

Винахід відноситься до хіміко-фармацевтичної промисловості і може бути використаним при виробництві рекомбінантних субстанцій інсуліну людини та готових лікарських форм на їх основі, у тому числі, пролонгованої дії з активністю 40 одиниць на мл (далі - 40МО/мл).

Для виробництва сучасних препаратів інсуліну як діючу речовину використовують свинячі субстанції інсуліну та субстанції інсуліну людини високого ступеня очищення [European Pharmacopoeia 2002, стор.1370-1380]. Це пов'язано з тим, що білкові домішки, зазвичай присутні в субстанціях інсулінів, які одержуються з підшлункових залоз тварин, напівсинтетичних та в біосинтетичних субстанціях інсуліну людини - проінсулін, ефіри інсуліну, високомолекулярні білки (димери та полімери інсуліну), деривати білків клітин хазяїна - мають антигенну активність та можуть викликати імуногенні пошкодження судин та внутрішніх органів у хворих на діабет [А.С. Ефимов, Н.А. Скробонская, С.Н. Ткач, Е.А. Сакало «Инсулинотерапия больных сахарным диабетом», Киев, Здоровье, 2000г., стр.28-30]. Для виробництва високоочищених субстанцій інсуліну у теперішній час широко використовують традиційні хроматографічні способи очищення: гель-проникаючу, іонообмінну та обернено-фазову хроматографію, а також їх комбінації [патент США №5621073 "Хроматографічний процес очищення інсуліну", 1997р.; Geoffrey B. Cox, Influence of Operating Parameters on the Preparative Gradient Elution Chromatography of Insulin, 3. Chromat., 1992, 195-203]. Гель-проникаючу хроматографію зазвичай використовують для очищення субстанцій інсуліну від високомолекулярних домішок. Недоліками способу являються невеликі питомі навантаження на колонку та низькі швидкості елювання, що робить процес очищення неефективним. Іонообмінну хроматографію використовують для очищення субстанцій інсуліну від інсулін-споріднених домішок, зокрема від дезамідоінсулінів. Недоліками цього способу є ті ж низькі питомі навантаження на сорбент та незадовільний відсоток виходу продукту. Обернено-фазову хроматографію використовують для очищення субстанцій інсулінів від проінсулінів, інсулін-споріднених домішок, дериватів білків клітин хазяїна для біосинтетичних інсулінів, залишкових кількостей протеолітичних ферментів, які використовуються для виробництва напівсинтетичних та біосинтетичних субстанцій інсуліну людини. Головні домішки в субстанціях інсуліну - це інсулін-споріднені сполуки, які мають мінімальні структурні відміни, і тому для їх відокремлення від головного продукту необхідно використовувати високоефективні сорбенти, а отже хроматографічні системи високого тиску. Тільки це дає можливість використовувати високі питомі навантаження на сорбент, забезпечує відповідну якість і вихід продукту та робить процес економічно ефективним.

Прототипом даного винаходу є спосіб очищення субстанції інсуліну людини обернено-фазовою хроматографією [E.P. Kroeff, R.A. Owens, at al. "Production Scale Purification of Biosynthetic Human Insulin by Resersed-Phase High-Performance Liquid Chromatography"], який включає розчинення субстанції інсуліну, врівноваження колонки, нанесення розчину субстанції інсуліну на хроматографічну колонку, наступного елювання субстанції інсуліну градієнтом та оцінки отриманих піків методом аналітичної ВЕРХ (високоефективної рідинної хроматографії). Як органічний модифікатор у рухомій фазі використовують ацетонітрил з градієнтом концентрації 15-30% та рН 3. Даний спосіб дозволяє одержати субстанцію інсуліну високої якості з виходом більш, ніж 75%, та з чистотою більш, ніж 97%. Але недоліками способу є низькі питомі навантаження на колонку (від 13 до 15мг на 1мл сорбенту), що робить процес очищення неефективним, та використання в якості органічного модифікатора у рухомій фазі ацетонітрилу, який має високу токсичність і дорогий коштує.

