



(21) 申请号 202011088818.5

A61K 47/64 (2017.01)

(22) 申请日 2020.10.10

A61P 3/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114306577 A

(56) 对比文件

CA 2896375 A1, 2014.08.07

CN 105899190 A, 2016.08.24

(43) 申请公布日 2022.04.12

CN 108096185 A, 2018.06.01

(73) 专利权人 南京汉欣医药科技有限公司

地址 210046 江苏省南京市栖霞区仙林街

道仙林大学城纬地路9号C5栋

CN 108114270 A, 2018.06.05

CN 108778246 A, 2018.11.09

审查员 门思琦

(72) 发明人 王玮 贡光杰 陈松 张昊宁

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权

代理有限公司 23211

专利代理师 彭素琴

(51) Int. Cl.

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

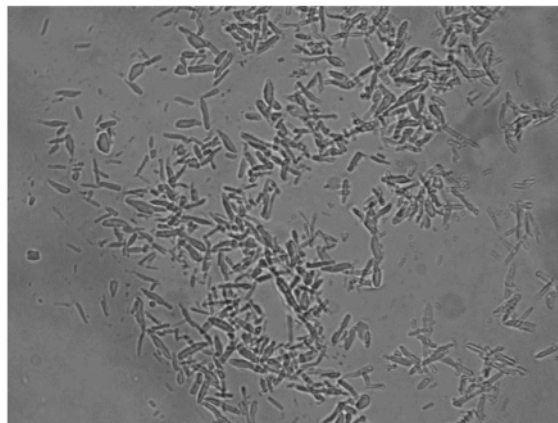
权利要求书1页 说明书11页 附图20页

(54) 发明名称

一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法,属于药物制剂领域。本发明利用剪切力较小的搅拌桨对门冬胰岛素的处方组成的混合物进行低速搅拌替代现有的静置结晶的方法,如锚式桨、螺旋桨、框式桨等,搅拌速度为40-80rpm、搅拌时间为12-18h,最终制备形成兼具速效与长效的门冬胰岛素30混悬液。本发明制备的门冬胰岛素混悬液贮存杂质含量较小、粒径均一稳定、贮存稳定性强、制备工艺简单、制备时间短且重复性高,适合工业化大生产。



1. 一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 取适量二水合磷酸氢二钠、氯化钠、甘油、苯酚、间甲酚与注射用水混合,搅拌至澄清,调节pH为8-10,得到溶液A;

(2) 取门冬胰岛素与硫酸鱼精蛋白、盐酸混合,搅拌至充分溶解,再与适量氯化锌、甘油、苯酚、注射用水混合,调节pH为2-3,得到溶液B;

(3) 将溶液A与溶液B混合,并调节pH为7.0-8.0,在15-25℃的结晶温度下,搅拌10-24 h 结晶,得到包含结晶的混悬液;

(4) 将上述包含结晶的混悬液与适量注射用水混合,得到门冬胰岛素30混悬液;或,

(i) 取适量二水合磷酸氢二钠、氯化钠、甘油、苯酚与注射用水混合,搅拌至澄清,调节pH为8-10,得到溶液A;

(ii) 取门冬胰岛素与硫酸鱼精蛋白、盐酸混合,搅拌至充分溶解,再与适量氯化锌、甘油、苯酚、注射用水混合,调节pH为2-3,得到溶液B;

(iii) 将溶液A与溶液B混合,调节pH为7.0-8.0,在15-25℃的结晶温度下,搅拌10-24 h 结晶,得到包含结晶的混悬液;

(iv) 将适量甘油、苯酚、间甲酚与注射用水混合,再加入上述包含结晶的混悬液,得到门冬胰岛素30混悬液;

所述搅拌过程中所使用的搅拌桨为锚式桨、螺旋桨、框式桨中的任一种;

所述的搅拌桨的搅拌速度为40-80rpm;

步骤(1)中,二水合磷酸氢二钠、氯化钠、甘油、苯酚、间甲酚的质量比为1.25:0.88:8:0.75:1.72;

步骤(2)中,门冬胰岛素、硫酸鱼精蛋白、氯化锌、甘油、苯酚的质量比为3.5:0.32:0.0196:8:0.75;

步骤(i)中,二水合磷酸氢二钠、氯化钠、甘油、苯酚的质量比为1.25:0.88:4:0.6;

步骤(ii)中,门冬胰岛素、硫酸鱼精蛋白、氯化锌、甘油、苯酚的质量比为3.5:0.32:0.0196:4:0.6。

2. 如权利要求1所述的一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法,其特征在于:所述的搅拌桨的搅拌速度为50-60rpm。

3. 如权利要求1所述的一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法,其特征在于:所述的结晶温度控制在22-25℃。

4. 如权利要求1所述的一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法,其特征在于:所述的结晶时间控制在12-18 h。

5. 如权利要求1所述的一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法,其特征在于:所述的溶液A与溶液B混合后的混合液的pH控制在7.2-7.4。

6. 如权利要求1~5任一项所述的一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法,其特征在于:门冬胰岛素30混悬液的处方中各物质的质量比依次为:二水合磷酸氢二钠:氯化钠:氯化锌:甘油:苯酚:间甲酚:硫酸鱼精蛋白:门冬胰岛素=1.25:0.88:0.0196:16:1.5:1.72:0.32:3.5。

7. 权利要求1~6任一项所述的一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法在制备治疗糖尿病的药物中的应用。

一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于药物制剂领域,具体涉及一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法。

背景技术

[0002] 糖尿病(Diabetes mellitus,DM)是一种常见的代谢性疾病。根据国际糖尿病联合会(IDF)于2014年发布的信息,目前全球糖尿病患者人数已超过3.87亿人,预计到2035年将会超过5.92亿人。临床上,将糖尿病主要可分为I型糖尿病(Type I diabetes mellitus,T1DM)和II型糖尿病(Type II diabetes mellitus,T2DM)。胰岛素是唯一可降低体内血糖的激素,当机体内胰岛 β 细胞损伤,体内胰岛素不足以起到调控血糖时,就需要补充外源性胰岛素。外源性胰岛素主要有动物胰岛素、重组人胰岛素以及胰岛素类似物。动物胰岛素由于原料来源受限,临床应用易发生交叉免疫反应;重组人胰岛素生产技术虽然成熟,但起效时间长,体内半衰期短,病人依从性较差。为了提高病人依从性,主要从药代动力学角度对人胰岛素结构进行修饰,研制出胰岛素类似物:①提高胰岛素半衰期,主要包括已上市的甘精胰岛素、地特胰岛素等;②加快起效时间,主要包括已上市的门冬胰岛素、赖脯胰岛素。

[0003] 门冬胰岛素(Insulin aspart),是一种新型胰岛素类似物,其结构特点及优势是通过基因工程手段将人胰岛素B链第28位脯氨酸改为天门冬氨酸,导致胰岛素单体聚合能力下降,有利于六聚体复合物快速解离,从而加快起效时间。但这与正常的生理性胰岛素分泌是不同的,正常生理性胰岛素包括餐后胰岛素和基础胰岛素,在餐后会出现胰岛素分泌的高峰,而其他时间段胰岛素处于相对平缓的范围内。为了模拟生理性胰岛素的分泌,在门冬胰岛素注射液处方中加入缓释剂硫酸鱼精蛋白,研制成门冬胰岛素30混悬液,即由部分可溶性速效胰岛素和部分与长效鱼精蛋白共结晶的门冬胰岛素组成,与人生理性胰岛素分泌基本相一致。

[0004] 现阶段关于胰岛素混悬液的制备专利主要包括以下内容:

[0005] 专利申请CN101035557A公开了一种包含结晶的门冬胰岛素和溶解的门冬胰岛素的药物制剂的制备方法,通过将酸性门冬胰岛素鱼精蛋白溶液与碱性的缓冲溶液混合形成悬浮液,然后静置形成结晶。该专利公开的结晶方法是通过静置得到的,但是并未明确结晶的温度、结晶时间、结晶pH值各个技术特征,同时该专利并未明确鱼精蛋白锌胰岛素晶体形态及如何制备才能得到粒径均一的晶体等相关信息。

[0006] 专利申请US5547930A公开的处方中没有添加氯化钠溶液,公开的结晶方法是先在20℃放置24h,然后在4℃静置6天才能实现完全结晶。同时该专利公开通过常规的制备方法,需要一周左右时间才能实现完全结晶,耗时非常长。

[0007] 专利CN1198643C公开了精蛋白门冬胰岛素液体制剂的制备方法,通过将碱性的缓冲溶液加入到酸性门冬胰岛素鱼精蛋白溶液中形成悬浮液,然后放置在28℃~32℃温度下,2天~6天以形成结晶。该温度较高,静置时间长,不利于工业化大生产。

[0008] 门冬胰岛素为蛋白质类药物,在长时间的热和物理机械应力作用下有发生凝聚的趋势,使高分子蛋白类杂质增加,生物活性下降。同时,物理机械应力作用使形成的结晶容

易破碎。因此现有技术结晶时为静置结晶,未使用长时间的搅拌结晶。但静置结晶时间较长,工艺能耗较大,而且会给制剂带来不希望的杂质。因此,急需寻找一种同时满足合适温度且静置时间短,工艺能耗小,所得的产品结晶度好,粒径均一,杂质少的新的制剂制备工艺。

发明内容

[0009] 为了克服现有技术中存在的上述问题,本发明的目的在于提供一种能同时满足合适温度且结晶时间短,工艺能耗小,所得的产品结晶度好,粒径均一,杂质少的新的门冬胰岛素30混悬液的制备工艺。

[0010] 为了实现上述目的,本发明提供如下第一种技术方案:一种门冬胰岛素30混悬液的制备方法,包括以下步骤:

[0011] (1) 取适量二水合磷酸氢二钠、氯化钠、甘油、苯酚、间甲酚与注射用水混合,搅拌至澄清,调节pH为8-10,得到溶液A;

[0012] (2) 取门冬胰岛素与硫酸鱼精蛋白、盐酸混合,搅拌至充分溶解,再与适量氯化锌、甘油、苯酚、注射用水混合,调节pH为2-3,得到溶液B;

[0013] (3) 将溶液A与溶液B混合,并调节pH为7.0-8.0,在15-25℃的结晶温度下,搅拌10-24h结晶,得到包含结晶的混悬液;

[0014] (4) 将上述包含结晶的混悬液与适量注射用水混合,得到门冬胰岛素30混悬液;或,

[0015] (i) 取适量二水合磷酸氢二钠、氯化钠、甘油、苯酚与注射用水混合,搅拌至澄清,调节pH为8-10,得到溶液A;

[0016] (ii) 取门冬胰岛素与硫酸鱼精蛋白、盐酸混合,搅拌至充分溶解,再与适量氯化锌、甘油、苯酚、注射用水混合,调节pH为2-3,得到溶液B;

