu^t, CH₃ COOH (L-threonin-tert.butylester-hydroacetatsalt). Suspensionen nedkøles til 12°C under omrøring. Der tilsættes en opløsning af 0,5 g svinetrypsin i 12,5 ml af en 0,05 M vandig opløsning af calciumacetat. Omrøringen fortsættes
20 indtil opløsning. Efter 48 timer ved 12°C udfældes proteinerne ved, at blandingen hældes i 600 ml acetone. Bundfaldet isoleres ved centrifugering, vaskes en gang med 200 ml acetone, isoleres ved centrifugering og tørres i en nitrogenstrøm. Bundfaldet opløses i 100 ml 0,04 N saltsyre, pH-værdien indstilles til 2,5,
25 og opløsningen sættes på en 5 x 30 cm's præparativ højtrykssvæske-kromatografisøjle (i det følgende benævnt HPLC), som er pakket med silikapartikler, der er udskiftet med octadecyldimethylsilyl (gennemsnitlig partikelstørrelse 15 micron, porestørrelse 100 Ångstrøm). Søjlen ækvilibreres med ethanol/0,3 M
30 vandig opløsning af kaliumchlorid, 0,001 N saltsyre i forholdet 35,5/64,5 (rumfangsdele). Proteinerne elueres fra søjlen med den samme puffer med en hastighed på 2 liter/t.

Gln^{B13},Arg^{B27},Thr^{B30}-OBU^t-humaninsulin findes i en top, der kommer ud fra kolonnen mellem 55 og 100 minutter.

Gln^{B13},Arg^{B27},Thr^{B30}-OBU^t-humaninsulin isoleres fra det opsamlende materiale ved successive tilsætninger af vand til en
5 ethanolkoncentration på 15% (rumfang/rumfang), fast trinitiumcitrat til opnåelse af en molaritet på 0,05 M med hensyn til citrat og fast zinkchlorid til opnåelse af en molaritet på 0,006 M med hensyn til zink. pH-værdien indstilles til 6,8, og efter 1 time ved stuetemperatur fortsættes krystalliseringen
10 ved 4°C i 24 timer under omrøring. Krystallerne centrifugeres, vaskes to gange med 20 ml iskoldt vand, centrifugeres og tørres in vacuo. Udbytte: 2,51 g Gln^{B13},Arg^{B27},Thr^{B30}-OBU^t-humaninsulin.

Gln^{B13},Arg^{B27},Thr^{B30}-OBU^t-humaninsulin opløses i 100
15 ml trifluoreddikesyre og henstår i to timer ved stuetemperatur. Trifluoreddikesyren fjernes ved frysetørring. Det frysetørrede produkt opløses i 100 ml vand, pH-værdien indstilles til 2,5, og 20 g natriumchlorid tilsættes. Saltkagen bestående af Gln^{B13},Arg^{B27}-humaninsulin isoleres ved centrifugering. Salt-
20 kagen opløses i 850 ml vand, og Gln^{B13},Arg^{B27}-humaninsulin krystalliseres ved successiv tilsætning af 150 ml ethanol, 14,7 g trinitiumcitrat-dihydrat og 0,82 g zinkchlorid efterfulgt af indstilling af pH-værdien til 6,8. Efter 1 time ved stuetemperatur fortsættes krystalliseringen ved 4°C i 24 timer under let
25 omrøring. Krystallerne centrifugeres, vaskes to gange med 20 ml iskoldt vand, centrifugeres og tørres in vacuo. Udbytte: 1,71 g Gln^{B13},Arg^{B27}-humaninsulin svarende til 36%.

Aminosyresammensætningen er i overensstemmelse med teorien, to argininrester pr. molekyle. Produktet er rent ved
30 DISC PAGE-electrophorese, vandringshastigheden er 55% af humaninsulins vandringshastighed svarende til en forskel i ladninger på ca. 2. Detaljer for DISC PAGE-elektrophorese fremgår af Horm.Metab.Res.Supplement Series No. 5 (1974), 134. Zinkindholdet i krystallerne er 0,42% (vægt/vægt).

