



(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **149322 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **0444/78**

(51) Int.Cl.⁴: **A 61 K 37/26**

(22) Indleveringsdag: **31 jan 1978**

(41) Alm. tilgængelig: **02 aug 1978**

(44) Fremlagt: **05 maj 1986**

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: **01 feb 1977 GB 4121/77** **16 jan 1978 GB 4121/77**

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

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

(74) Fuldmægtig: –

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af et stabilt, injicerbart, tofasisk, zinkholdigt insulinpræparat**

LN 149322 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et stabilt, injicerbart, tofasisk, zinkholdigt insulinpræparat med en pH-værdi i området fra 6 til 8.

Betydningen af virkningsforløbet af den enkelte
5 insulin-injektion i afhængighed af tiden er velkendt inden for diabetologien. I almindelighed anses det for fordelagtigt, under hensyntagen til diabetespatientens relative velbefindende, at de daglige injektioners antal kan holdes på et rimeligt lavt niveau. Som følge heraf har der i de senere år været rettet bestræbelser
10 mod udviklingen af insulinpræparater, der dækker et spektrum af betydelig bredde med hensyn til virkningstidens varighed. I mange tilfælde af diabetes vil det ønskede insulinpræparat være et præparat med en hurtigt indsettende begyndelseseffekt kombineret med en protraheret aktivitet.

15 Injicerbare insulinpræparater med sådanne egenskaber er kendte. I denne henseende henvises til britisk patentskrift nr. 860.515, som beskriver farmaceutisk stabile insulinpræparater bestående af en suspension af zinkholdige okseinsulinkrystaller i en opløsning med pH beliggende i det fysiologiske område 6 - 8 og
20 indeholdende opløst svineinsulin, idet de suspenderede insulin-krystaller og det opløste insulin udgør henholdsvis den langsomt og hurtigt virkende insulinkomponent. Som betingelse for at svineinsulinet kan forblive i opløsning, især under lagringsbetingelser, må suspensionen ved pH 7 udvise et sådant zinkindhold,
25 at de suspenderede okseinsulinkrystaller indeholder mindre end 0,25 milliækvivalenter zinkion/g, beregnet på de tørrede krystaller. Under disse betingelser er det ikke muligt at erstatte de suspenderede okseinsulinkrystaller med svineinsulinkrystaller, fordi sidstnævnte ikke vil forblive uopløste. Under de samme
30 betingelser er det heller ikke muligt at substituere det opløste svineinsulin med opløst okseinsulin, fordi sidstnævnte ikke vil forblive i opløsning.

Fra DE-offentliggørelsesskrift nr. 2.418.218 og 2.459.517 kendes desuden stabile, tofasiske insulinpræparater
35 bestående af krystallinsk insulin og opløst des-phenylalanin-B1-insulin fra samme dyreart som det krystallinske insulin. Den i disse fremlæggelsesskrifter beskrevne teknik indebærer, at der fjernes en hel aminosyre, nemlig Phe fra B1-positionen, hvorved

der for det første sker en ændring af aminosyresammensætningen i forhold til det krystallinske, intakte insulin, og for det andet sker en ikke ubetydelig formindskelse i molekylvægten. Fjernelsen af phenylalanin, der er en af de mest hydrofobe aminosyrerester i 5 insulin, vil have en væsentlig indflydelse på hydrofobiciteten af den opløselige komponent, og dette er sandsynligvis forklaringen på, at der opnås et stabilt præparat, idet forskellen i hydrofobicitet mellem krystallinsk insulin og des-phenylalanin-B1-insulin er omtrent den samme som forskellen mellem hydrofobiciteten af intakt okseinsulin og svineinsulin i de bifasiske insulinpræparater beskrevet i disse fremlæggelsesskrifter. 10

Den foreliggende opfindelse bygger på den erkendelse, at man overraskende opnår et stabilt præparat, når man som den opløselige komponent anvender monodesamidoinsulin. Den ifølge den 15 foreliggende opfindelse anvendte, af insulin afledte forbindelse har derfor praktisk taget samme aminosyresammensætning og omtrent samme molekylvægt som intakt insulin, idet ændringen af en CONH_2 -gruppe til en COOH -gruppe kun betyder en ændring af molekylvægten på 0,01%.

20 Det er yderst overraskende, at en så ubetydelig modifisering af intakt insulin kan bevirke, at den fremkomne afledte forbindelse nu er stabil i vandige opløsninger og følgelig kan anvendes til fremstilling af stabile bifasiske insulinpræparater.