[0017] (iii) 将溶液A与溶液B混合,调节pH为7.0-8.0,在15-25℃的结晶温度下,搅拌10-24h结晶,得到包含结晶的混悬液;

[0018] (iv) 将适量甘油、苯酚、间甲酚与注射用水混合,再加入上述包含结晶的混悬液,得到门冬胰岛素30混悬液。

[0019] 作为本发明的进一步改进,所述的搅拌过程中所使用的搅拌桨为剪切力较小的桨,包括锚式桨、螺旋桨、框式桨等。

[0020] 作为本发明的进一步改进,所述搅拌桨的搅拌速度控制在40-80rpm,优选为50-60rpm。

[0021] 作为本发明的进一步改进,所述的结晶温度控制在22-25℃。

[0022] 作为本发明的进一步改进,所述的结晶时间控制在12-18h。

[0023] 作为本发明的进一步改进,所述溶液A与溶液B混合后的混合液的pH控制在7.2-7.4。

[0024] 作为本发明的进一步改进,门冬胰岛素30混悬液的处方为任意现有公开的已知处方。

[0025] 作为本发明的进一步改进,门冬胰岛素30混悬液的处方中各物质的质量比依次为:二水合磷酸氢二钠:氯化钠:氯化锌:甘油:苯酚:间甲酚:硫酸鱼精蛋白:门冬胰岛素=

1.25:0.88:0.0196:16:1.5:1.72:0.32:3.5。

[0026] 作为本发明的进一步改进,步骤(1)中,二水合磷酸氢二钠、氯化钠、甘油、苯酚、间甲酚的质量比为1.25:0.88:8:0.75:1.72。

[0027] 作为本发明的进一步改进,步骤(2)中,门冬胰岛素、硫酸鱼精蛋白、氯化锌、甘油、苯酚的质量比为3.5:0.32:0.0196:8:0.75。

[0028] 作为本发明的进一步改进,上述步骤(1)中甘油与步骤(2)中甘油的质量比还可以为1:3~3:1;步骤(1)中苯酚与步骤(2)中苯酚的质量比还可以为1:3~3:1。

[0029] 作为本发明的进一步改进,步骤(i)中,二水合磷酸氢二钠、氯化钠、甘油、苯酚的质量比为1.25:0.88:4:0.6。

[0030] 作为本发明的进一步改进,步骤(ii)中,门冬胰岛素、硫酸鱼精蛋白、氯化锌、甘油、苯酚的质量比为3.5:0.32:0.0196:4:0.6。

[0031] 作为本发明的进一步改进,步骤(iv)中,甘油、苯酚、间甲酚的质量比为8:0.3:1.72。

[0032] 作为本发明的进一步改进,上述步骤(i)中甘油与步骤(ii)中甘油、步骤(iii)中甘油的质量比还可以为(1~3):(1~3):2;上述步骤(i)中苯酚与步骤(ii)中苯酚、步骤(iii)中苯酚的质量比还可以为(1~2):(1~2):(1~3)。

[0033] 本发明还提供了上述制备方法在制备治疗糖尿病的药物中的应用。

[0034] 本发明利用门冬胰岛素与硫酸鱼精蛋白作用形成结晶,形成门冬胰岛素30混悬液,与人生理性胰岛素分泌基本相一致。

[0035] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0036] 1.本发明制备的门冬胰岛素30混悬液的方法中,结晶温度较低、结晶时间短,结晶时间可缩短至10-24h,工艺能耗小;且制备得到的门冬胰岛素30混悬液杂质含量较小,提高了用药的安全性。

[0037] 2.本发明制备的门冬胰岛素30混悬液的过程中,选用低剪切力的搅拌桨,能形成良好的棒状结晶,所得棒状结晶相对现有制备得到的针状结晶结构更稳定,不易破碎;且本发明的悬浮液的结晶度较好,粒径均一稳定,在7-8 μm 之间,不同批次之间粒径波动范围不超过5%,符合皮下给药要求,提高了制剂的稳定性。

[0038] 3.本发明制备的门冬胰岛素30混悬液,工艺简单、重复性高,适合工业化大生产。

附图说明

[0039] 图1实施例1制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图。

[0040] 图2实施例2制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图。

[0041] 图3实施例3制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图。

[0042] 图4实施例4制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图。

[0043] 图5实施例5制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图。

[0044] 图6实施例6制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图。

[0045] 图7对比例1方法1制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图。

[0046] 图8对比例1方法2制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图。

[0047] 图9对比例1方法3制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图。

- [0048] 图10测定实施例1制备得到的门冬胰岛素30混悬液中有关物质的HPLC色谱图。
- [0049] 图11测定实施例2制备得到的门冬胰岛素30混悬液中有关物质的HPLC色谱图。
- [0050] 图12测定实施例3制备得到的门冬胰岛素30混悬液中有关物质的HPLC色谱图。
- [0051] 图13测定实施例4制备得到的门冬胰岛素30混悬液中有关物质的HPLC色谱图。
- [0052] 图14测定实施例5制备得到的门冬胰岛素30混悬液中有关物质的HPLC色谱图。
- [0053] 图15测定实施例6制备得到的门冬胰岛素30混悬液中有关物质的HPLC色谱图。
- [0054] 图16测定对比例1方法1制备得到的门冬胰岛素30混悬液中有关物质的HPLC色谱图。
- [0055] 图17测定对比例1方法2制备得到的门冬胰岛素30混悬液中有关物质的HPLC色谱图。
- [0056] 图18测定对比例1方法3制备得到的门冬胰岛素30混悬液中有关物质的HPLC色谱图。
- [0057] 图19测定实施例1制备得到的门冬胰岛素30混悬液中高分子量蛋白质的HPLC色谱图。
- [0058] 图20测定实施例2制备得到的门冬胰岛素30混悬液中高分子量蛋白质的HPLC色谱图。
- [0059] 图21测定实施例3制备得到的门冬胰岛素30混悬液中高分子量蛋白质的HPLC色谱图。
- [0060] 图22测定实施例4制备得到的门冬胰岛素30混悬液中高分子量蛋白质的HPLC色谱图。
- [0061] 图23测定实施例5制备得到的门冬胰岛素30混悬液中高分子量蛋白质的HPLC色谱图。
- [0062] 图24测定实施例6制备得到的门冬胰岛素30混悬液中高分子量蛋白质的HPLC色谱图。
- [0063] 图25测定对比例1方法1制备得到的门冬胰岛素30混悬液中高分子量蛋白质的HPLC色谱图。
- [0064] 图26测定对比例1方法2制备得到的门冬胰岛素30混悬液中高分子量蛋白质的HPLC色谱图。
- [0065] 图27测定对比例1方法3制备得到的门冬胰岛素30混悬液中高分子量蛋白质的HPLC色谱图。
- [0066] 图28搅拌速度大于80rpm时,所制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图。
- [0067] 图29搅拌速度低于40rpm时,所制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图。

具体实施方式

[0068] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。所以,在本发明的方法前提下,对本发明的简单改进,均属本发明要求保护的范围。

[0069] 实施例1

[0070] 1. 处方:

[0071] 表1门冬胰岛素30混悬液的处方

[0072]	处方成分	处方含量
	门冬胰岛素	35g
	甘油	160g
	苯酚	15g
	间甲酚	17.2g
	氯化锌	0.196g
	氯化钠	8.8g
	二水合磷酸氢二钠	12.5g
	硫酸鱼精蛋白	3.2g

[0073] 2. 溶液配制:

[0074] (1): 称取12.5g处方量二水合磷酸氢二钠, 8.8g处方量氯化钠, 80g甘油, 7.5g苯酚, 17.2g处方量间甲酚, 用4L注射用水溶解后搅拌至澄清, 调pH 9.8, 药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌, 得到溶液A, 将其加入配液罐中;

[0075] (2): 称取35g处方量门冬胰岛素, 3.2g处方量硫酸鱼精蛋白, 加入盐酸溶液溶解后, 再加入0.196g处方量氯化锌, 80g甘油, 7.5g苯酚, 用4L注射用水溶解后, 调pH 2.5, 药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌, 得到溶液B, 将其加入配液罐中;

[0076] (3): 将溶液A与溶液B搅拌混合均匀, 调节pH为7.3, 得到混合液; 将上述混合液用螺带桨在25 $^{\circ}$ C搅拌12h结晶, 控制搅拌速度为55rpm, 得到包含结晶的混悬液;

[0077] (4): 将上述包含结晶的混悬液补充注射用水至10L; 所得鱼精蛋白锌门冬胰岛素制品中, 经过高效液相色谱测定成品中的可溶性胰岛素含量可知, 溶解的门冬胰岛素与结晶的门冬胰岛素的重量比为30:70, 即说明制备得到了门冬胰岛素30混悬液。

[0078] 实施例2

[0079] 1. 处方同实施例1的处方一致。

[0080] 2. 溶液配制:

[0081] (i): 称取12.5g处方量二水合磷酸氢二钠, 8.8g处方量氯化钠, 40g甘油, 6g苯酚, 用2.5L注射用水溶解后搅拌至澄清, 调pH, 9.8, 药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌, 得到溶液A, 将其加入配液罐中;

[0082] (ii): 称取35g处方量门冬胰岛素, 3.2g处方量硫酸鱼精蛋白, 加入盐酸溶液溶解后, 再加入0.196g处方量氯化锌, 40g甘油, 6g苯酚, 然后用2.5L注射用水溶解后, 调pH 2.5, 药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌, 得到溶液B, 将其加入配液罐中;

[0083] (iii): 将溶液A与溶液B搅拌混合均匀, 调节pH为7.3, 得到混合液; 将上述混悬液用螺带桨在25 $^{\circ}$ C搅拌12h结晶, 控制搅拌速度为55rpm, 得到包含结晶的混悬液;

[0084] (iv): 称取80g甘油, 3g苯酚, 17.2g处方量间甲酚, 用5L注射用水溶解后, 加入上述包含结晶的混悬液中; 所得鱼精蛋白锌门冬胰岛素制品中, 经过测定可知, 溶解的门冬胰岛素与结晶的门冬胰岛素的重量比为30:70, 即说明制备得到了门冬胰岛素30混悬液。

[0085] 实施例1和实施例2的实验表明, 在搅拌速度、结晶温度和结晶时间等关键参数控制相同的情况下, 不同的辅料加料顺序对结果影响不大, 实施例1和2制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图具体见附图1-2, 可见两种悬浮液中均获得了棒状结晶。

[0086] 实施例3

[0087] 1. 处方同实施例1的处方一致。

[0088] 2. 溶液配制:

[0089] (1): 称取12.5g处方量二水合磷酸氢二钠, 8.8g处方量氯化钠, 80g甘油, 7.5g苯酚, 17.2g处方量间甲酚, 用4L注射用水溶解后搅拌至澄清, 调pH 9.5, 药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌, 得到溶液A, 将其加入配液罐中;

[0090] (2): 称取35g处方量门冬胰岛素, 3.2g处方量硫酸鱼精蛋白, 加入盐酸溶液溶解后, 再加入0.196g处方量氯化锌, 80g甘油, 7.5g苯酚, 用4L注射用水溶解后, 调pH 2.2, 药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌, 得到溶液B, 将其加入配液罐中;

[0091] (3): 将溶液A与溶液B搅拌混合均匀, 调节pH为7.2, 得到混合液; 将上述混合液用锚式桨在15 $^{\circ}$ C搅拌24h结晶, 控制搅拌速度为80rpm, 得到包含结晶的混悬液;

[0092] (4): 将上述包含结晶的混悬液补充注射用水至10L; 所得鱼精蛋白锌门冬胰岛素制品中, 经过测定可知, 溶解的门冬胰岛素与结晶的门冬胰岛素的重量比为30:70, 即说明制备得到了门冬胰岛素30混悬液。

[0093] 实施例4

[0094] 1. 处方同实施例1的处方一致。

[0095] 2. 溶液配制:

[0096] (1): 称取12.5g处方量二水合磷酸氢二钠, 8.8g处方量氯化钠, 80g甘油, 7.5g苯酚, 17.2g处方量间甲酚, 用4L注射用水溶解后搅拌至澄清, 调pH 8.5, 药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌, 得到溶液A, 将其加入配液罐中;

[0097] (2): 称取35g处方量门冬胰岛素, 3.2g处方量硫酸鱼精蛋白, 加入盐酸溶液溶解后, 再加入0.196g处方量氯化锌, 80g甘油, 7.5g苯酚, 用4L注射用水溶解后, 调pH 2.7, 药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌, 得到溶液B, 将其加入配液罐中;

[0098] (3): 将溶液A与溶液B搅拌混合均匀, 调节pH为8.0, 得到混合液; 将上述混合液用螺带桨在20 $^{\circ}$ C搅拌15h结晶, 控制搅拌速度为40rpm, 得到包含结晶的混悬液;

[0099] (4): 将上述包含结晶的混悬液补充注射用水至10L; 所得鱼精蛋白锌门冬胰岛素制品中, 经过测定可知, 溶解的门冬胰岛素与结晶的门冬胰岛素的重量比为30:70, 即说明制备得到了门冬胰岛素30混悬液。

[0100] 实施例5

[0101] 1. 处方同实施例1的处方一致。

[0102] 2. 溶液配制:

[0103] (i): 称取12.5g处方量二水合磷酸氢二钠, 8.8g处方量氯化钠, 40g甘油, 6g苯酚, 用2.5L注射用水溶解后搅拌至澄清, 调pH 10.0, 药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌, 得到溶液A, 将其加入配液罐中;

[0104] (ii): 称取35g处方量门冬胰岛素, 3.2g处方量硫酸鱼精蛋白, 加入盐酸溶液溶解后, 再加入0.196g处方量氯化锌, 40g甘油, 6g苯酚, 用2.5L注射用水溶解后, 调pH 2.0, 药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌, 得到溶液B, 将其加入配液罐中;

[0105] (iii): 将溶液A与溶液B搅拌混合均匀, 调节pH为7.0, 得到混悬液; 将上述混悬液用锚式桨在22 $^{\circ}$ C搅拌18h结晶, 控制搅拌速度为60rpm, 得到包含结晶的混悬液;

[0106] (iv): 称取80g甘油, 3g苯酚, 17.2g处方量间甲酚, 用5L注射用水溶解后, 加入上述

包含结晶的混悬液中;所得鱼精蛋白锌门冬胰岛素制品中,经过测定可知,溶解的门冬胰岛素与结晶的门冬胰岛素的重量比为30:70,即说明制备得到了门冬胰岛素30混悬液。

[0107] 实施例6

[0108] 1. 处方同实施例1的处方一致。

[0109] 2. 溶液配制:

[0110] (i):称取12.5g处方量二水合磷酸氢二钠,8.8g处方量氯化钠,40g甘油,6g苯酚,用2.5L注射用水溶解后搅拌至澄清,调pH 8.0,药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌,得到溶液A,将其加入配液罐中;

[0111] (ii):称取35g处方量门冬胰岛素,3.2g处方量硫酸鱼精蛋白,加入盐酸溶液溶解后,再加入0.196g处方量氯化锌,40g甘油,6g苯酚,用2.5L注射用水溶解后,调pH 3.0,药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌,得到溶液B,将其加入配液罐中;

[0112] (iii):将溶液A与溶液B搅拌混合均匀,调节pH为7.4,得到混悬液;将上述混悬液用锚式桨在24 $^{\circ}$ C搅拌10h结晶,控制搅拌速度为50rpm,得到包含结晶的混悬液;

[0113] (iv):称取80g甘油,3g苯酚,17.2g处方量间甲酚,用5L注射用水溶解后,加入上述包含结晶的混悬液中;所得鱼精蛋白锌门冬胰岛素制品中,经过测定可知,溶解的门冬胰岛素与结晶的门冬胰岛素的重量比为30:70,即说明制备得到了门冬胰岛素30混悬液。

[0114] 实施例3至实施例6的实验结果表明,控制合适的搅拌速度、结晶温度和结晶时间等关键参数,均可在短时间内可以得到粒径均一稳定的棒状结晶,实施例3和6制备得到的门冬胰岛素30混悬液的结晶图具体见附图3-6,可见两种悬浮液中均获得了棒状结晶,且肉眼可见结晶大小均匀。

[0115] 对比例1

[0116] 1. 处方同实施例1的处方一致。

[0117] 2. 制备方法

[0118] 方法1:按照专利CN101035557B的方法制备

[0119] a):称取12.5g处方量二水合磷酸氢二钠,8.8g处方量氯化钠,80g甘油,7.5g苯酚,17.2g间甲酚,用4L注射用水溶解后搅拌至澄清,调pH 2.5,药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌,得到溶液A,将其加入配液罐中;

[0120] b):称取35g处方量门冬胰岛素,3.2g处方量硫酸鱼精蛋白,加入盐酸溶液溶解后,再加入0.196g处方量氯化锌,80g甘油,7.5g苯酚,用4L注射用水溶解后,调pH 9.8,药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌,得到溶液B,将其加入配液罐中;

[0121] c):将溶液A与溶液B搅拌混合均匀,调节pH为7.3,得到混合液;

[0122] d):将上述混合液在25 $^{\circ}$ C直接静置30h,没有使用额外的搅拌桨进行搅拌,得到包含结晶的混悬液;

[0123] e):将上述包含结晶的混悬液补充注射用水至10L;所得鱼精蛋白锌门冬胰岛素制品中,溶解的门冬胰岛素与结晶的门冬胰岛素的重量比为30:70。

[0124] 方法2:按照专利申请US5547930A方法制备

[0125] a):称取12.5g处方量二水合磷酸氢二钠,8.8g处方量氯化钠,80g甘油,7.5g苯酚,17.2g间甲酚,用4L注射用水溶解后搅拌至澄清,调pH 2.5,药液过0.22 μ m滤膜过滤除菌,得到溶液A,将其加入配液罐中;

[0126] b):称取35g处方量门冬胰岛素,3.2g处方量硫酸鱼精蛋白,加入盐酸溶液溶解后,再加入0.196g处方量氯化锌80g甘油,7.5g苯酚,用4L注射用水溶解后,调pH 9.8,药液过0.22 μm 滤膜过滤除菌,得到溶液B,将其加入配液罐中;

[0127] c):将溶液A与溶液B搅拌混合均匀,调节pH为7.3,得到混合液;

[0128] d):将上述混悬液先在20 $^{\circ}\text{C}$ 放置24h,然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 静置6天结晶,得到包含结晶的混悬液;

[0129] e):将上述包含结晶的混悬液补充注射用水至10L;所得鱼精蛋白锌门冬胰岛素制品中,溶解的门冬胰岛素与结晶的门冬胰岛素的重量比为30:70。

[0130] 方法3:按照专利CN1198643C方法制备

[0131] a):称取12.5g处方量二水合磷酸氢二钠,8.8g处方量氯化钠,80g甘油,7.5g苯酚,17.2g间甲酚,用4L注射用水溶解后搅拌至澄清,调pH 2.5,药液过0.22 μm 滤膜过滤除菌,得到溶液A,将其加入配液罐中;

[0132] b):称取35g处方量门冬胰岛素,3.2g处方量硫酸鱼精蛋白,加入盐酸溶液溶解后,再加入0.196g处方量氯化锌,80g甘油,7.5g苯酚,用4L注射用水溶解后,调pH 9.8,药液过0.22 μm 滤膜过滤除菌,得到溶液B,将其加入配液罐中;

[0133] c):将溶液A与溶液B搅拌混合均匀,调节pH为7.3,得到混合液;

[0134] d):将上述混悬液在30 $^{\circ}\text{C}$ 静置4d结晶,没有使用额外的搅拌桨进行搅拌,得到包含结晶的混悬液;

[0135] e):将上述包含结晶的混悬液补充注射用水至10L;所得鱼精蛋白锌门冬胰岛素制品中,溶解的门冬胰岛素与结晶的门冬胰岛素的重量比为30:70。

[0136] 通过显微镜放大125X 10倍检查法检查实施例1-6以及对比例方法1-3所得产品的结晶形状,结晶图分别如图1-9所示。结晶形态的具体结果见表2。

[0137] 采用新帕泰克激光粒度检测仪HELOS检测实施例1-6,对比例方法1-3所得产品的粒度。

[0138] 1) 仪器参数设置

[0139] 产品真密度 1.0005g/cm³

[0140] 数据处理模式 FREE

[0141] 镜头 R2:0.25/0.45...87.5 μm

[0142] 背景检测时间 50s

[0143] 2) 实际检测的触发条件设定

[0144] Start:button、Valid:always、Stop:50s real time

[0145] Time base:100.0ms

[0146] 3) 检测及结果:

[0147] 取40mL分散介质于留样池中,进行背景检测,分散介质背景应无干扰。取样品溶液80 μL 至盛有40mL分散介质的留样池中进行检测。具体如下表2所示。

