



- C (45) Patenti myönnetty
Patent. rekisteri 11 00 1980
(51) Kv.lk.⁴/Int.Cl.⁴ A 61 K 37/26

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

- | | |
|---|----------|
| (21) Patentihakemus - Patentansökning | 830375 |
| (22) Hakemispäivä - Ansökningsdag | 03.02.83 |
| (24) Alkuperäpäivä - Giltighetsdag | 03.02.83 |
| (41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig | 06.08.83 |
| (44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad | 31.05.89 |
| (86) Kv. hakemus - Int. ansökan | |
| (32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet | 05.02.82 |
| Tanska-Danmark (DK) 491/82 | |
| Toteennäytetty-Styrkt | |

- (71) Novo Industri A/S, Novo Alle, Bagsvaerd, Tanska-Danmark (DK)
- (72) Jens Jørgen Vejlgård Brange, Klampenborg,
Svend Havelund, Hvidovre, Tanska-Danmark (DK)
- (74) Berggren Oy Ab
- (54) Menetelmä infuusiotaikokukseen stabiloidun insuliiniliuoksen valmistamiseksi, jolla on korotettu sinkkipitoisuus - Förfarande för framställning av en för infusionsändamål avsedd stabiliserad insulinlösning, som har en förhöjd zinkhalt

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee stabiloituja insuliiniliuoksia ja menetelmää niiden valmistamiseksi.

Ennentuntemattomia farmaseuttisia insuliiniliuoksia, joilla on parannettu fysikaalinen stabiliteetti, valmistetaan lisäämällä niihin olennaisesti ionoitunutta sinkkisuolaa määränä, joka vastaa insuliinin käytettävissä olevaa sinkki-ionipitoisuutta, joka on suurempi kuin 4 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri.

Nämä insuliiniliuokset soveltuvat erikoisesti käytettäväksi jatkuvaan insuliininantoon tarkoitetuissa laitteissa.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser stabiliserade insulinlösningar och ett förfarande för framställning av dessa.

Hittills okända farmaceutiska lösningar av löst insulin med förbättrad fysikalisk stabilitet framställes genom inkorporering i lösningarna av ett väsentligen joniserat zinksalt i en koncentration motsvarande ett innehåll av zinkjoner tillgängliga för insuliner på mer än 4 Zn^{2+} /hexamer insulin.

Insulinlösningarna är särskilt lämpade för användning i apparat för kontinuerlig insulindosering.

Menetelmä infuusiotarkoitukseen stabiloidun insuliiniliuoksen valmistamiseksi, jolla on korotettu sinkkipitoisuus

Tämä keksintö koskee menetelmää aikaisemmin tuntemattomien stabiloitujen insuliiniliuoksien valmistamiseksi, jotka erikoisesti soveltuvat käytettäväksi jatkuvaan insuliininantoon tarkoitetuissa laitteissa.

Viime vuosina on tehty yhä enemmän yrityksiä kehittää kannettavia tai istutettavia systeemejä insuliinin jatkuvaa infuusiota varten. Tällaisten pyrkimysten päätarkoituksena on aikaansaada sokeritautipotilaan käytettäväksi sellainen insuliininantomenetelmä, joka on tarkemmin sovitettavissa potilaan fysiologiseen insuliinintarpeen vuorokautisiin vaihteluihin kuin on ollut mahdollista tavanmukaisessa insuliinilääkinnässä.

Jatkuvaan insuliininantoon tarkoitettun laitteen mekaaninen osa käsittää sellaiset oleelliset elementit kuten insuliinisäiliön, pumppusysteemin ja katetrin, joka soveltuu valittuun insuliininantomenetelmään, jona tavallisesti on ihonalaisesti, laakimonsisäisesti tai vatsakalvonsisäisesti suoritettu anto.

Pumppusysteemi voi olla automaattisesti aktivoituva, ja se voidaan lisäksi varustaa käsikäyttöisellä säätimellä insuliinin antamiseksi silloin, kun erityistä tarvetta esiintyy.

Jos insuliiniliuosta annetaan ruiskun avulla, tämä tulee tavallisesti toimimaan myös insuliinisäiliönä. Ruiskutyyppejä olevia laitteita kannetaan yleensä kehon ulkopuolella. On kuitenkin kehitetty myös huomattavasti monimutkaisempia systeemejä, joissa koko mekaaninen yksikkö on konstruoitu istutusta, tavallisesti ihonalaista istutusta varten. Insuliinisäiliö on yleensä sovitettu ihon läpi tapahtuvaa uudelleen-täyttöä varten.

Insuliinin taipumus saostua kaupallisesti saatavissa olevista liuoksista, mikä on omiaan aiheuttamaan sekä mekaanisten osien että infuusiokatetrien tukkeutumista, on osoittautunut suurimmaksi esteeksi jatkuvasti infundoivien laitteiden edelleen kehittämiseksi ja kliiniselle soveltamiselle. Sitäpaitsi on olemassa ilmeisiä syitä pyrkiä pienentämään kaikkien jatkuvasti infundoivien systeemityyppien kokoa. Tällöin esiintyy tarvetta saada käyttöön väkevämpiä insuliiniliuoksia kuin tähän saakka on ollut käytettävissä, mikä on omiaan edelleen pahentamaan yllämainittuja ongelmia.

Yleensä otaksutaan, että selityksenä saostumisilmiölle on insuliinin taipumus muodostaa liukenemattomia fibrillejä, erikoisesti jos insuliiniliuoksia pidetään kohotetuissa lämpötiloissa pitkäaikojä aikoja. On myös todettu, että jokainen liuoksen tai liuoksessa tapahtuva liike, mm. se pyörteenmuodostus, jonka liuoksen virtaus ahtaan aukon kautta saa aikaan, aiheuttaa insuliinin fibrilloitumista. Ilmeisesti insuliiniliuokset joutuvat useimpien tai kaikkien tällaisten vaikutusten alaisiksi jokaisessa jatkuvasti infundoivassa laitetyypissä. Näitä aikaisemmin tunnettujen insuliinivalmisteiden puutteita tässä suhteessa on runsaasti esitetty kirjallisuudessa, esim. äskettäin julkaistussa yleiskatsausartikkelissa: W.D. Loughheed et al. Diabetologia vol. 19 (1980), sivut 1-97.