Den foreliggende opfindelse angår således en fremgangs- 25 måde til fremstilling af et stabilt, injicerbart, tofasisk, zinkholdigt insulinpræparat med en pH-værdi i området fra 6 til 8, ved hvilken man blander krystallinsk insulin, en af insulin afledt, vandopløselig forbindelse og vand samt om nødvendigt indstiller blandingens pH-værdi til en værdi i det angivne 30 område, hvorhos det krystallinske insulin og den vandopløselige insulinforbindelse begge hidrører fra samme dyreart, og fremgangsmåden er ejendommelig ved, at man som den af insulin afledte, vandopløselige forbindelse anvender et monodesamidoinsulin.

Monodesamidoinulin er her defineret som en kemisk forbindelse, som afledes af insulin ved omdannelsen af en enkelt carboxamidogruppe i én af insulinmolekylets sidekæder (d.v.s. en asparagin- eller glutaminrest) til den tilsvarende carboxyl-
5 eller carboxylatgruppe.

Det er kendt, at deamideringen af insulin (resulterende i dannelsen af desamidoinulin) finder sted under hydrolytiske betingelser, især i sur opløsning. Den omstændighed, at ekstraktion af insulin fra pancreaskirtler sædvanligvis udføres under
10 sure betingelser, medfører normalt, at desamidoinulin, og især monodesamidoinulin, forekommer som urenheder, ikke blot i råinsulin, men også i insulin, der er rensat ved krystallisation.

Da såvel svine- som okseinsulinmolekylet indeholder i alt 6 carboxamidogrunder, kunne man forvente, at en sammensat
15 blanding af desamidoinulin ville opstå ved hydrolyse. Imidlertid hydrolyserer A-kædens carboxyl-terminale asparagincarboxamidogruppe betydeligt hurtigere end de øvrige amidogrunder, hvilket medfører, at desamidoinulinfraktionen hovedsageligt består af monodesamido-A²¹-insulin.

20 Ifølge en foretrukket udførelsesform for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er monodesamidoinulinet derfor monodesamido-A²¹-insulin.

I henhold til en yderligere foretrukket udførelsesform for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse hidrører
25 både det krystallinske insulin og monodesamidoinulinet fra okse. Det har således vist sig, at okse-monodesamidoinulin udviser en sådan grad af opløselighed, at det kan erstatte svineinsulinet i de kendte, ovenfor omtalte, tofasiske insulinpræparater. Selv i betragtning af, at deamidering af insulin medfører en sænkning af
30 det isoelektriske punkt, er det overraskende, at den forøgede opløselighed er tilstrækkelig til at tillade eksistensen af en opløsning, der er stabil i pH-området 6 - 8. Det er ligeledes overraskende, at den tofasiske præparation har en stabilitet, der gør den brugbar i klinisk praksis.

35 I denne henseende repræsenterer fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse et vigtigt teknisk fremskridt. Det er velkendt, at mængden af oksepancreaskirtler, som står til rådighed for insulinproduktionen, langt overgår den tilsvarende fra

svin. Udøvelsen af den foreliggende opfindelse vil derfor gøre det lettere at tilfredsstille den stigende efterspørgsel efter tofasiske insulinpræparater af den oven for anførte type.

I henhold til endnu en særlig udførelsesform for frem-
5 gangsmåde ifølge den foreliggende opfindelse hidrører både det krystallinske insulin og monodesamidinsulinet fra svin.

Det har således vist sig, at svine-monodesamidinsulin i modsætning til selve svineinsulinet forbliver i opløsning i nærværelse af en betydelig højere zinkionkoncentration. Denne
10 overraskende egenskab muliggør fremstillingen af et stabilt, injicerbart, tofasisk insulinpræparat, i hvilket svineinsulin-krystallerne forbliver i suspenderet tilstand som følge af den øgede zinkionkoncentration. Det kunne ikke forventes, at et sådant præparat ville være tilstrækkelig stabilt til anvendelse i
15 klinisk praksis.

Tilsammen åbner de oven for anførte særlige udførelsesformer for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse nye muligheder for fremstillingen af injicerbare, tofasiske insulinpræparater, i hvilke insuliner hidrører fra samme dyreart. Det
20 har været påstået, at det i de kendte insulinpræparater anvendte insulin fra svin og okse forårsager dannelsen af indbyrdes forskellige insulinantistoffer. Insulinpræparater fremstillet på basis af insulin fra samme dyreart ville derfor i immunologisk henseende være fordelagtige ved at gøre det muligt at skifte fra
25 et insulinpræparat hidrørende fra én dyreart til et tilsvarende præparat fra en anden dyreart. Ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse gøres det muligt at fremstille injicerbare, tofasiske insulinpræparater, i hvilke såvel det opløste som det suspenderede insulin hidrører fra en enkelt dyreart,
30 fortrinsvis okse eller svin.