Eksempel 2 - 6

Syntese af Gln^{A17},Gln^{B13}-humaninsulin, Gln^{A17},Arg^{B27}-humaninsulin, Arg^{B27}-humaninsulin, Lys^{B27}-humaninsulin og His^{A21},Arg^{B27}-humaninsulin

- 5 De 5 i overskriften nævnte forbindelser syntetiseres ud fra de tilsvarende, enkeltkædede insulinprecursorer, nemlig Gln^{A17},Gln^{B13},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21), Gln^{A17},Arg^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21), Arg^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21), 10 Lys^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) og His^{A21},Arg^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) under anvendelse af de i eksempel 1 beskrevne metoder. Udbytter, ladninger i forhold til humaninsulin, bevægelseshastighed i forhold til insulin ved DISC PAGE-elektroforese ved pH 8,9 og afvigelser i 15 aminosyresammensætningen fra humaninsulin fremgår af tabel I.

Eksempel 7 - 13

- Syntese af Asp^{A21},Arg^{B27},Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin, Gly^{A21},Arg^{B27},Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin, His^{A21},Arg^{B27},Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin, 20 Gly^{A21},Gln^{B13},Arg^{B27},Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin, Ser^{A21},Gln^{B13},Arg^{B27},Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin, Thr^{A21},Gln^{B13},Arg^{B27},Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin og Ser^{A21},Arg^{B27},Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin
-

- De 7 i overskriften nævnte forbindelser syntetiseres 25 ud fra de tilsvarende enkeltkædede insulinprecursorer, nemlig Asp^{A21},Arg^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21), Gly^{A21},Arg^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21), His^{A21},Arg^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21), Gly^{A21},Gln^{B13},Arg^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21), 30 Ser^{A21},Gln^{B13},Arg^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21),

Thr^{A21},Gln^{B13},Arg^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) og
 Ser^{A21},Arg^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) ved tryptisk trans-
 peptidering i organisk vandig opløsning i nærværelse af Thr-NH₂
 som beskrevet i europæisk patentansøgning publikationsnr.

- 5 194.864, eksemplerne 4 og 6. Udbytter, ladninger i forhold til
 humaninsulin, bevægelseshastigheder i forhold til insulin ved
 DISC PAGE-elektroforese ved pH 8,9 og afvigelser fra humaninsu-
 lin med hensyn til aminosyresammensætningen fremgår af tabel I.

Eksempel 14

10 Syntese af Asp^{A21},Arg^{B27},Lys^{B30}-NH₂-humaninsulin

- Den i overskriften nævnte forbindelse syntetiseres ud
 fra den tilsvarende enkeltkædede insulinprecursor, nemlig
 Asp^{A21},Arg^{B27},B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21), ved tryptisk trans-
 peptidering i organisk vandig opløsning i nærværelse af
 15 Lys(Boc)-NH₂, rensning af mellemproduktet, Lys(Boc)^{B30}-NH₂-
 humaninsulin, efterfulgt af fjernelse af Boc-beskyttelsesgrup-
 pen ved hjælp af TFA som beskrevet i europæisk patentansøgning
 publikationsnr. 194.864, eksemplerne 5 og 7. Udbytte og analy-
 sedata er vist i tabel I.