Відомі препарати інсуліну пролонгованої дії, в яких як діюча речовина використовувалась субстанція свинячого інсуліну, як пролонгатори іони цинку та протамінсульфат, як ізотонічний агент гліцерин, як консерванти м-крезол та фенол, як речовина з буферною ємністю натрій фосфорнокислий або оцтовокислий ["Современные гормональные средства", Киев, "Здоровье", 1994]. Але такі препарати містили велику кількість шкідливих для здоров'я людини домішок, які викликали небажані алергічні реакції та ускладнення. Більш досконалими та менш шкідливими були препарати, які як діючу речовину містили субстанцію інсуліну людини або аналоги цієї субстанції [наприклад, патент США №5547930, 1996 року "Кристалі інсуліну ASP^{B28}"]. Відомо, що якість готової лікарської форми визначається якістю очищення діючої речовини - субстанції інсуліну. Ця операція очищення також у значному ступені визначає витрати на виробництво та вихід готового продукту. Тому їй приділяється велика увага. Найбільш близькою до готової лікарської форми інсуліну людини пролонгованої дії, що заявляється, є готова лікарська форма інсуліну людини патентом України №50679. Вона містить як діючу речовину високоочищену традиційною хроматографією високого тиску субстанцію інсуліну людини, пролонгатори - протамінсульфат та цинку хлорид, ізотонічні агенти - гліцерин та натрію хлорид, консерванти - м-крезол та фенол, агент з буферною ємністю - натрій дигідрофосфат дигідрат або динатрійгідрофосфат гептагідрат і воду. Використання очищеної традиційною хроматографією високого тиску субстанції інсуліну людини дозволило одержати препарат високої якості з вмістом високомолекулярних білків 0,2 % та інсулін-споріднених сполук менше 2%, але при цьому понести значні витрати на сорбент та органічний модифікатор.

Завданням винаходу є поліпшення ефективності виробничого процесу, підвищення якості кінцевого продукту за рахунок отримання більш чистої субстанції інсуліну і зниження витрат на виробництво.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі модифікованого хроматографічного очищення субстанції інсуліну людини шляхом розчинення субстанції інсуліну у буферному розчині, врівноваження колонки, нанесення розчину субстанції інсуліну на хроматографічну колонку, наступного елювання градієнтом субстанції інсуліну та оцінки отриманих піків методом аналітичної ВЕРХ, у відповідності з винаходом як органічний модифікатор буферного розчину використовують пропанол або пропанол-2, рН розчину доводять до 2,4-2,6 і для розчинення субстанції інсуліну використовують концентрацію органічного модифікатора 13-14% об'ємних, а в готовій лікарській формі інсуліну людини пролонгованої дії, яка містить діючу речовину, пролонгатори, ізотонічні агенти, консерванти, агент з буферною ємністю і воду, у відповідності з винаходом як діючу речовину використовують субстанцію інсуліну людини, наприклад, очищену модифікованим хроматографічним способом, при наступному співвідношенні компонентів, г/л: високоочищена субстанція інсуліну людини - 1,35-1,64; протамінсульфат - 0,086-0,139; цинку хлорид - 0,0057-0,0084; гліцерин - 14,4-17,6; м-крезол - 1,26-1,54; фенол - 0,54-0,66; натрій дигідрофосфат дигідрат - 1,35-1,65; натрію хлорид - 0,54-0,66; вода - решта.

Внесені зміни, що заявляються, тобто: використання пропанолу або пропанолу-2 замість ацетонітрилу,

збільшення концентрації органічного модифікатора до 13-14% об'ємних та зниження значення рН розчину субстанції інсуліну у буфері до 2,4-2,6, зсувають рівновагу димер - мономер субстанції інсуліну в бік мономера, зменшують асоціацію субстанції інсуліну з інсулін-спорідненими домішками, знижують імовірність багатоточкової (необоротної) адсорбції субстанції інсуліну, механізм адсорбції в рамках конкуренція - синергізм зміщується в бік конкуренції. Внаслідок цього при нанесенні розчину субстанції інсуліну на хроматографічну колонку реалізується механізм фронтально-витискувальної хроматографії і формується первинний хроматографічний розподіл субстанції інсуліну по довжині колонки.

Вирішення поставленого авторами завдання ілюструється прикладами конкретного виконання.

Приклад 1. Процес модифікованого хроматографічного очищення субстанції інсуліну проводять за кімнатної температури. 450мг по технічній масі (414мг в перерахунок на суху речовину) субстанції інсуліну, яка містить 96,1% головної речовини, 1,8% дезамідо(А-21)інсуліну та 2,1% інсулін-споріднених домішок розчинюють в 25мл буферного розчину, який містить 0,25моль/л оцтової кислоти, 13,5 об'ємних відсотків пропанолу-2. Значення рН розчину субстанції інсуліну у рухомій фазі доводять розчином соляної кислоти з масовою долею 10% до 2,5. Отриманий розчин субстанції інсуліну фільтрують через мембранний фільтр Bio-Inert NRLG фірми Pall зі здатністю утримання 0,2мкм.