Det er kendt, at det i handelen værende krystallinske insulin indeholder urenheder og at det er muligt at fjerne disse urenheder i en sådan grad, at det rensede insulin udviser en enkelt top ved analytisk gelfiltrering (se f.eks. Diabetes, vol.
35 21 (1972) pp. 657 - 60). I det følgende vil insulin, der udviser en sådan renhedsgrad, blive benævnt "højrenset insulin". På samme måde vil insulin, som ved analytisk diskontinuerlig polyacrylamidgelelektroforese (DISC PAGE) yderligere opfylder kravet om i

alt væsentligt kun at udvise en enkelt komponent, blive benævnt "monokomponentinsulin" (se f.eks. britisk patent nr. 1.285.023). Insulinpræparater, i hvilke det suspenderede, krystallinske insulin består af henholdsvis højrenset insulin og monokomponent-
5 insulin, udgør foretrukne udførelsesformer for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse.

Monodesamidoinsulin er, som omtalt ovenfor, konstateret som en urenhed både i råinsulin og krystalliseret insulin, f.eks. ved hjælp af analytisk ionbytterkromatografi (se f.eks.
10 J.Biol.Chemistry, vol. 235 (1960), pp. 2294 - 2299; Diabetes, vol. 21 (1972), p. 463). Ligeledes har det været muligt at påvise monodesamidoinsulin, specielt monodesamido-A²¹-insulin, som en bestanddel af partielt hydrolyseret insulin, fremstillet under omhyggeligt kontrollerede betingelser med hensyn til syrestyrke,
15 temperatur, hydrolysens varighed o.s.v. (se f.eks. J.Biol.Chemistry, vol 237 (1962), pp. 3406 - 3411). Ingen af de pågældende referencer beskriver imidlertid isoleringen af monodesamidoinsulin som stof.

Med henblik på at fremstille monodesamidoinsulin i
20 mængder, der tilfredsstiller den foreliggende opfindelses formål, blev råinsulin eller handelsinsulin hydrolyseret delvis, fortrinsvis under nøje kontrollerede sure betingelser, og derefter underkastet fraktionering ved hjælp af ionbytterchromatografi, fortrinsvis på en anionbytter, hvorved eluerede fraktio-
25 ner svarende til den centrale del af monodesamidoinsulintoppen blev opsamlet. Monodesamidoinsulinet kan udvindes af de således opsamlede fraktioner ved fældning f.eks. som et tungtopløseligt zinkkompleks fra en opløsning med pH omkring 7, genopløsning af det således fældede monodesamidoinsulin efterfulgt af afsaltning,
30 f.eks. ved gelfiltrering, og genvinding af monodesamidoinsulinet fra den afsaltede opløsning. Med monokomponentinsulin som udgangsmateriale fremstilledes i alt væsentligt rent monodesamido-A²¹-insulin på analog måde.

Det er også muligt at genvinde monodesamidoinsulin i
35 forbindelse med fremstillingen af monokomponentinsulin, således som det er beskrevet i britisk patentskrift nr. 1.285.024. I dette tilfælde opsamles fraktioner svarende til monodesamidoinsulintoppen, hvorefter det deri indeholdte monodesamidoinsulin

genvindes. Det i henhold til den foreliggende opfindelse foretrukne monodesamidinsulin udviser en renhedsgrad, der er karakteriseret ved, at stoffet ved gelfiltrering og DISC PAGE udviser henholdsvis en enkelt top og et enkelt bånd.

- 5 Den relative mængde af monodesamidinsulin i det tofasiske præparat afpasses efter den hastighed, hvormed insulinets virkning ønskes indsat. Fortrinsvis svarer mængden af monodesamidinsulin til fra 10 - 75%, fortrinsvis fra 20 - 50% af præparatets totale insulinaktivitet, udtrykt i internationale
- 10 insulinenheder (i.u.). Monodesamidinsulinopløsningens pH-værdi vælges i området fra 6 - 8, fortrinsvis fra 6,5 - 7,5. Opløseligheden af såvel insulin som monodesamidinsulin, og dermed det tofasiske insulinpræparats fysiske stabilitet, afhænger af koncentrationen af frie zinkioner i præparatets væskefase.
- 15 Tilsætning af hjælpestoffer, som påvirker koncentrationen af frie zinkioner, f.eks. zinkkompleksdannende og/eller zinkfældende forbindelser, bør derfor undgås. Under sådanne betingelser vælges det totale indhold af zinkioner for et okseinsulinpræparats vedkommende ved pH 7 i området fra $0,25 \times 10^{-2} \times A$ til $10^{-2} \times A$,
- 20 fortrinsvis fra $0,45 \times 10^{-2} \times A$ til $0,85 \times 10^{-2} \times A$ $\mu\text{mol/ml}$, idet A angiver præparatets totale insulinaktivitet i i.u./ml præparat.