Tabel I

Substitution i humaninsu- lin	Udbytte, %	Ladning i forhold til human- insulin ved pH 7	Bevægelses- hastighed ved pH 8,9, % i forhold til humanin- sulin	Afvigelser i aminosyre- sammensætningen fra human- insulin efter sur hydrolyse, rester/molekyle
Gln ^{A17} , Gln ^{B13}	46	+2	55	ingen
Gln ^{A17} , Arg ^{B27}	32	+2	55	+1 Arg, -1 Thr
Arg ^{B27}	35	+1	75	+1 Arg, -1 Thr
Lys ^{B27}	39	+1	75	+1 Lys, -1 Thr
His ^{A21} , Arg ^{B27}	16	+1,1	75	+1 His, +1 Arg, -1 Asp, -1 Thr
Asp ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂	23	+1	75	+1 Arg, -1 Thr
Gly ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂	32	+2	55	+1 Gly, +1 Arg, -1 Asp, -1 Thr
His ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂	20	+2,1	55	+1 His, +1 Arg, -1 Asp, -1 Thr
Gly ^{A21} , Gln ^{B13} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂	23	+3	35	+1 Gly, +1 Arg, -1 Asp, -1 Thr
Ser ^{A21} , Gln ^{B13} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂	21	+3	35	+1 Ser, +1 Arg, -1 Asp, -1 Thr
Thr ^{A21} , Gln ^{B13} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂	29	+3	35	+1 Arg, -1 Asp
Ser ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂		+2	55	+1 Ser, +1 Arg, -1 Asp, -1 Thr
Asp ^{A21} , Arg ^{B27} , Lys ^{B30} -NH ₂	13	+2	55	+1 Arg, +1 Lys, -2 Thr

Eksempel 15Fremstilling af injicerbare opløsninger af forbindelser med formel I

Med henblik på analyse af graden af retarderet virkning fremstilles sterile, injicerbare opløsninger af forbindelserne med formel I under anvendelse af 1,6% (vægt/rumfang) glycerol som isotonium med 0,3% (vægt/rumfang) m-cresol som konserveringsmiddel og pufret med 0,01 M natriumacetat. Koncentrationen af zinkioner er 8 eller 80 µg/ml. Opløsningernes pH-værdi indstilles tilstrækkeligt langt fra det isoelektriske punkt af forbindelserne med formel I til at holde opløsningerne klare ved opbevaring ved 4°C. Opløsningerne indeholder 240 nmol/ml af forbindelserne med formel I. Koncentrationen på 240 nmol/ml etableres ved måling af absorptionen ved 276 nm af en mere koncentreret stamopløsning fri for m-cresol under anvendelse af den molære ekstinktionskoefficient for svineinsulin på 6100 for disse derivater (se Handbuch der Inneren Medizin, bd. 7/del 2A, redaktør: Oberdisse, 1975, 113). For monokomponent svineinsulin er den anerkendte styrke 28,5 U/mg tørstof (se Diabetes Care, bind 6/supplement 1 (1983), 4), dvs. 1 U svarer til 5,95 nmol.

Der fremstilles injicerbare opløsninger indeholdende 240 nmol/ml af forbindelserne med formel I som vist i tabel II og med pH-værdier og zinkindhold som vist deri.

25 Test af retardering af insulinvirkning

Retarderingen af den hypoglycæmiske virkning, der opnås med de injicerbare insulinopløsninger afprøves ifølge British Pharmacopoeia 1980, A 142, på fastende kaniner. Hver prøveopløsning indgives subkutan i en dosis på 14,3 nmol til hver kanin i en gruppe på 12 dyr med en vægt på 3 - 4 kg, og forløbet af hypoglycæmien følges i 6 timer. Til sammenligning

inkluderes det hurtigtvirkende præparat, Actrapid^{VM} svineinsulin, og det middelhurtigtvirkende, Monotard^{VM} humaninsulin, i forsøgene. Forsøgsresultaterne fremgår af tabel II.