Tämän ongelman ratkaisemiseksi on ehdotettu sellaisten happamien insuliiniliuosten käyttöä, jotka sisältävät glutamiinihappoa tai asparagiinihappoa Diabetes 30 (1981), 837 tahi neutraaleja insuliinivalmisteita, jotka sisältävät jotain sokerilajia kuten glukoosia (D.S. Schade et al.: Satelite-Symphosium to 16th European Association for the Study of Diabetes-Meeting, Greece, 22-23 Sept., 1980, s. 107). Lisäksi on ehdotettu epäionisen pinta-aktiivisen aineen käyttöä (H. Thurow: saksalainen patenttihakemus P 29 52 119.5).

Insuliini on kuitenkin kemiallisesti epästabiili happamessa liuoksessa jopa kehonlämpötilan alapuolella, ja se voi reagoida palautuvasti tai palautumattomasti hiilihydraattien kanssa (kts. julkaisua: J. Brange & S. Havelund, "Properties of Insulin in Solution", Proceedings from International Symposium on Artificial Systems for Insulin Delivery, Assisi, Sept. 20-23, 1981, Raven Press). Lisäksi yllämainittu epäfysiologinen pinta-aktiivinen aine voidaan katsoa haitalliseksi parenteraaliseen käyttöön tarkoitetuissa lääkeaineissa.

Mainitut haitat poistaa tämä keksintö aikaansaamalla ennentuntemattomia insuliiniliuoksia, joissa insuliini on vähemmän altis kuin tavanmukaisissa insuliinivalmisteissa saostumaan niissä olosuhteissa, jotka vallitsevat jatkuvasti toimivissa insuliininantolaitteissa.

Keksintö perustuu siihen yllättävään havaintoon, että sinkki-ionit tiettyinä pitoisuuksina aikaansaavat erittäin stabiloivan vaikutuksen neutraaleihin insuliiniliuoksiin.

Sinkkiä on jo useita vuosia käytetty kiteytymistä edistävänä metallina insuliinikiteitä valmistettaessa. Neutraalien insuliiniliuosten valmistukseen käytetyt insuliinikiteet sisältävät sen vuoksi yleensä sinkkiä (kts. esim. brittiläistä patenttijulkaisua 840 870 ja tanskalaista patenttijulkaisua 116 527).

Sinkkisisällön yläraja neutraaleissa insuliiniliuoksissa on noin 1 paino-% sinkki-ioneja (laskettuna kuivien insuliinikiteiden painosta).

Sellaisten aineiden läsnäollessa, jotka muodostavat vähän liukenevia yhdisteitä tai kompleksiyhdisteitä sinkin kanssa, valmisteet voivat sisältää huomattavasti enemmän sinkkiä, kunhan insuliinin käytettävissä oleva sinkki-ionimäärä, eikä siis mainittuihin aineisiin sitoutumaton määrä ylitä yllämainittua ylärajaa.

Jos insuliinin käytettävissä olevien sinkki-ionien pitoisuus ylittää yllämainitun ylärajan eli noin 1 paino-%, mikä vastaa noin 5 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri, sinkki-insuliini-komplekseja saostuu liuoksesta.

US-patentista 3 091 573 tunnetaan nopeasti vaikuttava, stabiili neutraali insuliinivalmiste, joka sisältää noin 2,5 - 5 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri. Yläraja on tarkoitettu kaikille insuliiniliuoksille, joissa sinkki-insuliinikompleksi saostuu liuoksesta, mikäli sinkkipitoisuus ylittää tämän arvon. Tässä US-patentissa on esimerkeissä kuvattu valmiste, jonka sinkkipitoisuus on korkein eli 0,7 % sinkkiä, joka kuivainsuliiniin perustuen vastaa $3,71 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliiniheksameeri.

Jotta sinkki-insuliinikompleksien saostuminen varmasti vältetään, on sinkkipitoisuus kaupallisissa insuliinivalmisteissa pidetty huomattavasti mainitun ylärajan alapuolella, ja nyt onkin tutkimuksissa todettu, että kaikissa ennestään tunnetuissa kaupallisissa neutraaleissa insuliinivalmisteissa sinkki-ionipitoisuus on n. 2-3,5 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri.

Kuviosta 1 ilmenee kuitenkin, että insuliinivalmisteet, joiden sinkki-ionipitoisuus on 2 ja jopa 4 insuliiniheksameeria kohti, ovat epästabiileja jatkuvassa insuliininannossa vallitsevissa olosuhteissa, koska insuliini saostuu muutamassa päivässä.

Sen vuoksi on se havainto yllättävä, että sinkki-ionipitoisuuden lisäys määrättyihin arvoihin, jotka ovat juuri sinkki-insuliinin saostumien ylärajan n. 5 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri alapuolella, aikaansaa stabiloivan vaikutuksen insuliiniliuoksiin edellä selostetuissa jatkuvassa insuliininannossa vallitsevissa olosuhteissa.

Tämä keksintö aikaansa ennentuntemattoman insuliiniliuoksen, joka soveltuu käytettäväksi jatkuvassa insuliininannossa ol-
 len fysikaalisesti stabiili siinä vallitsevissa olosuhteis-
 sa, joka niin haluttassa käsittää säilytysaineen, liuoksen
 isotoniseksi tekevän aineen sekä pH-puskurin, ja jolle on
 tunnusomaista, että se sisältää olennaisesti ionoitunutta
 sinkkisuolaa määrässä, joka vastaa insuliinin käytettävissä
 olevaa sinkki-ionipitoisuutta, joka on suurempi kuin 4 Zn^{2+} /
 insuliiniheksameeri.