For et svineinsulinpræparats vedkommende er de tilsvarende koncentrationsområder fra $0,7 \times 10^{-2} \times A$ til $1,5 \times 10^{-2} \times A$ og $10^{-2} \times A$ til $1,3 \times 10^{-2} \times A$ $\mu\text{mol zinkion/ml}$ præparat.

- 25 I tilfælde, hvor præparatet indeholder zinkion-bindende substanser og/eller præparatets pH er væsentligt højere end 7, må præparatets totale zinkindhold øges i afhængighed heraf. Supplerende vejledning er i denne henseende angivet i britisk patentskrift nr. 840.870.

- 30 En steril suspension af krystallinsk insulin, fortrinsvis højrenset eller monokomponentinsulin, i en mængde beregnet til frembringelsen af en færdig suspension af forudbestemt aktivitet, f.eks. 40, 80 eller 100 i.u./ml blev fremstillet i en vandig opløsning indeholdende et konserveringsmiddel, f.eks.
- 35 methylparaben, en bufferforbindelse, f.eks. natriumacetat, og et i fysiologisk henseende acceptabelt salt, f.eks. natriumchlorid, sidstnævnte i en til frembringelse af en isotonisk opløsning afpasset mængde. Suspensionens zinkion-indhold blev indstillet på

den beregnede værdi ved tilsætning af en opløsning af et zinksalt, f.eks. zinkchlorid. Præparatets pH indstilledes på en værdi i området fra 6 - 8, fortrinsvis ca. 7, efterfulgt af justering af suspensionens totale rumfang.

- 5 En steril opløsning af monodesamidoinsulin af forudbestemt insulinstyrke f.eks. 40, 80 eller 100 i.u./ml, fremstilledes særskilt ved at opløse den beregnede mængde monodesamidoinsulin i vand sammen med konserveringsmiddel, buffersubstans og et i fysiologisk henseende acceptabelt salt i tilstrækkelig mængde til frembringelse af isotoni, idet der i alle tilfælde anvendtes de samme forbindelser, som blev anvendt i forbindelse med fremstillingen af insulinsuspensionen. Den til fremstillingen af det færdige præparat nødvendige mængde zinksalt kan om ønsket fordeles mellem insulinsuspensionen og monodesamidoinsulinopløsningen. Sidstnævntes pH indstilles på en værdi i området fra 6 - 8, fortrinsvis ca. 7, efterfulgt af justering af opløsningens totale rumfang.

- 20 Det færdige tofasiske insulinpræparat fremstilledes derefter ved sammenblanding af forud afmålte rumfang af insulinsuspensionen og monodesamidoinsulinopløsningen, hvis forhold bestemtes ud fra det ønskede indhold af monodesamidoinsulin i det færdige præparat.

- 25 Opfindelsen skal herefter beskrives nærmere under henvisning til efterfølgende eksempler. I eksemplerne blev vand og vandige opløsninger steriliseret, for sidstnævntes vedkommende ved filtrering, hvorefter al behandling gennemførtes under sterile betingelser.

FREMSTILLING AF MONODESAMIDOINSULIN

Eksempel 1

- 30 Ud fra krystallinsk svineinsulin.

- Svineinsulin (0,5 g råinsulin, udkrystalliseret med citratbuffer) blev opløst i vand indeholdende saltsyre (5 ml af 0,2 N opløsning), hvorefter der blev tilsat vand til et totalt volumen på 50 ml. Opløsningen (med pH 2,02) blev efter sterilfiltrering hensat ved stuetemperatur (25°C) i 30 dage.

En blanding af insulin og monodesamidoinsulin blev udfældet ved tilsætning af en vandig opløsning indeholdende zinkioner (0,5 ml M zinkacetat) efterfulgt af indstilling af pH på 5,5.