Хроматографічну колонку з внутрішнім діаметром 0,8см і довжиною 30,0см, яка упакована сферичним силікагелем С-18 з розміром часток 15мкм, з розміром пор 12нм врівноважують 45мл буферного розчину А наступного складу: 0,25моль/л кислоти оцтової, 10,0 об'ємних відсотків пропанолу-2. Процес очищення субстанції інсуліну ведуть на рідинному хроматографі високого тиску Gilson. Розчин інсуліну подають в хроматографічну колонку зі швидкістю потоку 1,0мл/хв. Потім колонку промивають 15мл буферного розчину А. Елювання субстанції інсуліну ведуть зі швидкістю потоку 1,0мл/хв. у лінійному градієнті концентрації пропанолу-2 від 12 до 18 об'ємних відсотків протягом 120 хвилин. Формування градієнту виконують автоматично шляхом змішування буферного розчину А та буферного розчину Б, який містить 0,25моль/л кислоти оцтової та 50,0 об'ємних відсотків пропанолу-2. Після закінчення градієнту сорбент у колонці регенерують 45мл буферного розчину Б. Елюат, який містить субстанцію інсуліну, розбивають на фракції об'ємом 3,0мл. Фракції аналізують за допомогою високоефективної рідинної хроматографії на вміст домішок. За результатами аналізів формують головну фракцію, яка містить 339,5мг субстанції інсуліну (35,0мл елюату з концентрацією інсуліну 9,7мг/мл) наступного складу: 98,9% головної речовини, 0,3% дезамідо(А-21)інсуліну, 0,8% інсулін-споріднених домішок. У розчин головної фракції за перемішування додають 30,0мл очищеної води, 0,34мл розчину цинку хлористого з масовою долею 10%, 2,3мл розчину кислоти лимонної з молярною концентрацією 1,5моль/л. За перемішування у розчин субстанції інсуліну додають розчин гідроксиду натрію з масовою долею 10,0% до значення рН 6,6. Розчин перемішують 90 хвилин. Потім розчином кислоти соляної з масовою долею 5,0% доводять значення рН до 5,9 і продовжують перемішування ще 240 хвилин, після чого одержані кристали субстанції інсуліну відокремлюють від маточного розчину фільтрацією через мембрану Ultipor N66 фірми Pall з розміром пор 0,8мкм. Кристали промивають 5,0мл очищеної води і ліофільно висушують. Одержують 363,5мг субстанції інсуліну (334,4мг в перерахунок на суху речовину) наступного складу: 98,8% головної речовини, 0,4% дезамідо(А-21)інсуліну, 0,8% інсулін-споріднених домішок. Вихід продукту складає 80,8%.

Приклад 2. Процес очищення проводять аналогічно прикладу 1, але збільшують навантаження по субстанції інсуліну: беруть 750мг по технічній масі субстанції інсуліну, яка містить 96,1% головної речовини, 1,8% дезамідо(А-21)інсуліну та 2,1% інсулін-споріднених домішок, та розчиняють у 42мл буферного розчину. Одержують 592,5мг субстанції інсуліну по технічній масі наступного складу: 97,9% головної речовини, 0,8% дезамідо(А-21)інсуліну, 1,3% інсулін-споріднених домішок. Вихід продукту складає 79,0%.

Приклад 3. Процес очищення проводять аналогічно прикладу 1, але беруть 450мг по технічній масі субстанції інсуліну-сирцю, яка містить 90,4% головної речовини, 3,5% дезамідо(А-21)інсуліну та 6,1% інсулін-споріднених домішок, та розчиняють у 42мл буферного розчину, який містить як органічний модифікатор пропанол. Одержують 334,0мг субстанції інсуліну по технічній масі наступного складу: 98,5% головної речовини, 0,6% дезамідо(А-21)інсуліну, 0,0% інсулін-споріднених домішок. Вихід продукту складає 74,2%.

Приклад 4. Процес очищення проводять аналогічно прикладу 1, але змінюють склад буферного розчину. Субстанцію інсуліну розчинюють в 25мл буферного розчину, який містить 0,25моль/л кислоти оцтової та 15 об'ємних відсотків пропанолу-2. Внаслідок цього при введенні розчину субстанції інсуліну на колонку спостерігають динамічний проскок, який містить 63,0мг субстанції інсуліну. Одержують 298,5мг субстанції інсуліну по технічній масі наступного складу: 98,9% головної речовини, 1,1% дезамідо(А-21)інсуліну, 0,9% інсулін-споріднених домішок. Вихід продукту складає 66,3%.