[0148] 表2:实施例1~6和对比例1制备得到的悬浮液的结晶形态及粒度对比表

对比项目	附图	结晶形态	粒径(μm)
实施例1	图1	完全结晶,棒状结晶	7.35
实施例2	图2	完全结晶,棒状结晶	7.26

实施例3	图3	完全结晶,棒状结晶	7.33
实施例4	图4	完全结晶,棒状结晶	7.71
实施例5	图5	完全结晶,棒状结晶	7.61
实施例6	图6	完全结晶,棒状结晶	7.87
对比例方法1	图7	有局部无定形沉淀,形成细小棒状结晶	5.33
对比例方法2	图8	有较多无定形沉淀,形成针状细长结晶	4.15
对比例方法3	图9	有少量无定形沉淀,形成的较小棒状结晶	5.68

[0150] 由表1可见,实施例1-6的方法均能形成良好的棒状结晶,所得棒状结晶相对针状结晶的结构更稳定,不易破碎;且平均粒径均在7-8 μm 之间,明显大于对比例的粒径,且不同批次之间平均粒径波动范围不超过5%,说明本发明制备方法稳定。对比例1的静置结晶的3种方法或多或少存在一些无定形沉淀,无法全部形成棒状的结晶,粒径在4.15-5.68 μm 之间。因此本发明提供的制备方法可以在短时间内得到粒径均一稳定的结晶形态,提高了制剂的稳定性。

[0151] 另外通过高效液相色谱法测定各实施例1-6和对比例1-3的杂质情况,具体如图10-图18所示,其中主峰含量、B28门冬胰岛素异构体(或B28异门冬胰岛素)、脱酰胺门冬胰岛素杂质、其它有关物质(或其它杂质)的含量可以直接从HPLC图谱中得到,汇总如表3所示。

[0152] 表3:杂质对比表

对比项目	附图	主峰	B28 门冬胰岛素异构体	脱酰胺门冬胰岛素	其它有关物质
实施例 1	图 10	99.06	0.15	0.47	0.32
实施例 2	图 11	99.05	0.16	0.46	0.33
实施例 3	图 12	99.01	0.16	0.50	0.34
实施例 4	图 13	98.98	0.16	0.51	0.35
实施例 5	图 14	98.99	0.16	0.52	0.33
实施例 6	图 15	99.11	0.16	0.41	0.33
对比例方法 1	图 16	98.35	0.35	0.95	0.35
对比例方法 2	图 17	99.00	0.15	0.51	0.35
对比例方法 3	图 18	97.42	0.93	1.02	0.63

[0153] 由表2可见,实施例1-6有关物质的含量与对比例方法2相当,说明我们的制备条件,特别是在15-25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下选用低剪切力的搅拌桨,相对未用搅拌桨的常温结合低温的静置结晶方法,没有额外增加新的杂质种类和杂质含量,且结晶时间明显缩短,缩短至24h及以内;实施例1-6的杂质含量均小于对比例方法1和3制备的制剂,说明我们的制备条件,特别是在15-25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下选用低剪切力的搅拌桨,相比于25 $^{\circ}\text{C}$ 30h静置结晶或者温度高达30 $^{\circ}\text{C}$ 的静置结晶方法,杂质含量明显减少。因此,本发明提供的制备方法可以降低门冬胰岛素混悬液的杂质,从而提高用药安全性。

[0154] 通过高效液相色谱法测定各实施例1-6和对比例1-3的高分子量蛋白质的含量情况,具体如图19-图20所示,其中高分子量蛋白质的含量也是利用HPLC方法得到,汇总如表4所示。

[0155] 表4:实施例1~6和实施例1制备得到的悬浮液中高分子量蛋白质对比表

[0157]	对比项目	附图	主峰	高分子量蛋白质
	实施例1	图19	99.90	0.10
	实施例2	图20	98.89	0.11
	实施例3	图21	99.90	0.10
	实施例4	图22	98.89	0.11
	实施例5	图23	98.89	0.11
	实施例6	图24	99.90	0.10
	对比例方法1	图25	99.77	0.23
	对比例方法2	图26	99.87	0.13
	对比例方法3	图27	99.64	0.36

[0158] 由表4可见,实施例1-6高分子量蛋白质与对比例方法2相当,说明我们的制备条件,特别是在15-25℃的条件下选用低剪切力的搅拌桨,相对未用搅拌桨的常温结合低温的静置结晶方法,没有额外增加高分子量蛋白质的含量,且结晶时间明显缩短;实施例1-6有关物质及高分子杂质均小于对比例方法1和3制备的制剂,说明我们的制备条件,特别是在15-25℃的条件下选用低剪切力的搅拌桨,相比于25℃30h静置结晶或者温度高达30℃的静置结晶方法,高分子量蛋白质的含量明显减少。因此本发明提供的制备方法可以降低门冬胰岛素混悬液的高分子量蛋白质的含量,从而提高用药安全性。

[0159] 实施例1-6所得产品在2-8℃放置1-3个月均较稳定,杂质变化不大,具体贮存稳定性如下表5所示:

[0160] 表5:实施例1-6产品的贮存稳定性

	贮存时间	B28 门冬胰岛素 异构体	脱酰胺门冬胰 岛素	其它有关物 质	高分子蛋白 含量
实施例 1	0 天	0.15	0.47	0.32	0.10
	1 月	0.19	0.54	0.47	0.22
	3 月	0.35	0.62	0.53	0.37
实施例 2	0 天	0.16	0.46	0.33	0.11
	1 月	0.18	0.53	0.45	0.24
	3 月	0.35	0.61	0.54	0.39
实施例 3	0 天	0.16	0.50	0.34	0.10
	1 月	0.18	0.55	0.44	0.25
	3 月	0.35	0.63	0.54	0.38
实施例 4	0 天	0.16	0.51	0.35	0.11
	1 月	0.19	0.56	0.45	0.23
	3 月	0.35	0.62	0.53	0.38
实施例 5	0 天	0.16	0.52	0.33	0.11
	1 月	0.20	0.57	0.44	0.25
	3 月	0.35	0.63	0.53	0.36
实施例 6	0 天	0.16	0.41	0.33	0.10
	1 月	0.19	0.52	0.45	0.25
	3 月	0.36	0.62	0.53	0.36

[0162] 此外,本发明研究发现,当搅拌速度大于80rpm时,结晶效果较差,结晶大多为细小晶体,如图28所示;当搅拌速度过小,低于40rpm时,则存在较多门冬胰岛素未形成结晶,且结晶均匀性较差,如图29所示。