5 Det udfældede stof (indeholdende ca. 50% monodesamidoinsulin, bestemt ved DISC PAGE analyse) opløstes i vand indeholdende EDTA (50 mg af dinatriumsaltet), ethanol (20 ml af 60% v/v vandig opløsning) og natriumchlorid (0,08 g), hvorefter tris(hydroxymethyl)aminoethan tilsattes til indstilling af pH på
10 8,4. En uopløselig rest blev fjernet ved centrifugering.

Supernatanten blev sat på en søjle (2,5 cm x 30 cm) af QAE-Sephadex A-25, som forud var bragt i ligevægt med en buffer bestående af

Tris(hydroxymethyl)aminoethan (121,1 g)
15 Natriumchlorid (61,36 g)
Saltsyre (50 ml 6 N)
Ethanol (6,24 liter 96% v/v)
Vand ad 10 liter. Bufferens pH var 8,6.

Elueringen blev udført med den samme buffer ved 25°C,
20 og fraktioner (hver på 4,9 ml) blev opsamlet ved en elueringshastighed på 50 ml/time. Ekstinktionen blev målt ved 276 nm.

Fraktionerne fra den centrale del af hovedtop nr. 2 blev samlet og monodesamidoinsulinet udfældet ved tilsætning af et tilsvarende volumen af en vandig opløsning af zinkacetat (0,01
25 M, pH 6,6), hvorefter det bundfældede blev fraskilt ved centrifugering.

Bundfældet, opløst i vandig eddikesyre (5 ml af M opløsning), blev afsaltet på en søjle (2,5 cm x 40 cm) af Sephadex G 10. Elueringen med vandig eddikesyre (M opløsning) ved
30 en hastighed af 0,6 ml/minut blev fulgt ved måling af ekstinktionen ved 276 nm. Fraktioner svarende til hovedtoppen blev opsamlet, inddampet og frysetørret. Udbyttet af svine-monodesamidoinsulin var 140 mg.

Eksempel 2

Ud fra krystallinsk okseinsulin.

Okseinsulin (0,5 g råinsulin, udkrystalliseret med citrabuffer) blev opløst i vand indeholdende saltsyre (5 ml af 0,2 N opløsning), hvorefter der tilsattes vand til et totalt volumen på 50 ml. Opløsningen (med pH 2,09) blev efter sterilfiltrering hensat ved stuetemperatur (25°C) i 30 dage.

Okse-monodesamidoinset blev udvundet på samme måde som i eksempel 1. Udbyttet var 147 mg.

10 Eksempel 3

Ud fra monokomponent (MC) svineinsulin.

MC-svineinsulin (40 g) blev opløst i vand indeholdende saltsyre (30 ml af 2 N opløsning), hvorefter vand blev tilsat til et totalt volumen på 2000 ml. Opløsningen (med pH 2,08) blev efter sterilfiltrering hensat ved stuetemperatur (25°C) i 45 dage.

Udfældning af en blanding af insulin og monodesamidoinset blev foretaget ved tilsætning af en vandig opløsning indeholdende zinkioner (20 ml af M zinkacetat) efterfulgt af justering af pH til 5,5.

Monodesamidoinset blev skilt fra andre komponenter ved ionbytterchromatografi på en søjle (15 cm x 4 cm) af QAE-Sephadex A-25, genvundet ved udfældning med zinkacetat efterfulgt af afsaltning på samme måde som beskrevet i eksempel 1.

25 Udbyttet af svine-monodesamido-A²¹-insulin var 19,8 g.

Eksempel 4

Ud fra monokomponent okseinsulin.

MC-okseinsulin (25 g) blev opløst i vand indeholdende saltsyre (25 ml af 2 N opløsning), hvorefter vand blev tilsat til et totalt volumen på 2500 ml. Opløsningen (med pH 2,09) blev efter sterilfiltrering hensat ved stuetemperatur (25°C) i 30 dage.

En blanding af insulin og monodesamidoinset blev udfældet ved tilsætning af en vandig opløsning indeholdende zinkioner (25 ml af M zinkacetat) efterfulgt af justering af pH til 5,5.

Fraktionering blev udført på en søjle (10 cm x 42 cm) af QAE-Sephadex A-25, som forud var bragt i ligevægt med en buffer af den i eksempel 1 angivne sammensætning. Fraktioner (hver på 250 ml) blev opsamlet ved en elueringshastighed på 530 5 ml/time, Ekstinktionen af eluatet blev målt ved 276 nm.