Maininnalla "insuliinin käytettävissä olevat sinkki-ionit"
 tarkoitetaan tässä sinkki-ioneja, jotka eivät ole liittyneet
 muihin yhdisteisiin, jotka muodostavat kompleksiyhdisteitä
 sinkin kanssa, kuten esim. sitraattiin, glysiiniin tai fos-
 faattiin.

Sinkki-ionipitoisuuden ylärajana on sellainen sinkkimäärä,
 joka aiheuttaa sinkki-insuliinikompleksien saostumista, ts.
 noin 5 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri, kuten edellä on mainittu.

US-patentissa 3 584 121 on kuvattu neutraali, nopeasti vai-
 kuttava insuliinivalmiste, joka esimerkkien 2 ja 6 mukaisesti
 sisältää 1 % sinkkiä, joka vastaa arvoa $5,3 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliini-
 heksameeri. Tämän valmisteen stabiliteettikerroin on vain 3,5,
 edullisesti 1. Näin ollen nämä valmisteet eivät sisälly
 esillä olevan hakemuksen mukaiseen alueeseen, eivätkä siten
 sovellu jatkuvaan annooteluun liian alhaisen fyysisen stabiili-
 lisuutensa vuoksi. Tämä johtuu siitä, että valmiste sisältää
 kompleksin muodostaja-ainetta, edullisesti fosfaatti- ja sit-
 raattipuskuria. Siten, koska osa sinkistä on sitoutuneena
 kompleksoivaan aineeseen, ei koko sinkkimäärä ole insuliinin
 käytettävissä.

Keksinnön eräessä edullisessa sovellutusmuodossa insuliinin käytettävissä olevien sinkki-ionien pitoisuus ei ylitä arvoa $4,8 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliiniheksameeri ja on sopivimmin alueella $4,2 - 4,5 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliiniheksameeri.

Sopivimpia sinkkisuoloja ovat sinkkiasetaatti ja sinkkikloridi.

Keksinnön eräessä toisessa edullisessa sovellutusmuodossa käytetään fenolia säilytysaineena ja glyserolia liuoksen isotoniseksi tekevänä aineena.

Kuten edellä on mainittu, yllä olevat sinkkisisällöt tarkoittavat insuliinin käytettävissä olevia sinkki-ioneja. Sinkki-komplekseja muodostavien aineiden läsnäollessa osa sinkistä sitoutuu kompleksinmuodostavaan aineeseen. Koska insuliinin käytettävissä olevien sinkki-ionien pitoisuuden pitäisi aina olla suurempi kuin 4 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri, on lisättävä enemmän sinkkiä. Niinpä sinkin kokonaispitoisuus sinkkikompleksia muodostavaa ainetta sisältävissä insuliinivalmisteissa on enemmän tai vähemmän yllämainittujen rajojen yläpuolella riippuen käytetyn kompleksinmuodostavan aineen määrästä ja sen kompleksinmuodostusvakioista.

Usein pidetään parempana käyttää sinkkikompleksin muodostavaa ainetta, jonka avulla varmistetaan laajempi toiminta-alue insuliinisisältöön perustuvalle sinkin kokonaispitoisuudelle. Jos esim. joku laitteen osa, säiliö, pumppusysteemi, letkut jne. sitoo tai luovuttaa sinkkiä, tulee sinkki-

kompleksia muodostavan aineen läsnäolo varmistamaan, että insuliinin käytettävissä olevien sinkki-ionien pitoisuus pysyy keksinnön mukaisen alueen sisäpuolella.

Tämä keksintö aikaansaa sen vuoksi sellaisen ennen tuntemattoman insuliiniliuoksen, joka soveltuu käytettäväksi jatkuvassa insuliininnannossa ollessaan stabiili siinä vallitsevissa olosuhteissa, joka mahdollisesti sisältää säilytysaineen, liuoksen isotoniseksi tekevän aineen ja puskurin sekä lisäksi sinkkikompleksin muodostavan aineen, ja jolle on tunnusomaista, että sinkin kokonaispitoisuus on vähintään 5 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri ja että keksinnön eräässä edullisessa sovellutusmuodossa sinkin kokonaispitoisuus on vähintään 6 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri.

Näissä insuliiniliuoksissa käytettävien sinkkikompleksinmuodostavien aineiden pitää olla liukenevia ja fysiologisesti hyväksyttäviä.

Sopivia sinkkikompleksinmuodostavia aineita ovat aminohapot, esim. glysiini, alaniini, valiini, leusiini, isoleusiini, seriini, treoniini, fenyylialaniini, proliini, tryptofaani, asparagiini, glutamiinihappo ja histidiini, sekä oligopeptidit, kuten diglysiini.

Toisen ryhmän sopivia sinkkikompleksinmuodostavia aineita muodostavat karboksyylihapot, kuten etikkahappo, tai hydroksikarboksyylihapot, kuten sitruunahappo, 3-hydroksi-voihappo ja maitohappo.

Sopivimpia sinkkikompleksinmuodostavia aineita ovat glysiini ja sitruunahappo sekä myös diglysiini ja histidiini.

Pienin sinkki-ionien kokonaispitoisuus olennaisesti stabiiloivan vaikutuksen, ts. välillä 5-10 olevan stabiliteettikertoimen (joka on määritelty selityksen yksityiskohtaisessa osassa) saavuttamiseksi riippuu siitä, mitä kompleksin-

muodostavaa ainetta käytetään. Edullisin on kuitenkin yli 10 oleva stabiliteettikerroin.

Käytettäessä heikkoa kompleksinmuodostavaa ainetta, esim. glysiiniä 10 mM, huomattava stabilointi saavutetaan sinkin kokonaispitoisuuden ollessa n. 5 Zn²⁺/insuliiniheksameeri (kts. taulukkoa I ja kuviota 2), sinkin kokonaispitoisuuden edullisimman alueen ollessa välillä n. 5 - n. 8 Zn²⁺/insuliiniheksameeri.