Tabel II

5 Forbindelse med formel I	Zn ⁺⁺ , µg/ml	pH	% glucose af det oprindelige			
			1 time	2 timer	4 timer	6 timer
Gln ^{A17} ,Arg ^{B27} -humaninsulin	80	4,5	53	47	50	66
Gln ^{B13} ,Arg ^{B27} -humaninsulin	80	4,5	55	46	61	91
Gln ^{A17} ,Gln ^{B13} -humaninsulin	80	4,5	53	47	55	82
10 Arg ^{B27} -humaninsulin	80	4,5	45	34	51	91
Lys ^{B27} -humaninsulin	80	4,5	47	40	55	93
Asp ^{A21} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} -NH ₂ - humaninsulin	80	4	60	54	58	60
Asp ^{A21} ,Arg ^{B27} ,Lys ^{B30} -NH ₂ - humaninsulin	80	4	72	67	61	59
15 Gly ^{A21} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} -NH ₂ - humaninsulin	8	4	59	62	71	74
Gly ^{A21} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} -NH ₂ - humaninsulin	80	4	72	73	74	74
20 His ^{A21} ,Arg ^{B27} -humaninsulin	80	4	65	53	66	88
His ^{A21} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} -NH ₂ - humaninsulin	80	4	61	52	52	72
Gly ^{A21} ,Gln ^{B13} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} - NH ₂ -humaninsulin	80	4	82	86	85	90
25 Ser ^{A21} ,Gln ^{B13} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} - NH ₂ -humaninsulin	80	4	90	91	88	92
Thr ^{A21} ,Gln ^{B13} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} - NH ₂ -humaninsulin	80	4	90	90	88	93
Ser ^{A21} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} -NH ₂ - humaninsulin	80	4	60	62	64	68
30 Actrapid ^{VM} svineinsulin	15	7	46	44	74	91
Monotard ^{VM} humaninsulin	80	7	54	43	50	74

Styrken af insulinforbindelserne bestemmes ved muse-blodsukkerdepletionsprøven (British Pharmacopoeia 1980, A 141 - A 142). For at minimere problemet med at bedømme styrken af insulinerne med en timing, der er forskellig fra standarden, 5 fremstilles insulinopløsninger til styrkebestemmelser uden til-sætning af zink. Opløsninger fremstilles, så de indeholder 240 nmol/ml baseret på absorptionen ved 276 nm. Zinkindholdet i opløsningerne er 8 - 10 µg/ml hidrørende fra de krystallinske derivater. Den estimerede styrke af nogle insulinforbindelser 10 er vist i tabel III.

Tabel III

		Styrke i forhold til insulin, %	Konfidens- grænser (P = 0,05), %
5	Gln ^{A17} ,Arg ^{B27} -humaninsulin	69	79 - 62
	Gln ^{B13} ,Arg ^{B27} -humaninsulin	78	88 - 69
	Gln ^{A17} ,Gln ^{B13} -humaninsulin	50	63 - 40
	Arg ^{B27} -humaninsulin	87	95 - 80
	Lys ^{B27} -humaninsulin	88	97 - 80
10	Asp ^{A21} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} -NH ₂ - humaninsulin	83	92 - 74
	Asp ^{A21} ,Arg ^{B27} ,Lys ^{B30} -NH ₂ - humaninsulin	69	77 - 62
	Gly ^{A21} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} -NH ₂ - humaninsulin	75	83 - 68
15	His ^{A21} ,Arg ^{B27} -humaninsulin	71	79 - 63
	His ^{A21} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} -NH ₂ - humaninsulin	72	81 - 64
	Gly ^{A21} ,Gln ^{B13} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} - NH ₂ -humaninsulin	49	54 - 44
20	Ser ^{A21} ,Gln ^{B13} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} - NH ₂ -humaninsulin	47	54 - 40
	Thr ^{A21} ,Gln ^{B13} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} - NH ₂ -humaninsulin	28	32 - 24
25	Ser ^{A21} ,Arg ^{B27} ,Thr ^{B30} -NH ₂ - humaninsulin	76	83 - 68

Eksempel 16

Den markante forbedring af den uønskede dannelse af monodesamidprodukter, som opnås ved udskiftning af Asn^{A21} med andre aminosyrer, fremgår af nedenstående tabel IV. Den opnåede

forbedring ved en pH-værdi på 3 - 5 er en faktor 10 - 100 gange og er højest ved pH 3. I tabellen angives den hastighed med hvilken monodesamidoprodukter dannes som procent pr. uge for forskellige insuliner ved opbevaring som opløste, sterile præparater.