Fraktioner af den centrale del af hovedtop nr. 2 blev opsamlet, og monodesamidoinsulinet blev fældet ved tilsætning af zinkacetat efterfulgt af afsaltning efter samme fremgangsmåde som beskrevet i eksempel 1.

10 Udbyttet af okse-monodesamido-A²¹-insulin var 10,8 g.

Eksempel 5

Udvinding af monodesamidoinulin under fremstilling af MC-insulin ud fra krystallinsk insulin.

Monodesamidoinulin, som følges med insulin i gelfil- 15 trering, blev skilt fra sidstnævnte ved chromatografi på en anionbytter (jfr. britisk patentskrift nr. 1.285.023). Fraktionerne svarende til den centrale del af kromatogrammets monodesamidoinulintop blev opsamlet, og monodesamidoinulinet blev udfældet ved tilsætning af zinkacetat og genvundet på samme 20 måde som i de foregående eksempler.

TOFASISKE INSULINPRÆPARATER

Eksempel 6

Tofasisk præparat af MC-okseinsulin og opløst okse-monodesamido-insulin (svarende til 20% af totalaktiviteten), indeholdende 0,18 25 μmol zink/ml.

A 1. Suspension af krystallinsk MC-okseinsulin

(a) Krystallinsk MC-okseinsulin (1,45 g), indeholdende 0,4% Zn^{++} og med en total aktivitet på 40.000 i.u., blev opløst i vand indeholdende zinkchlorid 30 (602 μl af en 1% vandig opløsning, beregnet som

Zn^{++}) ved tilsætning af saltsyre (750 μl af 2 N vandig opløsning). Vand blev tilsat til et samlet volumen på 50 ml.

5 (b) Den således fremstillede insulinopløsning blev sat til en vandig opløsning (50 ml) af natriumacetat (1,36 g), natriumchlorid (7,0 g) og natriumhydroxid (275 μl af 2 N vandig opløsning).

10 (c) Det amorf insulin i den færdige blanding (100 ml) med pH 5,48 blev omdannet til krystallinsk insulin som beskrevet i britisk patentskrift nr. 766.995 ved podning med en vandig suspension (1 ml) af insulinmikrokrystaller med en gennemsnitsdiameter på ca. 1 micron og fremstillet som beskrevet i britisk patentskrift nr. 766.994.

15 A 2. Fremstilling af en suspension af MC-insulinkrystaller, 40 i.u./ml.

En opløsning af methylparaben (375 mg) i vand (280 ml) blev tilsat saltsyre (470 μl af 2 N opløsning) tillige med et delvolumen (37,5 ml) af suspension A 1. Den færdige suspension, 20 pH 5,52, blev hensat i ca. 2 timer, hvorefter en opløsning af natriumhydroxid (375 μl 2 N) i vand (50 ml) blev tilsat langsomt under omrøring. Vand blev tilsat til et samlet volumen på 375 ml, hvorefter den færdige suspension af okseinsulinkrystaller med pH 7,1 indeholdt 40 i.u./ml.

25 B 1. Fremstilling af en opløsning af okse-monodesamidoinsulin.

Okse-monodesamido- A^{21} -insulin (200 mg), fremstillet som i eksempel 4, med en total aktivitet på 5000 i.u., blev opløst i vand indeholdende zinkchlorid (150 μl af en 1% opløsning, beregnet som Zn^{++}) og saltsyre (1,35 ml af 0,2 N opløsning). Vand blev 30 tilsat til et samlet volumen på 50 ml.

B 2. Fremstilling af monodesamidoinsulinopløsning, 40 i.u./ml.

En opløsning af methylparaben (130 mg) i vand (75 ml) blev tilsat natriumacetat (170 mg), natriumchlorid (875 mg) og en vandig opløsning af natriumhydroxid (2,5 ml af 0,2 N), efterfulgt af opløsning B 1. Det samlede volumen blev indstillet på 125 ml ved tilsætning af vand, hvorved der fremkom en opløsning af monodesamidoinsulin med pH 7,1, indeholdende 40 i.u./ml.

C. Injicerbart tofasisk insulinpræparat.

- 10 Et præparat med pH 7,1 fremstilledes ved sammenblanding af et delvolumen (80 ml) af suspension A 1 med et delvolumen (20 ml) af monodesamidoinsulinopløsning B 2. Præparatet blev fyldt på sterile ampuller.

Eksempel 7

- 15 Tofasisk præparat af højrenset okseinsulin og opløst oksemonodesamidoinsulin (svarende til 25% af totalaktiviteten), indeholdende 0,26 μmol zink/ml.