Taulukko I

40 IU sikainsuliinia/ml glysiinin 10⁻²-molaarisessa liuoksessa sinkkipitoisuuden vaihdeltaessa, liuoksen ollessa valmistettu esimerkin 7 mukaisesti.

Sinkki- pitoisuus (M)	Zn ²⁺ insuliini heksameeriä kohti*	Stabiliteetti- kerroin
1,0 · 10 ⁻⁴	2,4	1
1,8 · 10 ⁻⁴	4,4	4
2,0 · 10 ⁻⁴	4,9	7
2,2 · 10 ⁻⁴	5,4	45
2,6 · 10 ⁻⁴	6,4	49
3,4 · 10 ⁻⁴	8,4	8
3,8 · 10 ⁻⁴	9,4	10
4,0 · 10 ⁻⁴	9,9	15

*Sinkki-ionien kokonaispitoisuus.

Jos käytetään vahvempaa sinkkikompleksinmuodostavaa ainetta, esim. sitruunahappoa, tarvitaan sinkin kokonaispitoisuus, joka on välillä n. 40 - 200 Zn²⁺/insuliiniheksameeri, merkittävän stabiloinnin saavuttamiseen (kts. seuraavaa taulukkoa II).

Kun sitruunahappoa käytetään kompleksinmuodostavana aineena, voidaan edullisin sinkin kokonaispitoisuus pH-arvolla 7,4 ilmaista millimoolleissa lausekkeella 0,004 x A + k x B, jossa A on insuliinin määrä kansainvälisinä yksikköinä

millilitraa kohti ja B on sitraattipitoisuus millimoolisissa. k-arvo on välillä 0,5-1,0, sopivamman k-arvon ollessa välillä n. 0,7-0,8.

Taulukko II

40 IU sikainsuliinia/ml liuoksessa, jossa on vaihtelevat sinkki- ja sitraattipitoisuudet ja joka on valmistettu esi-merkin 8 mukaisesti.

Sinkki- pitoisuus (M)	Zn ²⁺ insuliini- heksameeriä kohti*	Sitraattia (M)	Stabili- teetti- kerroin
1,0 · 10 ⁻⁴	2	10 ⁻²	1
0,6 · 10 ⁻²	150	10 ⁻²	6
0,8 · 10 ⁻²	200	10 ⁻²	10
0,9 · 10 ⁻²	225	10 ⁻²	10
0,95 · 10 ⁻²	238	10 ⁻²	19
1,0 · 10 ⁻⁴	2	2,0 · 10 ⁻³	1
1,6 · 10 ⁻³	40	2,0 · 10 ⁻³	6
1,8 · 10 ⁻³	45	2,0 · 10 ⁻³	30
2,0 · 10 ⁻³	50	2,0 · 10 ⁻³	19

* Sinkki-ionien kokonaispitoisuus.

Sinkkikompleksinmuodostavaa ainetta käytettäessä sinkin kokonaissisällön ylärajana on se määrä sinkkiä, joka aiheuttaa sinkki-insuliinikompleksin saostumisen, ts. kun kompleksinmuodostavaan aineeseen sitoutumattomien sinkki-ionien pitoisuus ylittää arvon n. 5 Zn²⁺/insuliiniheksameeri.

Myöhemmin selostettavaa stabiliteettikoetta voidaan käyttää varmistamaan, että lisättävät kompleksinmuodostavat aineet ja niiden suhteelliset määrät jättävät insuliinin käytettäväksi edullisen sinkki-ionipitoisuuden 4,2-4,5 Zn²⁺/insuliiniheksameeri. Sinkin kokonaispitoisuuden kompleksinmuodostavaa ainetta sisältävässä insuliiniliuoksessa voidaan odottaa olevan välillä 5-10 Zn²⁺/insuliiniheksameeri heikkoja kompleksinmuodostavia aineita käytettäessä ja välillä n. 10 - n. 200 Zn²⁺/insuliiniheksameeri vahvoja kompleksinmuodostavia aineita käytettäessä.

Stabiliteettikokeen lisäksi voidaan sinkin kokonaispitoisuuden ylärajaa, ts. sitä sinkkipitoisuutta, joka aiheuttaa sinkki-insuliinikompleksin saostumisen, käyttää sen kokonaissinkkimäärän määrittämiseen kompleksinmuodostavaa ainetta sisältävässä insuliiniliuoksessa, minkä avulla saavutetaan stabiliteetin huomattava lisääntyminen.

On osoittautunut, että sinkki-ionien kokonaismäärän kompleksinmuodostavaa ainetta sisältävässä insuliiniliuoksessa voidaan odottaa olevan n. 50 - n. 90 % siitä sinkki-ionien määrästä, joka tulisi aiheuttamaan sinkki-insuliinikompleksin saostumisen.

Sinkki-ionien kokonaismäärä on sopivimmin n. 60 - n. 90 % ja sopivimmin n. 75 - n. 90 % siitä sinkki-ionien määrästä, joka tulisi aiheuttamaan sinkki-insuliinikompleksien saostumisen.

Neutraalit insuliinivalmisteet, jotka sisältävät kompleksinmuodostavia aineita tai sinkin kanssa kompleksin muodostavia puskureita, ovat tunnettuja yllämainitusta tanskalaisesta patentista 116 527 ja tanskalaisesta patenttihakemuksesta 1851/80. Suurin mainittu sinkkisisältö on kuitenkin 1 % Zn laskettuna insuliinin kuivapainosta (kts. esimerkkejä 2 ja 6). Tässä patentissa on toistettu nämä kaksi esimerkkiä (kts. seuraavia esimerkkejä 9 ja 10). Niistä ilmenee, että näillä tunnetuilla valmisteilla stabiliteettikerroin on vastaavasti vain 3,5 ja 1.