Tabel IV

Dannelse af monodesamidoprodukter, % pr. uge

Temperatur, °C		45		37		25	
pH-værdi		3,0	5,0	3,0	5,0	3,0	5,0
10	Humaninsulin	45	2*	90	2*	-	-
	Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -						
	humaninsulin	40	7	-	10	10	2
	Asp ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -						
	humaninsulin	-	-	1,5	1	-	-
15	Gly ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -						
	humaninsulin	1	1	1	2	0,2	0,2
	His ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -						
	humaninsulin	2	-	0,5	-	0,2	0,2

*delvis udfældet

20 Den markante forbedring af den uønskede dannelse af di- og polymerisationsprodukter, som opnås ved udskiftning af Asn^{A21} med andre aminosyrer, fremgår af nedenstående tabel V.

Tabel VDannelse af di- og polymerisationsprodukter, % pr. uge

Temperatur, °C	45		37		25	
	3,0	5,0	3,0	5,0	3,0	5,0
5 Humaninsulin	2,4	7,9*	2,2	8*	-	-
Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -						
humaninsulin	1,6	5,1	-	-	0,15	1,3
Asp ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -						
humaninsulin	-	-	0,1	0,3	-	-
10 Gly ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -						
humaninsulin	0,1	0,4	0,06	0,27	0,03	0,17
His ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -						
humaninsulin	0,1	-	-	-	0,02	0,06

*delvis udfældet

- 15 Den høje stabilitet, som opnås ved udskiftning af Asn^{A21} med andre aminosyrer, kan muliggøre opbevaring af opløste insulinpræparater ved stuetemperatur, hvorimod de hidtil anvendte insulinpræparater skal opbevares køligt.

Eksempel 17

- 20 Den fremragende protraherede virkning af forbindelserne ifølge denne opfindelse illustreres yderligere i nedenstående tabel VI, hvor indexet for protraheret virkning er beregnet som angivet i Protein Engineering 1 (1987), side 211, øverst, venstre spalte. I tabel VI er de 3 første forbindelser
- 25 omfattet af patentkrav i tidligere offentliggjorte patentansøgninger.

Tabel VI

Forbindelse	Index for protraheret virkning, 3 Zn ⁺⁺ /hexamer
Lys ^{B31} -NH ₂ -humaninsulin	-7
5 Arg ^{B31} -Arg ^{B32} -svineinsulin	4
Lys ^{B31} -Arg ^{B32} -humaninsulin	-9
Gly ^{A21} , Arg ^{A27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -humaninsulin	41
Gly ^{A21} , Gln ^{B13} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -humaninsulin	37
Ser ^{A21} , Gln ^{B13} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -humaninsulin	38
10 Thr ^{A21} , Gln ^{B13} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -humaninsulin	29
Ser ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B13} -NH ₂ -humaninsulin	44
Arg ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -humaninsulin	14

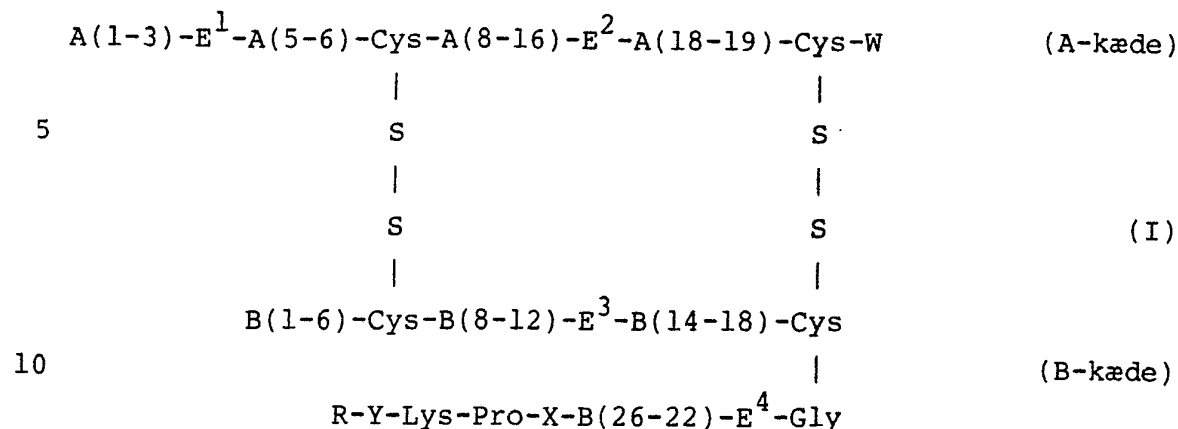
I nedenstående tabel VII er angivet index for protraheret virkning for nogle yderligere forbindelser ifølge denne opfindelse ved højere tilsætning af zink.