A 1 Suspension af højrenset krystallinsk okseinsulin.

- 20 Fremgangsmåden var analog med den tilsvarende i eksempel 6, dog med den undtagelse at de indgående mængder var følgende:

- (a) Krystallinsk, højrenset okseinsulin (620 mg med en total aktivitet på 16.000 i.u.), indeholdende 0,37% zink.

- 25 Zinkchlorid (2,5 ml af 0,107% vandig opløsning, beregnet som Zn^{++}).
Saltsyre (2,85 ml af 0,2 N opløsning).
Vand ad 25 ml.

- (b) Natriumacetat (544 mg).
Natriumchlorid (2,8 g).
Natriumhydroxid (1,1 ml af 0,2 N vandig opløsning)
Vand ad 15 ml. pH var 5,45.

- 5 (c) Den vandige suspension blev podet og derefter
hensat i 24 timer til krystallisation ved stuetem-
peratur.

A 2. Fremstilling af en suspension af insulinkry-
staller, 40 i.u./ml.

- 10 En opløsning af methylparaben (400 mg) i vand (300 ml)
blev tilsat en vandig opløsning af zinkacetat (103 µl af M opløs-
ning) tillige med hele suspensionen A 1 af insulinkrystaller. Den
således fremstillede suspension med pH 5,56 blev hensat i to
timer, hvorefter en blanding af natriumhydroxid (400 µl af 2 N
15 vandig opløsning) og vand (50 ml) blev tilsat langsomt under
omrøring. pH af den resulterende suspension blev indstillet på
7,03 ved tilsætning af saltsyre (225 µl af 0,2 N), hvorefter der
fyldtes op til 400 ml med vand.

B 1. Fremstilling af en opløsning af okse-monodesamido-
20 insulin.

Okse-monodesamidinsulin, fremstillet i henhold til
eksempel 2 (240 mg, totalaktivitet 5600 i.u.), opløstes i vand
indeholdende saltsyre (280 µl af 0,2 N). Det samlede volumen blev
indstillet på 20 ml.

B 2. Fremstilling af en opløsning af okse-monodesamido-
25 insulin, 40 i.u./ml.

- En opløsning af methylparaben (140 mg) i vand (105 ml)
blev tilsat natriumacetat (190,4 mg), natriumchlorid (980 mg) og
en vandig opløsning af natriumhydroxid (235 µl af 2 N), efter-
30 fulgt af opløsning B 1. pH blev indstillet på 6,99 ved hjælp af
en vandig opløsning af natriumhydroxid (50 µl af 0,2 N) og total-
rumfanget på 140 ml, hvilket gav en opløsning af okse-monodes-
amidinsulin indeholdende 40 i.u./ml.

C. Injicerbart tofasisk insulinpræparat.

Et præparat med pH 7,01 fremstilledes ved sammenblanding af suspensionen A 2 (395 ml) med opløsning B 2 (131,7 ml). Præparatet overførtes til sterile ampuller.

5 Eksempel 8

Tofasisk præparat af MC-svineinsulin og opløst svine-monodes-amido-insulin (svarende til 10% af totalaktiviteten), indeholdende 0,55 μmol zink/ml.

A 1. Suspension af MC-svineinsulinkrystaller.

10 Fremgangsmåden var analog med den tilsvarende i eksempel 6, dog med den undtagelse, at de indgående mængder var følgende:

15 (a) Krystallinsk MC-svineinsulin (1,493 g med en totalaktivitet på 40.000 i.u.), indeholdende 0,37% zink

Zinkchlorid (650 μl af en 1,02% vandig opløsning, beregnet som Zn^{++}).

Saltsyre (710 μl af 2 N opløsning)

Vand ad 60 ml

20 (b) Natriumacetat (1,36 g)
Natriumchlorid (7,00 g)
Natriumhydroxid (275 μl af 2 N vandig opløsning)
Vand ad 40 ml. pH var 5,49

(c) Den vandige suspension blev podet og derefter
25 hensat i 24 timer til krystallisation ved stuetemperatur.

A 2. Fremstilling af en suspension af insulinkrystaller, 40 i.u./ml.

En opløsning af methylparaben (400 mg) i vand (300 ml) blev tilsat en vandig opløsning af zinkacetat (168 μl af molær
30 opløsning) tillige med et delvolumen (40 ml) af insulinkrystal-suspensionen A 1. Den således fremstillede suspension med pH 5,62

blev hensat i to timer, hvorefter en vandig opløsning af natriumhydroxid (375 µl af 2 N) i vand (50 ml) blev tilsat langsomt under omrøring. pH af den resulterende suspension blev indstillet på 7,02 ved tilsætning af saltsyre (225 µl af 0,2 N), hvorefter 5 der fyldtes op til 400 ml med vand.