Insuliinipitoisuus liuoksessa on sopivasti välillä 5-750 IU ja sopivimmin välillä 40-500 IU millilitraa kohti.

Tämä keksintö aikaansaa myös menetelmän sellaisten ennen tuntemattomien insuliiniliuosten valmistamiseksi, jotka soveltuvat käytettäväksi jatkuvassa insuliininannossa ollessaan fysikaalisesti stabiileja siinä vallitsevissa olosuhteissa ja jotka mahdollisesti käsittävät säilytysaineen,

liuoksen isotoniseksi tekevän aineen sekä puskurin, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että insuliiniliuokseen lisätään olennaisesti ionoitunutta sinkkisuolaa määrässä, joka vastaa insuliinin käytettävissä olevien sinkki-ionien pitoisuutta, joka on enemmän kuin $4 \text{ Zn}^{2+}/\text{insuliiniheksa-meri}$.

Keksinnön mukaisia insuliiniliuoksia voidaan valmistaa esimerkiksi liuottamalla kiteistä sinkki-insuliinia, esim. erittäin hyvin puhdistettua insuliinilaatua, kuten "monokomponenttista" insuliinia (kts. brittiläistä patenttijulkaisua 1 285 023), veteen hapon, esim. suolahapon läsnäollessa. Säilytysaineen, esim. fenolin tai alkyyylifenolin kuten kresolin tai metyyli parahydroksibentsoatin vesiliuos valmistetaan erikseen, ja se voi, jos niin halutaan, sisältää myös osmoottista painetta säätävää ainetta kuten glyserolia, sopivimmin määrässä, jonka on laskettu tekevän lopullisen liuoksen isotoniseksi, sekä (jos niin halutaan) sinkki-kompleksin muodostavaa ainetta kuten sitraattia tai glysiiniä. Tämä liuos lisätään happameen insuliiniliuokseen, johon sen jälkeen lisätään emästä, esim. natriumhydroksidiliuosta, pH-arvon saattamiseksi neutraaliksi. Tässä selityksessä neutraalilla pH-arvolla tarkoitetaan pH-arvoa, joka on välillä n. 7 - n. 8. Lasketut määrät sinkkisuolaa, esim. sinkkiasetaattia, esim. TRIS-puskuria (jos halutaan) ja sinkki-kompleksin muodostavaa ainetta voidaan lisätä tässä vaiheessa, minkä jälkeen pH-arvo säädetään uudelleen. Sinkkisuola voidaan vaihtoehtoisesti viedä happameen insuliiniliuokseen ennen sen neutralointia. Saatuun liuokseen lisätään lopuksi vettä laskettuun tilavuuteen saakka, minkä jälkeen liuos steriloidaan suodattamalla sekä siirretään steriileihin lääkepulloihin.

Stabiliteettikoe

Näin valmistetut insuliiniliuokset saatetaan stabiliteettikokeen alaiseksi joudutetuissa olosuhteissa seuraavalla tavalla:

Kumitulpalla varustettuja lääkepulloja (tilavuus 12,5 ml), joista kukin sisältää 10 ml koetetta, asetetaan pystyasentoon ravistusalustalle (Tyyppi 01 T623TBSH02, toimittanut HETO, Birkerød, Tanska), joka on kokonaan upotettu lämpötilassa $41^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ pidettyyn vesihauteeseen. Alusta saatetaan vaakasuoraan ravistusliikkeeseen, jonka taajuus on 100 kierr/min ja amplitudi 50 mm.

Koetteiden opalesenssi mitataan säännöllisin väliajoin nefelometrillä Fischer DRT 1000, joka on varustettu pitimellä lääkepulloja varten. Fibrilloitumisaika määritetään aikana, jonka kuluttua koetteen sameus saavuttaa arvon 10 nefelometristä sameusyksikköä (NTU).

Kukin koe suoritetaan käsittelemällä rinnakkain liuoskoetteita sekä kontrollikoetteita, joihin ei ole lisätty sinkkisuolaa, (4 tai 5 pulloa kumpaakin). Kontrollikoetteet vastaavat liuoskoetteita muuten, paitsi että ne sisältävät n. 2 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri, sinkkipitoisuuden niissä ollessa peräisin insuliinin kiteyttämisestä. Stabiliteettikerroin lasketaan liuoskoetteiden keskimääräisen fibrilloitumisajan ja kontrollikoetteiden vastaavan ajan suhteena.

Keksintöä selitetään yksityiskohtaisemmin seuraavassa viitaten oheisiin piirustuksiin, joissa

kuvio 1 esittää stabiliteettikerrointa lämpötilassa 41°C sinkki-ionipitoisuuden funktiona (100 IU sikainsuliinia/ml valmistettuna esimerkin 1 mukaan), ja

kuvio 2 esittää stabiliteettikerrointa lämpötilassa 41°C sinkki-ionien kokonaispitoisuuden funktiona heikon kompleksimuodostavan aineen läsnäollessa (40 IU sikainsuliinia/ml 10 mM glysiinimäärässä, valmistettuna esimerkin 7 mukaisesti).

Kuviosta 1 ilmenee, että insuliiniliuoksen stabiliteetti kasvaa voimakkaasti sinkki-ionipitoisuuden ollessa yli 4 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri.

Heikon kompleksinmuodostavan aineen läsnäollessa saavutetaan olennainen stabiliteetin lisäys suuremmalla sinkki-ionipitoisuudella, ts. pitoisuudella yli 5 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri, koska osa sinkistä sitoutuu kompleksinmuodostavaan aineeseen eikä siten ole insuliinin käytettävissä.

Muita keksinnön toteuttamiseen liittyviä yksityiskohtia ilmenee seuraavista esimerkeistä, joiden ei kuitenkaan pidä käsittää millään tavalla rajoittavan keksinnön suoja-alaa.