[0163] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范

围应该以权利要求书所界定的为准。

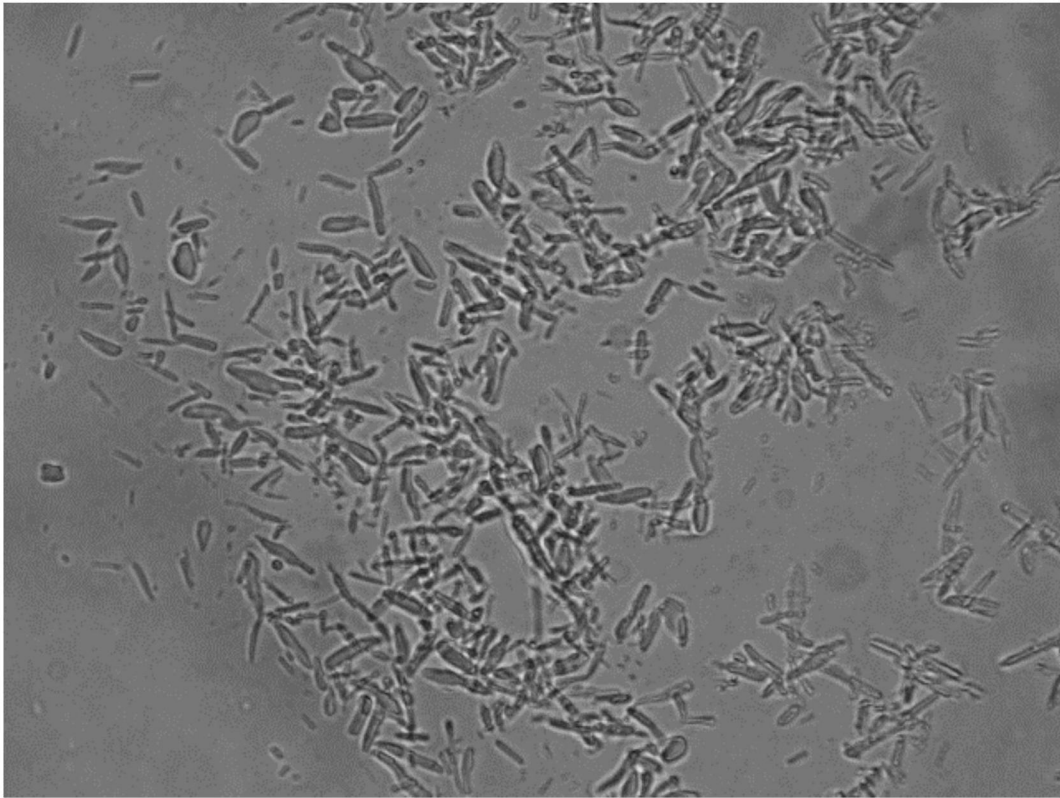


图1

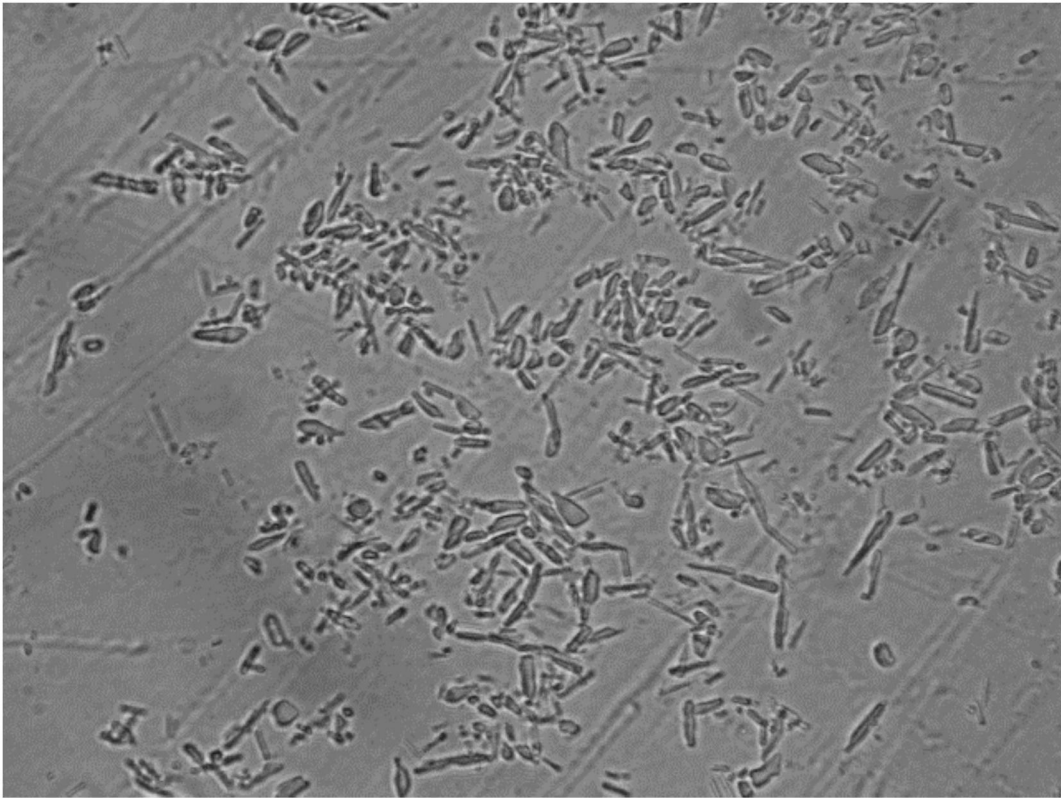


图2

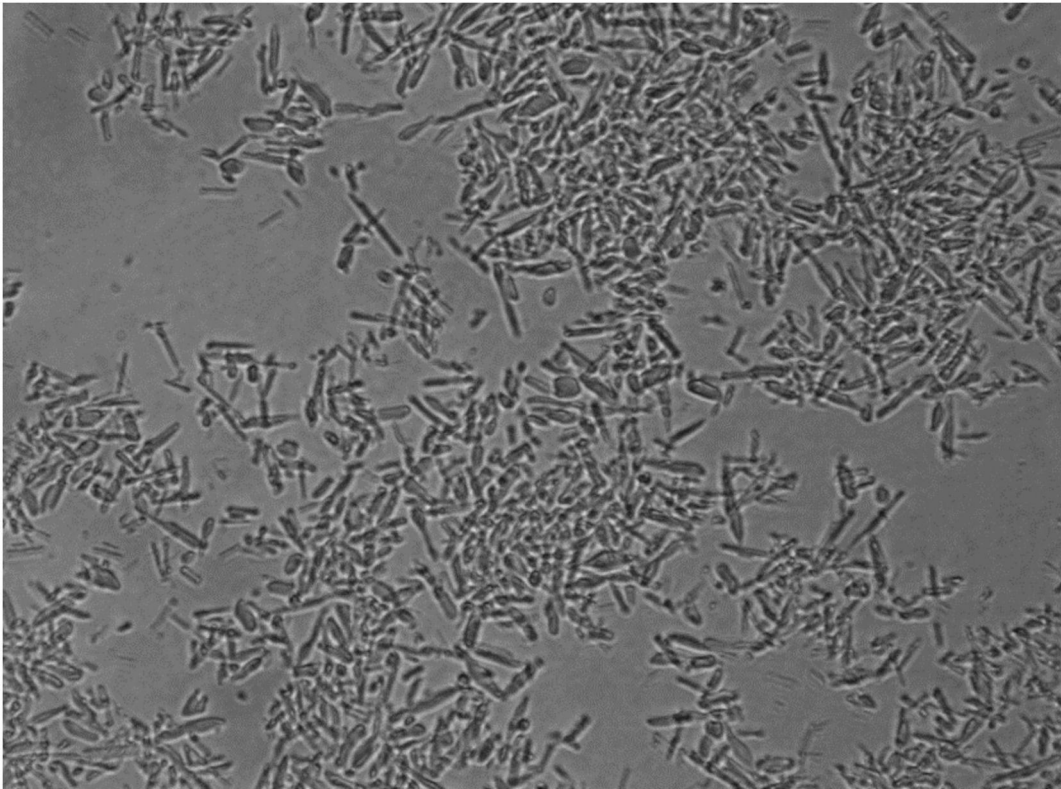


图3

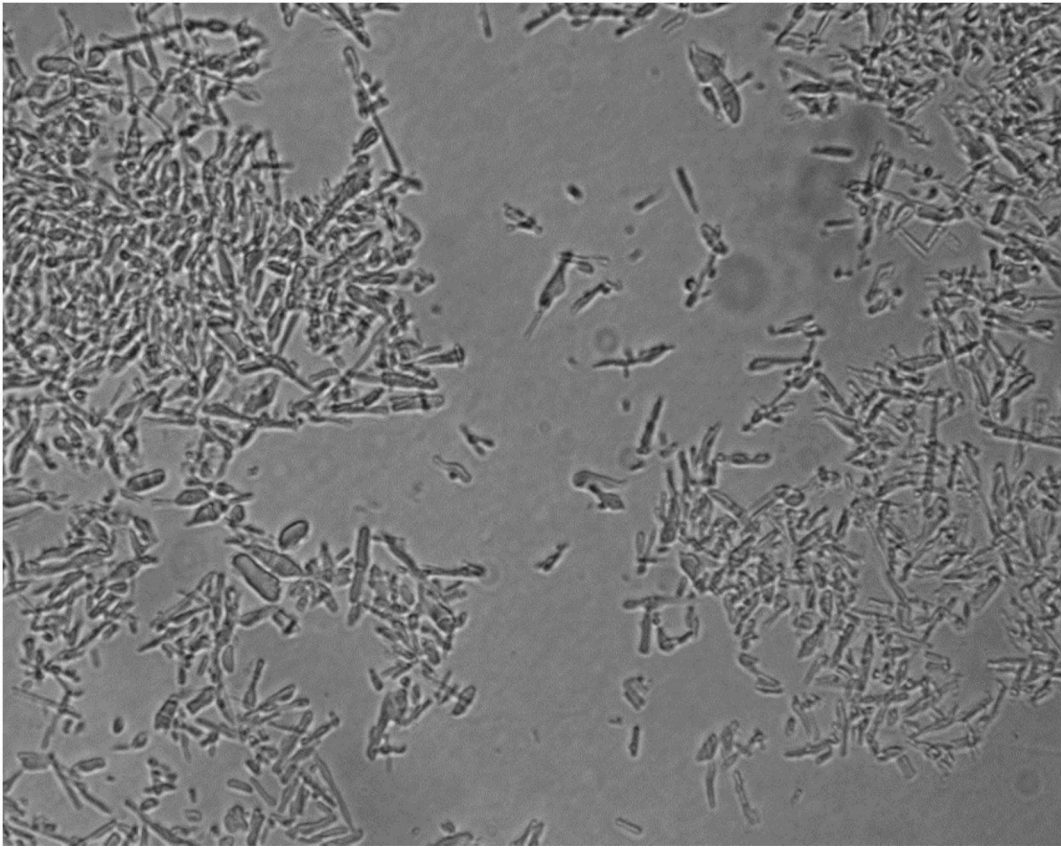


图4

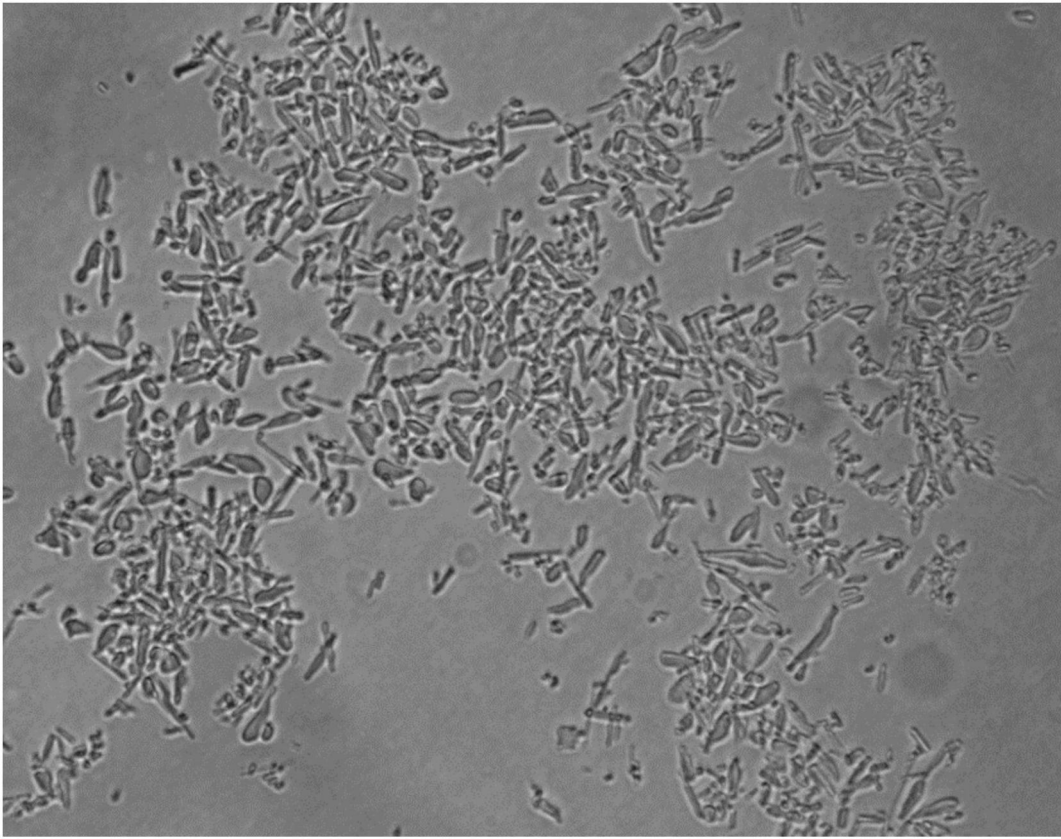