Приклад 5. Процес очищення проводять аналогічно прикладу 1, але змінюють склад буферного розчину. Субстанцію інсуліну розчинюють в 25мл буферного розчину, який містить 0,25моль/л кислоти оцтової та 12 об'ємних відсотків пропанолу. Одержують 360,5мг субстанції інсуліну по технічній масі наступного складу: 98,1% головної речовини, 0,7% дезамідо(А-21)інсуліну, 1,2% інсулін-споріднених домішок. Вихід продукту складає 77,8%.

Приклад 6. Процес очищення проводять аналогічно прикладу 1, але значення рН буферного розчину доводять до 3,0. Одержують 336,0мг субстанції інсуліну по технічній масі наступного складу: 97,0% головної речовини, 0,8% дезамідо(А-21)інсуліну, 1,8% інсулін-споріднених домішок. Вихід продукту 74,7%.

Приклад 7. 1,493г субстанції інсуліну людини, очищеної модифікованим хроматографічним способом, суспендували в 150мл води, потім за допомогою 1М НСІ рН суспензії довели до 3,1 для розчинення кристалів субстанції. 0,3127г протамінсульфату розчинили в 25мл води і довели рН розчину до 3,1, додаючи 1М НСІ. 0,008г цинку хлориду додали до розчину протамінсульфату. Потім змішали розчин субстанції інсуліну людини та розчин, який містив протамінсульфат і цинку хлорид.

Після цього приготували буферний розчин, який містив 1,5г натрійдигідрофосфату дигідрату, 1,4г м-крезолу, 0,6г фенолу, 16г гліцерину та 0,6г натрію хлориду в об'ємі 800мл та довели рН буферного розчину до 7,8, провели стерилізуючу фільтрацію і профільтрували туди суміш кислих розчинів субстанції інсуліну людини, протамінсульфату та цинку хлориду. Отриману суміш витримали при перемішуванні 18 годин за температури 18°C для одержання кристалічної суспензії готового лікарського препарату. Готовий препарат

розлили в асептичних умовах у флакони ємністю 10мл. Готовий препарат проаналізували методом аналітичної високоефективної рідинної хроматографії (методом ВЕРХ). Аналіз показав практичну відсутність інсуліну в супернатанті при загальному вмісті інсуліну 39,5МО/мл. Вміст високомолекулярних білків склав 0,15%, вміст інсулін-споріднених сполук 0,8%, А-21 дезамідоінсуліну 0,4%.

Приклад 8. 75% кристалічної долі готової лікарської форми готували, як в прикладі 7. 25% розчинної частини лікарської форми готували таким чином: 0,77г субстанції інсуліну людини, очищеної модифікованим хроматографічним способом, суспендували в 100мл води, за допомогою 1М НСІ довели рН до 3,1. В 230мл води приготували буферний розчин, який містив 0,875г натрій дигідрофосфату дигідрату, 0,35г м-крезолу, 0,15г фенолу, 4г гліцерину та 0,15г натрію хлориду. Буферний розчин змішали з розчином субстанції інсуліну, відкоригували рН одержаного розчину до 7,3 і провели стерилізуючу фільтрацію в ємність з кристалічною частиною готової лікарської форми. Суміш перемішували протягом 1 години і потім в асептичних умовах провели розлив.

Аналіз готового препарату таким же методом, як в прикладі 7, показав загальний вміст інсуліну людини 39,4МО/мл, вміст інсуліну в супернатанті 10МО/мл. Вміст високомолекулярних білків склав 0,13%, вміст інсулін-споріднених сполук 0,67%, вміст А-21 дезамідоінсуліну - 0,2%.

Аналіз наведених прикладів показує, що використання рішення, яке заявляється, дозволяє поліпшити ефективність хроматографічного розділення субстанції інсуліну та досягти виходу продукту 80%, тобто збільшити його на 5-6%, отримати чистоту субстанції інсуліну кращу за 98%, тобто поліпшити її якість, а за рахунок використання у якості органічного модифікатора пропанолу-2 або пропанолу замість ацетонітрилу збільшити питомі навантаження на 1мл сорбенту практично в два рази (до 25-30), а отже у два рази знизити витрати на сорбент та на 30% на органічний модифікатор, що безумовно позначається на собівартості готової лікарської форми інсуліну людини.