Esimerkeissä vesiliuokset ja vesi steriloidtiin, edellinen suodattamalla ja sen jälkeen työvaiheet suoritettiin aseptisissä olosuhteissa.

Esimerkki 1

100 IU sikainsuliinia/ml liuoksessa, joka sisältää $4,2 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliiniheksameeri.

Kiteistä monokomponenttista sikainsuliinia (264 mg), joka sisälsi 0,4 % sinkkiä ja jonka kokonaisaktiivisuus oli 10 000 IU, liuotettiin suolahappoa (325 μ l normaalista) sisältävään veteen (50 ml), minkä jälkeen lisättiin vesiliuos (25 ml), joka sisälsi 1,6 g glyserolia ja 200 mg fenolia. Liuoksen pH säädettiin arvoon 7,5 natriumhydroksidiliuoksen avulla. Sinkkiasetaattia (1,56 ml 10 mM liuosta) lisättiin, ja pH säädettiin jälleen arvoon 7,5 sekä kokonaistilavuus arvoon 100 ml vettä lisäämällä. Saatu liuos steriloidtiin suodattamalla, minkä jälkeen se siirrettiin aseptisesti lääkepulloihin (10 ml).

Stabiliteettikerroin: > 15.

Esimerkki 2

500 IU sikainsuliinia/ml liuoksessa, joka sisältää $4,2 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliiniheksameeri.

Kiteistä monokomponenttista sikainsuliinia (20,75 g), joka sisälsi 0,4 % sinkkiä ja jonka kokonaisaktiivisuus oli 550 000 IU, liuotettiin suolahappoa (10 ml normaalista) sisältävään veteen (550 ml).

Osaan (50 ml) tätä liuosta lisättiin sinkkiasetaattia (78 μ l molaarista liuosta) ja sen jälkeen 25 ml vesiliuosta, joka sisälsi 1,6 g glyserolia ja 200 mg fenolia. Liuoksen pH säädettiin arvoon 7,4 natriumhydroksidiliuoksen avulla ja sen kokonaistilavuus arvoon 100 ml vettä lisäämällä. Saatua liuos steriloidtiin suodattamalla ja siirrettiin sen jälkeen aseptisesti lääkepulloihin (10 ml).

Stabiliteettikerroin: 5.

Esimerkki 3

100 IU ihmisinsuliinia/ml liuoksessa, joka sisältää 4,3 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri.

Kiteistä monokomponenttista ihmisinsuliinia (1,67 g), joka sisälsi 0,4 % sinkkiä ja jonka kokonaisaktiivisuus oli 45 000 IU, liuotettiin suolahappoa (1,46 ml normaalista) sisältävään veteen (225 ml). Osaan (25 ml) tätä liuosta lisättiin sinkkiasetaattia (100 μ l 0,1-molaarista liuosta) ja sen jälkeen 10 ml vesiliuosta, joka sisälsi 0,8 g glyserolia ja 0,1 g fenolia. Liuoksen pH säädettiin arvoon 7,4 natriumhydroksidiliuoksen avulla ja sen tilavuus arvoon 50 ml vettä lisäämällä. Saatua liuos steriloidtiin suodattamalla ja siirrettiin sen jälkeen aseptisesti lääkepulloihin (10 ml).

Stabiliteettikerroin: 26.

Esimerkki 4

100 IU sikainsuliinia/ml liuoksessa, joka sisältää 4,5 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri.

Meneteltiin analogisesti esimerkin 1 kanssa, paitsi että lisättiin 1,89 ml 10 mM sinkkiasetaattiliuosta sinkki-ionipitoisuuden 4,5 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri aikaansaamiseksi.

Stabiliteettikerroin: > 33.

Esimerkki 5

40 IU ihmisinsuliinia/ml liuoksessa, joka sisältää 4,2 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri.

Kiteistä monokomponenttista ihmisinsuliinia (741 mg), joka sisälsi 0,4 % sinkkiä ja jonka kokonaisaktiivisuus oli 20 000 IU, liuotettiin suolahappoa (640 μ l normaalista) ja sinkkiasetaattia (3,96 ml 0,01-molaarista liuosta) sisältävään veteen (60 ml). 400 ml vesiliuosta, joka sisälsi 1 g fenolia ja 8 g glyserolia, lisättiin, minkä jälkeen liuoksen pH säädettiin arvoon 7,45 natriumhydroksidiliuoksen avulla ja sen tilavuus arvoon 500 ml vettä lisäämällä. Liuos steriloidittiin suodattamalla ja siirrettiin sen jälkeen aseptisesti lääkepulloihin (10 ml).

Stabiliteettikerroin: 34.

Esimerkki 6

100 IU ihmisinsuliinia/ml 10^{-2} -molaarisessa TRIS-puskuriliuoksessa, joka sisältää 4,2 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri.

Kiteistä monokomponenttista ihmisinsuliinia (1852 mg), joka sisälsi 0,4 % sinkkiä ja jonka kokonaisaktiivisuus oli 50 000 IU, liuotettiin suolahappoa (1600 μ l normaalista) ja sinkkiasetaattia (99 μ l molaarista) sisältävään veteen (60 ml). 400 ml vesiliuosta, joka sisälsi 1 g fenolia ja 8 g glyserolia, lisättiin, minkä jälkeen liuoksen pH säädettiin arvoon 7,45 TRIS-puskurilla (606 mg) ja natriumhydroksidiliuoksella sekä sen tilavuus arvoon 500 ml vettä lisäämällä. Saatu liuos steriloidittiin suodattamalla ja siirrettiin sen jälkeen aseptisesti lääkepulloihin (10 ml).

Stabiliteettikerroin: 16.

Esimerkki 7

40 IU sikainsuliinia/ml liuoksessa, joka on $2,6 \cdot 10^{-4}$ ja 10^{-2} -molaarinen vastaavasti sinkin ja glysiinin suhteen.