图5

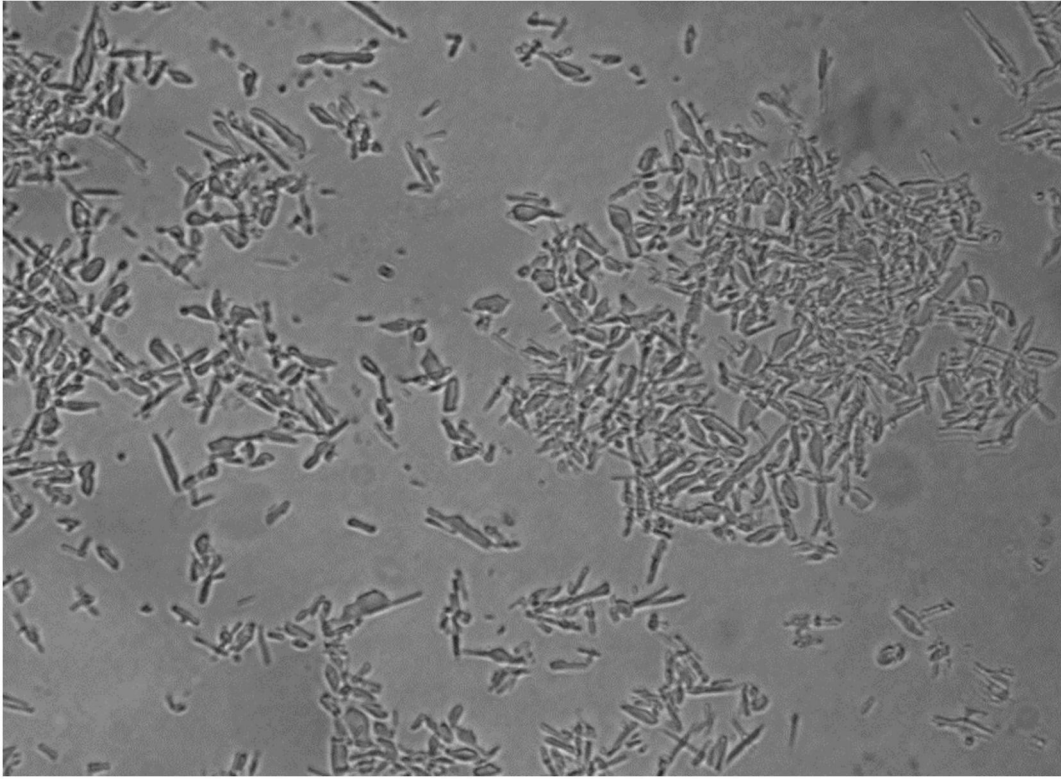


图6

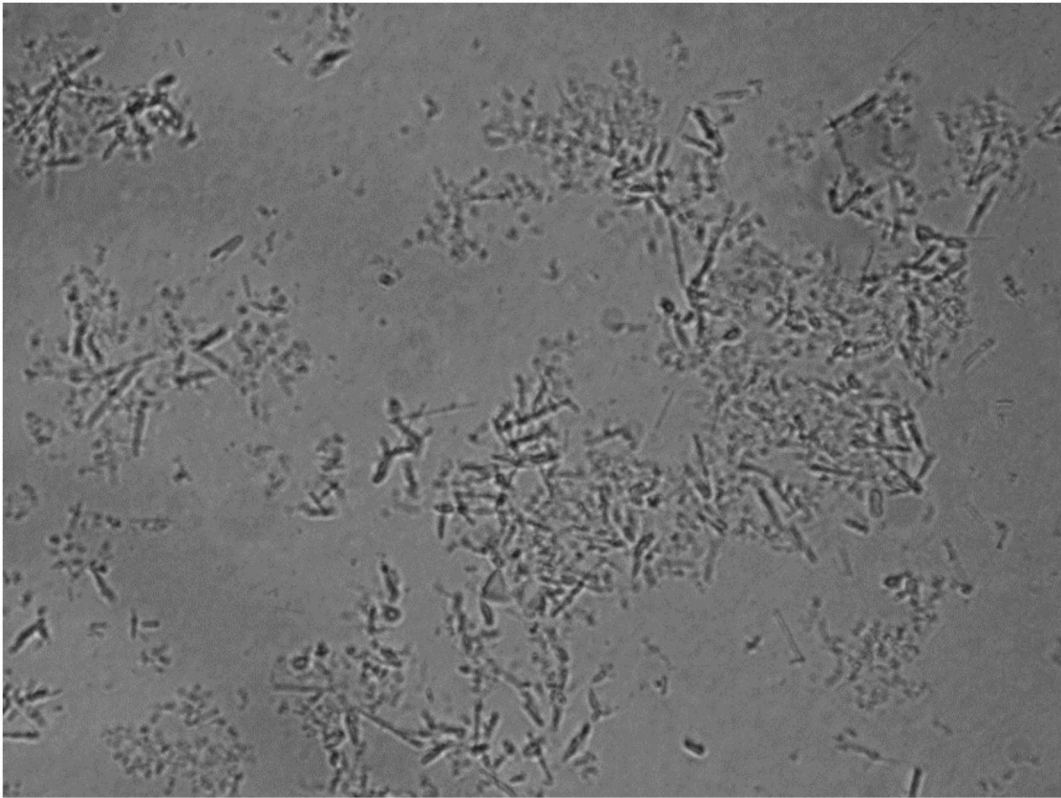


图7

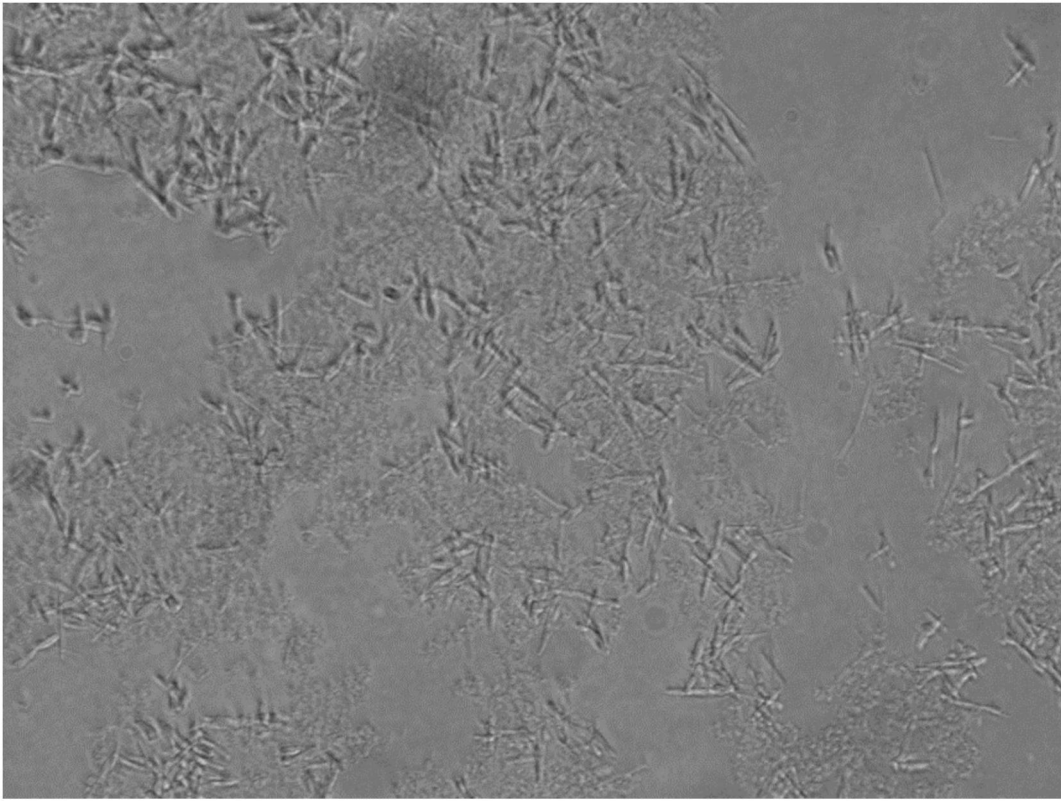


图8

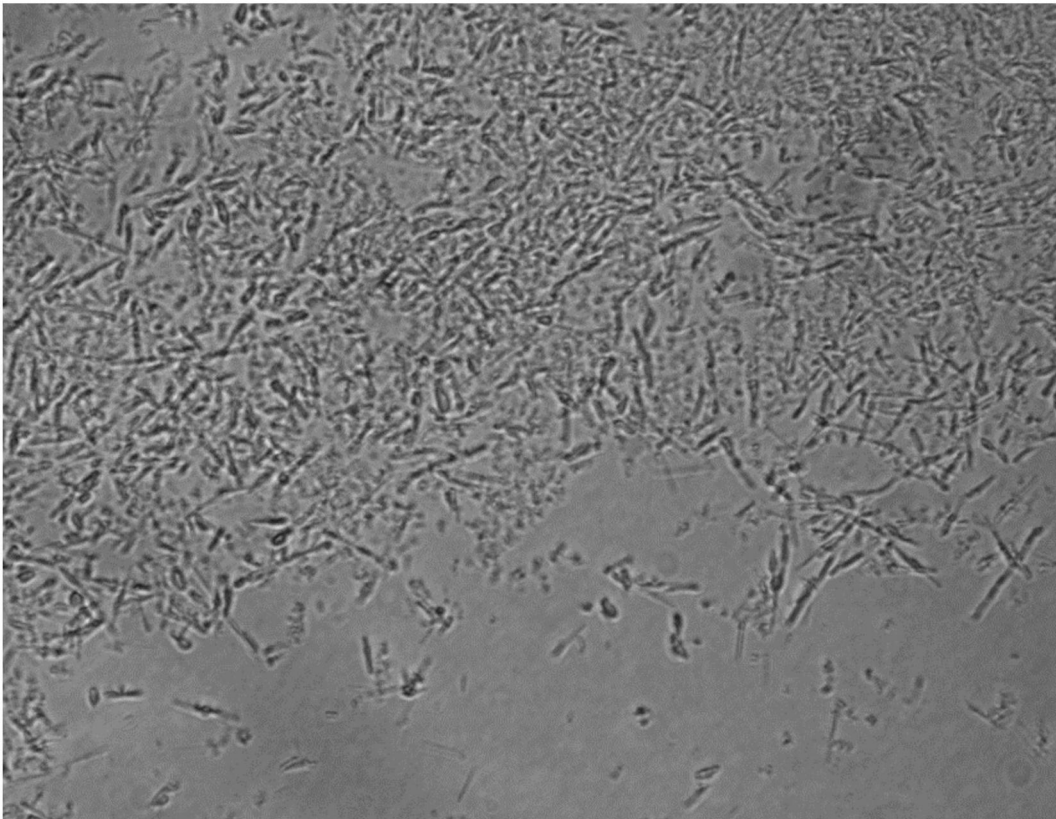
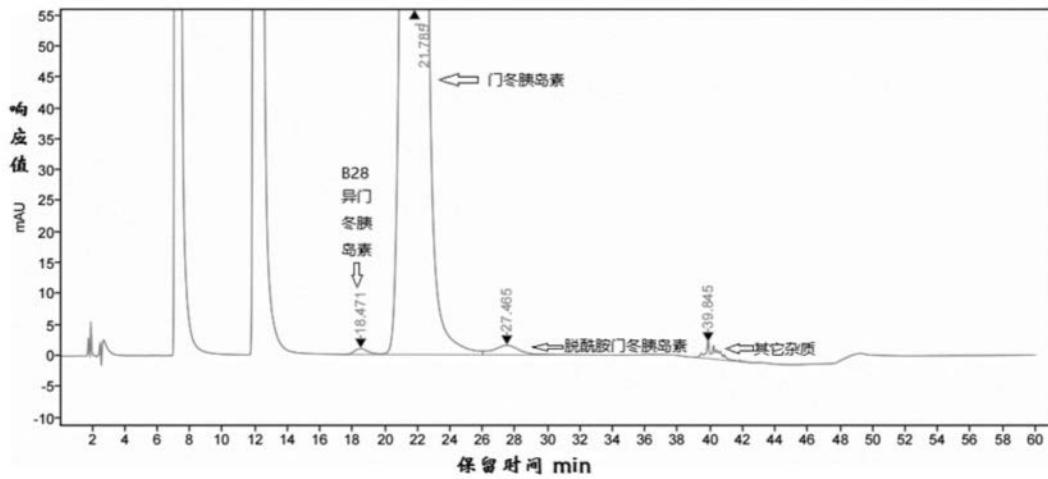
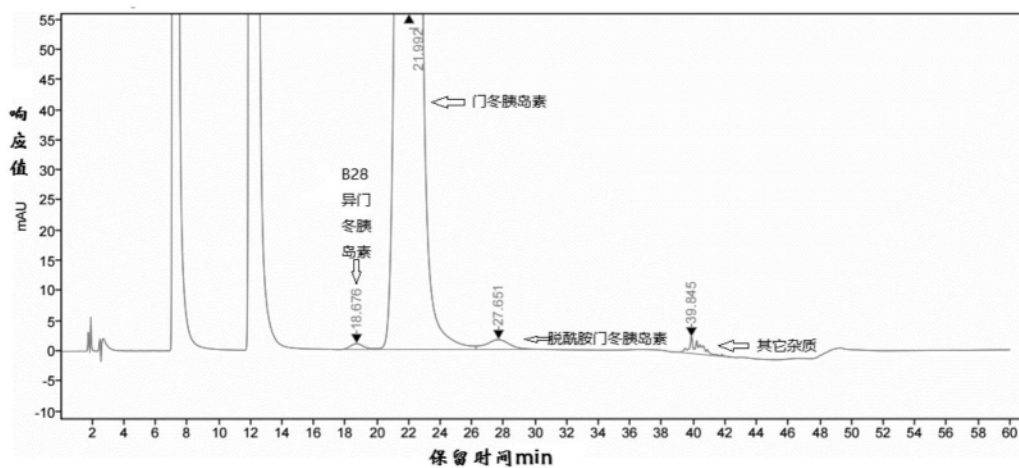