Tabel VII

Forbindelse	Index for protraheret virkning, 3 Zn ⁺⁺ hexamer
Asp ^{A21} , Arg ^{B27} , Thr ^{B30} -NH ₂ -humaninsulin	56
20 Asp ^{A21} , Arg ^{B27} , Lys ^{B30} -NH ₂ -humaninsulin	70
His ^{A21} , Arg ^{B27} -humaninsulin	25

PATENTKRAV

1. Insulinderivater med den almene formel I



hvori bogstaverne A og B efterfulgt af tal i parentes betegner de ved tallene i parentes angivne peptidfragmenter i henholdsvis A- og B-kæderne i humaninsulin, E^1 , E^2 , E^3 og E^4 er
 15 ens eller forskellige og hver betegner en rest af glutaminsyre eller glutamin, X betegner en L-threonin-, L-arginin- eller L-lysinrest, W betegner en rest af arginin, histidin, glycin, asparaginsyre, asparagin, serin eller threonin, Y betegner en rest af threonin eller lysin, og R betegner hydroxy eller
 20 $-NH_2$, med det forbehold, at hvis W er en asparaginrest, er R hydroxy, og hvis W er en asparaginrest, X og -Y-R er en threoninrest, og E^3 er en glutaminrest, er ikke både E^1 , E^2 og E^4 glutaminsyrerester, og yderligere med det forbehold, at mindst en af de seks aminosyrerester E^1 , E^2 , E^3 , E^4 , W og X er for-
 25 skellig fra de aminosyrerester, der er til stede i de tilsvarende stillinger i humaninsulin, og at mindst en af de syv aminosyrerester E^1 , E^2 , E^3 , E^4 , W, X og Y og gruppen R vælges således, at forbindelsen med formlen I har mindst en ladning mere end humaninsulin ved en pH-værdi på 7.

30 2. Forbindelse ifølge krav 1, kendetegnet ved, at X er en lysin- eller argininrest.

3. Forbindelser ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, **kendetegnet** ved, at E² og E³ hver er en glutaminrest.

4. Forbindelser ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, **kendetegnet** ved, at Y er lysin.

5. Forbindelser ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, **kendetegnet** ved, at R er -NH₂.

6. Forbindelser ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, **kendetegnet** ved, at W er en asparginsyre-, histidin-, glycin-, serin- eller threoninrest.

7. Forbindelse ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at den er

Gly^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 Ser^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 15 His^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 Asp^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 Asp^{A21}, Arg^{B27}, Lys^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 Gly^{A21}, Gln^{B13}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 Ser^{A21}, Gln^{B13}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin,
 20 Thr^{A21}, Gln^{B13}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂-humaninsulin eller
 His^{A21}, Arg^{B27}-humaninsulin.

8. Injicerbare opløsninger med retarderet insulin-virkning, **kendetegnet** ved, at de indeholder et insulinderivat med den i krav 1 angivne almene formel I.

9. Injicerbare opløsninger ifølge krav 8, **kendetegnet** ved, at de indeholder en forbindelse med formel I ifølge et hvilket som helst af kravene 2 - 7.

10. Præparat ifølge krav 8 eller 9, **kendetegnet** ved, at det indeholder zinkioner, fortrinsvis fra ca. 2 µg til ca. 2 mg zink pr. ml, mest foretrukket fra ca. 5 µg til 200 µg zink pr. ml.