Kiteistä monokomponenttista sikainsuliinia (1,49 g), joka sisälsi 0,4 % sinkkiä ja jonka kokonaisaktiivisuus oli 40 000 IU, liuotettiin suolahappoa (1280 μ l normaalista) sisältävään veteen (120 ml), minkä jälkeen liuokseen lisättiin 730 ml vesiliuosta, joka sisälsi 2 g fenolia, 8 g glyserolia ja 751 mg glysiiniä. pH säädettiin arvoon 7,5

natriumhydroksidiliuoksen avulla. Sinkkiasetaattia (160 μ l molaarista liuosta) lisättiin, pH säädettiin jälleen arvoon 7,5 sekä liuoksen kokonaistilavuus arvoon 1000 ml vettä lisäämällä. Liuos steriloidittiin suodattamalla ja siirrettiin sen jälkeen aseptisesti lääkepulloihin (10 ml).

Stabiliteettikerroin: 63.

Esimerkki 8

40 IU sikainsuliinia/ml liuoksessa, joka on $1,8 \cdot 10^{-3}$ - ja $2 \cdot 10^{-3}$ -molaarinen vastaavasti sinkin ja sitraatin suhteen. Kiteistä monokomponenttista sikainsuliinia (746 mg), joka sisälsi 0,4 % sinkkiä ja jonka kokonaisaktiivisuus oli 20 000 IU, liuotettiin suolahappoa (640 μ l normaalista) sisältävään veteen (60 ml). 400 ml vesiliuosta, joka sisälsi 1 g fenolia ja 8 g glyserolia, lisättiin ja pH säädettiin arvoon 7,5 natriumhydroksidiliuoksella. Sitruunahappoa (210 mg monohydraattia) ja sinkkiasetaattia (850 μ l molaarista liuosta) lisättiin ja pH säädettiin jälleen arvoon 7,5. Liuos steriloidittiin suodattamalla ja siirrettiin sen jälkeen aseptisesti lääkepulloihin (10 ml).

Stabiliteettikerroin: 30.

Esimerkki 9 (vertailu)

40 IU nautainsuliinia/ml 13 mM natriumfosfaattiliuoksessa. (Sinkin kokonaissisältö 1 % $\sim 5,5 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliiniheksameeri). Tanskalaisen patenttijulkaisun 116 527 esimerkki 2 toistettiin. Sinkkipitoisuus asetettiin arvoon n. $5,5 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliiniheksameeri lisäämällä sinkkiasetaattia, ja pH säädettiin arvoon 6,91. Liuos steriloidittiin suodattamalla ja siirrettiin sen jälkeen aseptisesti lääkepulloihin (10 ml).

Stabiliteettikerroin: 3,5.

Esimerkki 10 (vertailu)

40 IU nautainsuliinia/ml 10 mM sitraattiliuoksessa. (Sinkin kokonaissisältö 1 % $\sim 5,5 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliiniheksameeri).

Tanskalaisen patenttijulkaisun 116 527 esimerkki 6 toistettiin. Sinkkipitoisuus asetettiin arvoon n. 5,5 Zn²⁺/insuliiniheksameeri lisäämällä sinkkiasetaattia ja pH säädettiin arvoon 7,5. Liuos steriloidittiin suodattamalla ja siirrettiin sen jälkeen aseptisesti lääkepulloihin (10 ml).

Stabiliteettikerroin: 1.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä sellaisen insuliiniliuoksen valmistamiseksi, jonka pH-arvo on säädetty välille 7 ja 8, ja joka soveltuu käytettäväksi jatkuvassa insuliiniannossa, koska se on fyysikaalisesti stabiili vallitsevissa olosuhteissa, ja joka mahdollisesti käsittää säilytysaineen, liuoksen isotoniseksi tekevän aineen, puskurin, sekä kompleksoivan aineen, tunnettu siitä, että mainittuun insuliiniliuokseen lisätään olennaisesti ionisoitunutta sinkkisuolaa sellaisessa määrässä, että insuliinin käytettävissä olevien sinkki-ionien pitoisuus tulee olemaan suurempi kuin 4 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että olennaisesti ionisoitunutta sinkkisuolaa lisätään sellaisessa määrässä, että insuliinin käytettävissä olevien sinkki-ionien pitoisuus tulee olemaan suurempi kuin 4 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri ja pienempi kuin $4,8 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliiniheksameeri.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että olennaisesti ionisoitunutta sinkkisuolaa lisätään sellaisessa määrässä, että insuliinin käytettävissä olevien sinkki-ionien pitoisuus tulee olemaan välillä $4,2 - 4,5 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliiniheksameeri.
4. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että sinkkisuolana on sinkkiasetaatti.
5. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, jossa liuokseen edelleen lisätään sinkkikompleksin muodostavaa ainetta, tunnettu siitä, että sinkin kokonaispitoisuus sovitetaan arvoon, joka on vähintään 5 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että sinkin kokonaispitoisuus sovitetaan arvoon, joka on vähintään 6 Zn^{2+} /insuliiniheksameeri.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että sinkkikompleksin muodostavana aineena käytetään glysiiniä tai sitruunahappoa.

8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että sinkin kokonaispitoisuus heikkoa kompleksinmuodostavaa ainetta käytettäessä sovitetaan alueelle, joka on välillä $5 - 8 \text{ Zn}^{2+}$ /insuliiniheksameeri.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en insulinlösning med pH-värde justerat mellan 7 och 8, och som lämpar sig för användning vid kontinuerlig insulindosering, då den är fysikaliskt stabil under rådande förhållanden, och som eventuellt innehåller ett konserveringsmedel, ett medel för att göra lösningen isotonisk, ett buffert, samt ett komplexbildande medel, kännetecknat av att till nämnda insulinlösning tillsättes ett i det väsentliga joniserat zinksalt i en sådan mängd, att koncentrationen av zinkjoner tillgängliga för insulin kommer att bli större än 4 Zn^{2+} /insulinhexamer.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, kännetecknat av att det i det väsentliga joniserade zinksaltet tillsättes i en sådan mängd, att koncentrationen av zinkjoner tillgängliga för insulin kommer att bli större än 4 Zn^{2+} /insulinhexamer och mindre än $4,8 \text{ Zn}^{2+}$ /insulinhexamer.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, kännetecknat av att det i det väsentliga joniserade zinksaltet tillsättes i en sådan mängd, att koncentrationen av zinkjoner tillgängliga för insulin kommer att bli mellan $4,2-4,5 \text{ Zn}^{2+}$ /insulinhexamer.