图9



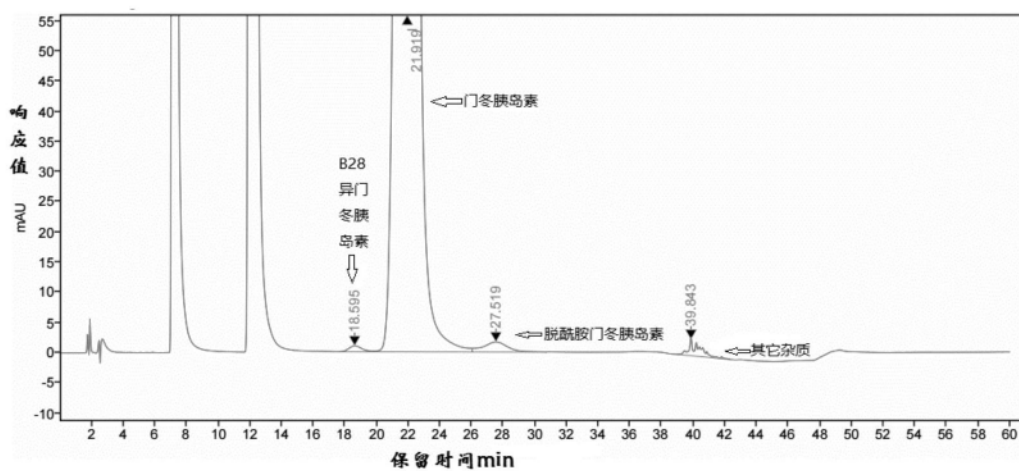
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	18.471	55.44	0.15	0.96
2	21.785	36230.12	99.06	557.65
3	27.465	171.11	0.47	1.53
4	39.845	116.08	0.32	2.65

图10



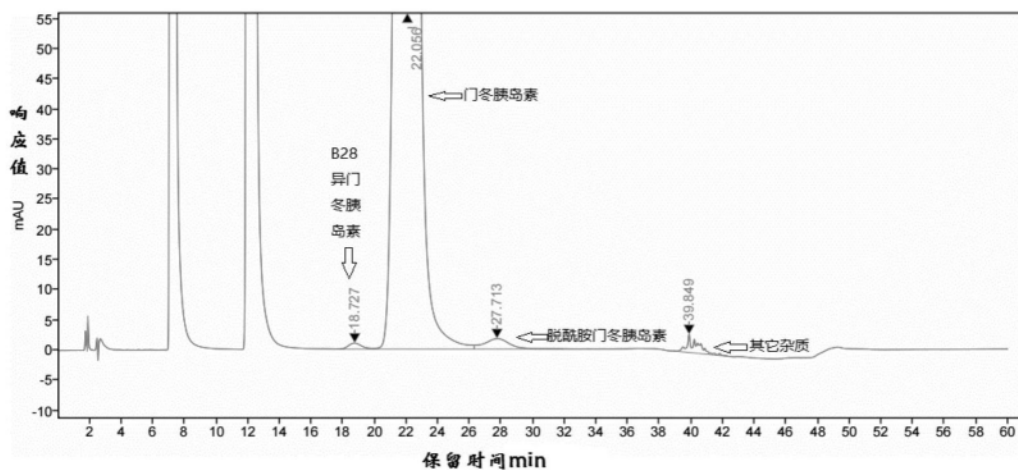
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	18.676	57.74	0.16	0.96
2	21.992	36307.31	99.05	561.00
3	27.651	168.19	0.46	1.61
4	39.845	121.97	0.33	2.72

图11



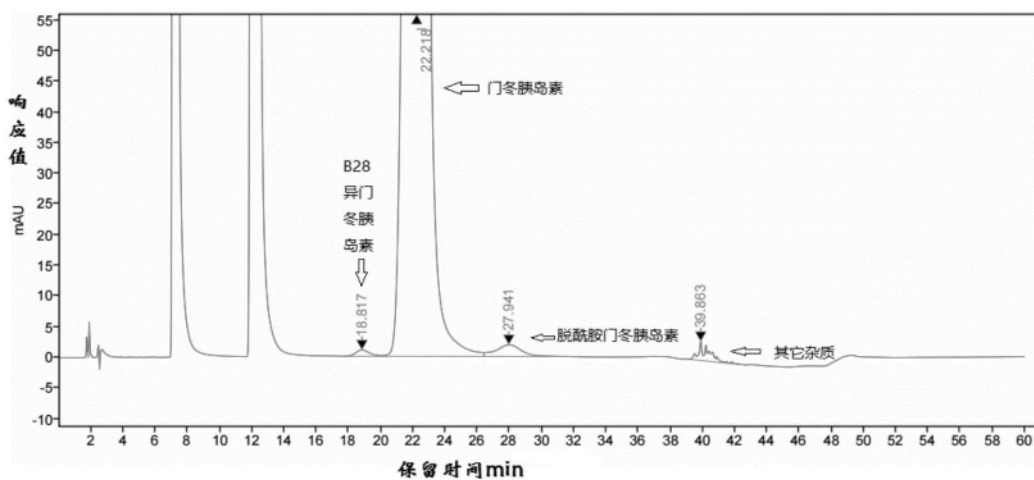
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	18.595	57.39	0.16	0.97
2	21.919	36596.72	99.01	568.40
3	27.519	183.24	0.50	1.67
4	39.843	126.41	0.34	2.69

图12



#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	18.727	59.41	0.16	1.01
2	22.056	37499.67	98.98	583.29
3	27.713	193.15	0.51	1.73
4	39.849	131.98	0.35	2.99

图13



#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	18.817	61.36	0.16	1.03
2	22.218	39064.19	98.99	596.30
3	27.941	206.28	0.52	1.90
4	39.863	129.89	0.33	3.09