B. Fremstilling af en opløsning af svine-monodesamidoinsulin, 40 i.u./ml.

Svine-monodesamido-A²¹-insulin, fremstillet i henhold til eksempel 3 (86,7 mg med en totalaktivitet på 2000 i.u.) og 10 opløst i vand (10 ml), gav opløsning B 1.

En opløsning af methylparaben (50 mg) i vand (35 ml) blev tilsat natriumacetat (68 mg), natriumchlorid (350 mg) og en vandig opløsning af natriumhydroxid (840 µl af 0,2 N), efterfulgt af opløsning B 1. pH blev indstillet på 6,98 og det samlede 15 volumen på 50 ml, hvorved der fremkom en opløsning af svinemonodesamidoinsulin indeholdende 40 i.u./ml.

C. Injicerbart præparat af tofasisk insulin.

Et præparat med et pH på 7,01 blev fremstillet ved at blande suspension A 2 (395 ml) med opløsning B 2 (44 ml). Præpa- 20 ratet overførtes til sterile ampuller.

Eksempel 9

Tofasisk præparat af Mc-svineinsulin og opløst svine-monodesamidoinsulin (svarende til 28% af totalaktiviteten) indeholdende 0,3 µmol zink/ml.

25 A 1. Den i eksempel 8 fremstillede suspension A 1 af svineinsulinkrystaller blev brugt til dette præparat.

A 2. Fremstilling af en suspension af insulinkrystaller, 40 i.u./ml.

En opløsning af methylparaben (400 mg) i vand (300 ml) 30 blev tilsat en vandig opløsning af zinkacetat (92 µl af en M opløsning) tillige med et delvolumen (40 ml) af insulinkrystalsuspension A 1 fra eksempel 8. Den således fremstillede suspen-

sion med pH 5,61 blev hensat i to timer, hvorefter en blanding af natriumhydroxid (375 µl af 2 N vandig opløsning) og vand (50 ml) blev tilsat langsomt under omrøring. pH af den resulterende suspension var 7,03. Det samlede volumen blev indstillet på 400 ml med vand. Et delvolumen af denne suspension (200 ml) blev indstillet på pH 6,64 ved tilsætning af saltsyre (200 µl af 0,2 N).

B. Fremstilling af en opløsning af svine-monodesamidoinsulinopløsning, 40 i.u./ml.

10 Svine-monodesamido-A²¹-insulin, fremstillet i henhold til eksempel 3 (277,3 mg med en totalaktivitet på 6400 i.u.) og opløst i vand (25 ml), gav opløsning B 1.

En opløsning af methylparaben (160 mg) i vand (130 ml) blev tilsat natriumacetat (217,6 mg), natriumchlorid (1120 mg) og
15 en vandig opløsning af natriumhydroxid (2,688 ml af 0,2 N), efterfulgt af opløsning B 1 til fremstilling af opløsning B. pH blev nedsat fra 7,30 til 6,60 med 0,2 N saltsyre, hvorefter der fyldtes op til 160 ml med vand.

C. Et præparat med et pH på 6,61 blev fremstillet ved
20 at blande suspension A 2 (pH 6,64, 195 ml) med et delvolumen (75 ml) af opløsning B. Præparatet overførtes til sterile ampuller.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et stabilt, injicerbart, tofasisk, zinkholdigt insulinpræparat med en pH-værdi i området fra 6 til 8, ved hvilken man blander krystallinsk insulin, en af insulin afledt, vandopløselig forbindelse og vand samt om nødvendigt indstiller blandingens pH-værdi til en værdi i det angivne område, hvorhos det krystallinske insulin og den vandopløselige insulinforbindelse begge hidrører fra samme dyreart, k e n d e t e g n e t ved, at man som den af insulin afledte, vandopløselige forbindelse anvender et monodesamido-insulin.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at monodesamidoinsulinet er monodesamido-A²¹-insulin.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 2, k e n d e t e g n e t ved, at monodesamidoinsulinet anvendes i en mængde svarende til fra 10 til 75%, fortrinsvis fra 20 til 50%, af den totale insulinaktivitet af det færdige præparat.

Fremdragne publikationer:

DK patenter nr. 88353, 95007

DE offentliggørelsesskrifter nr. 2418218, 2459515

GB patent nr. 1285024.