4. Förfarande enligt något av patentkraven ovan, kännetecknat av att som zinksalt används zinkacetat.
5. Förfarande enligt något av patentkraven ovan, vid vilket till lösningen vidare tillsättes ett zinkkomplexbildande medel, kännetecknat av att total zinkkoncentration inställes till ett värde, som är minst 5 Zn^{2+} /insulinhexamer.
6. Förfarande enligt patentkravet 5, kännetecknat av att total zinkkoncentration inställes till ett värde, som är minst 6 Zn^{2+} / insulinhexamer.
7. Förfarande enligt patentkravet 5, kännetecknat av att som zinkkomplexbildande medel används glysin eller citronsyra.
8. Förfarande enligt patentkravet 5, kännetecknat av att den totala zinkkoncentrationen vid användning av ett svagt komplexbildande medel inställes i området, som ligger mellan 5 och 8 Zn^{2+} /insulinhexamer.

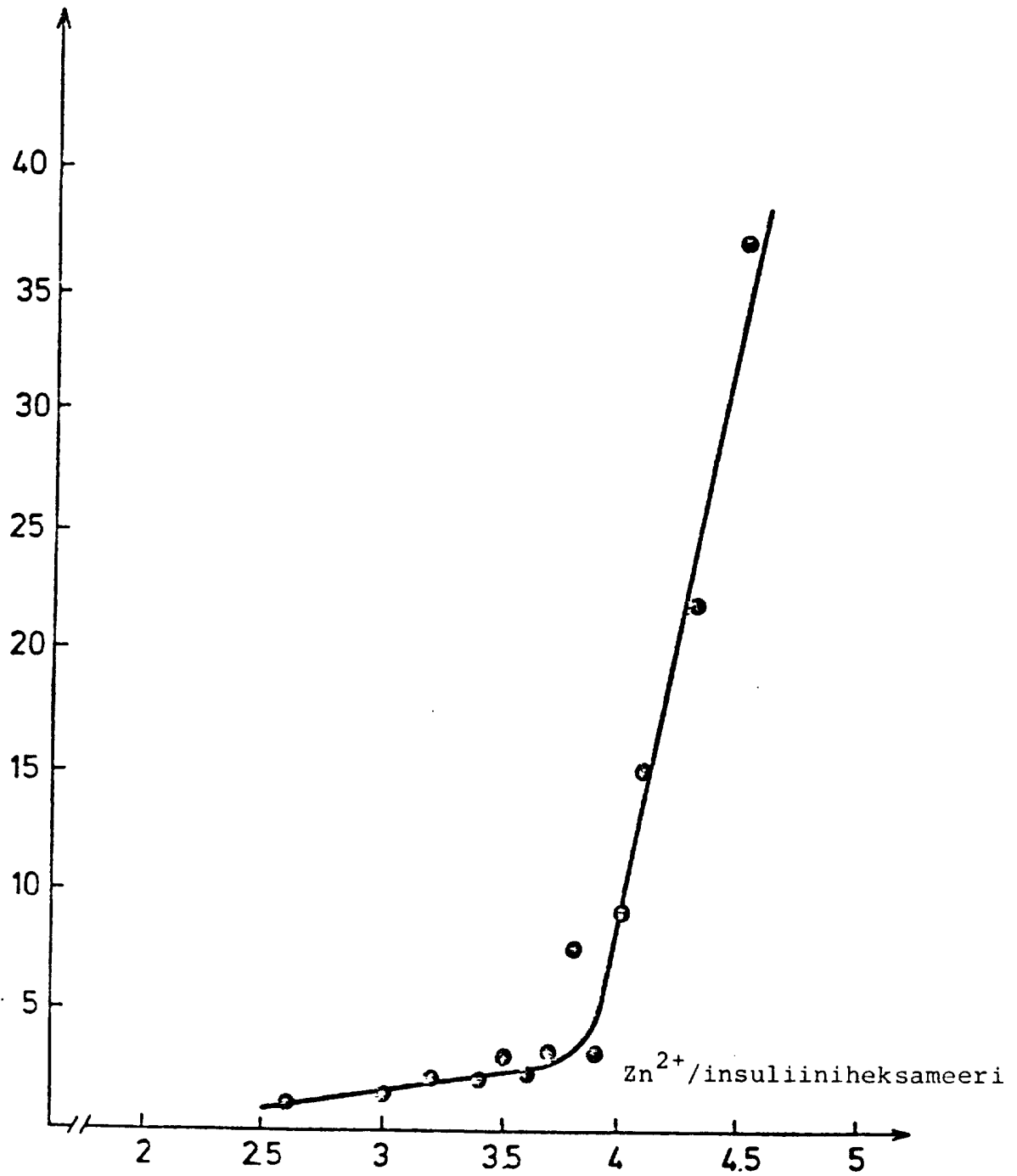
Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Iso-Britannia-Storbritannien(GB)
840 870 (A 61 K). USA(US) 3 091 573 (424-178), 3 584 121 (A 61 K 17/02).

K U V I O 1

100 IU sikainsuliinia/ml

Stabiliteettikerroin



78616

K U V I O 2

40 IU sikainsuliinia per ml 10 mM glysiinimäärässä

Stabiliteettikerroin