图14

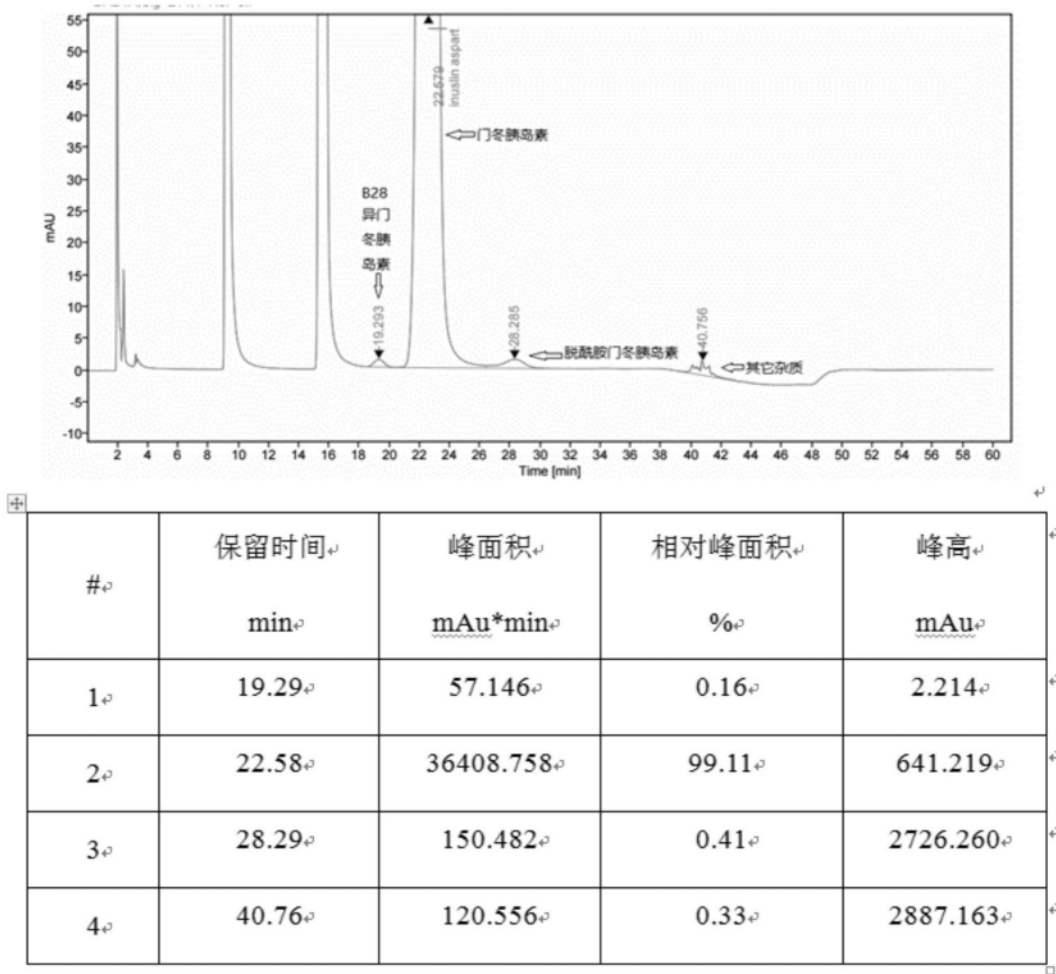
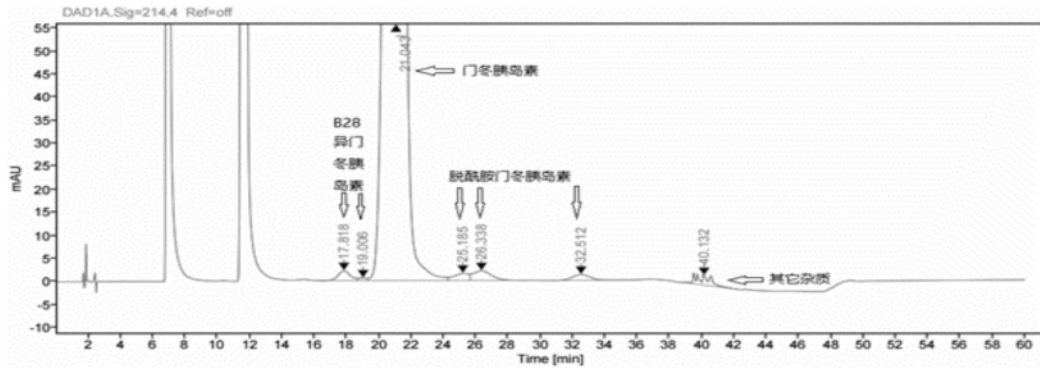
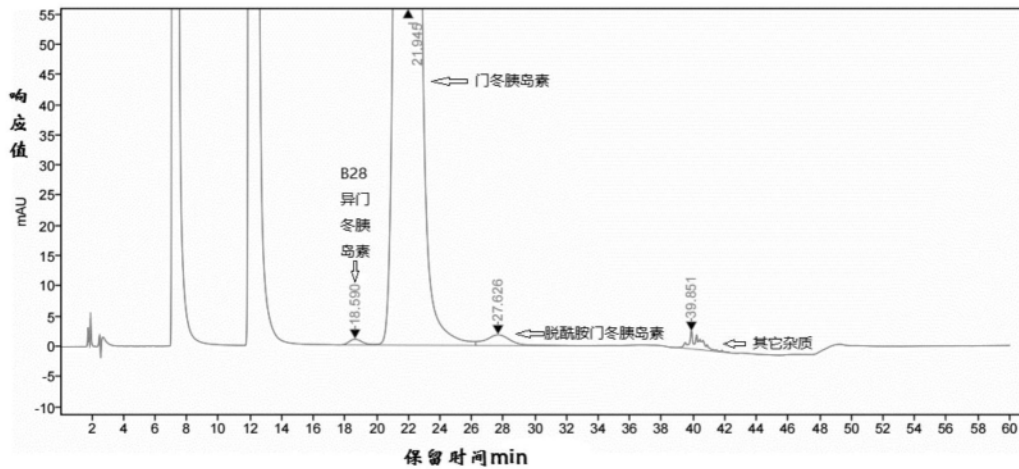


图15



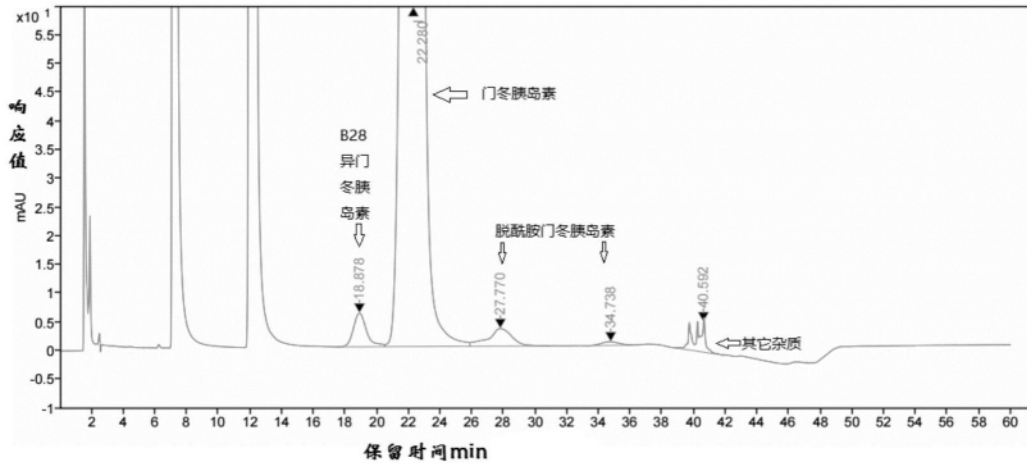
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	17.82	112.70	0.30	2.12
2	19.01	20.22	0.05	0.56
3	21.04	37271.87	98.35	669.56
4	25.19	98.63	0.26	1.53
5	26.34	167.39	0.44	2.08
6	32.51	94.75	0.25	1.26
7	40.13	132.77	0.35	2.02

图16



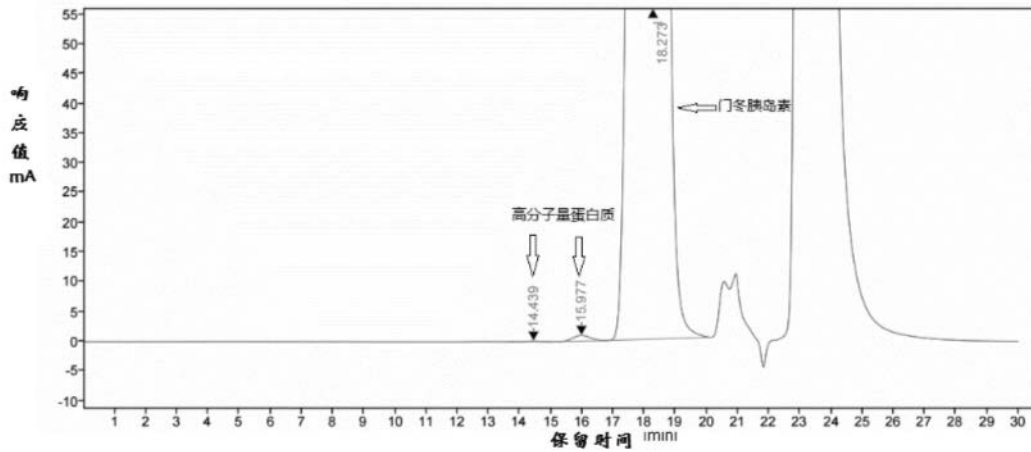
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	18.590	57.38	0.15	0.98
2	21.945	37825.50	99.00	579.58
3	27.626	193.17	0.51	1.77
4	39.851	132.36	0.35	2.90

图17



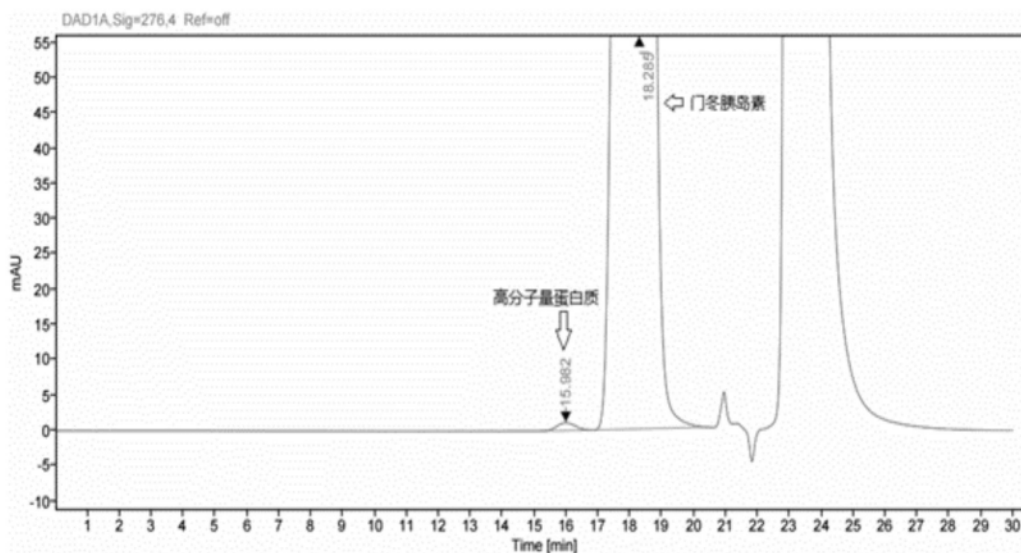
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	18.878	340.933	0.93	6
2	22.280	35544.820	97.42	593
3	27.770	325.296	0.89	3
4	34.738	48.338	0.13	1
5	40.592	228.401	0.63	5

图18



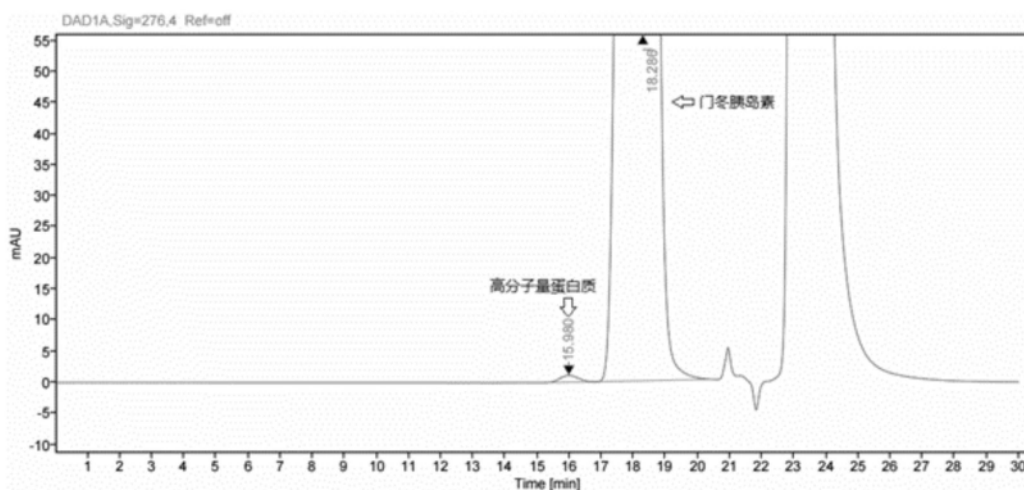
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	14.44	3.73	0.01	0.11
2	15.98	37.25	0.09	0.96
3	18.27	40858.82	99.90	940.01

图19



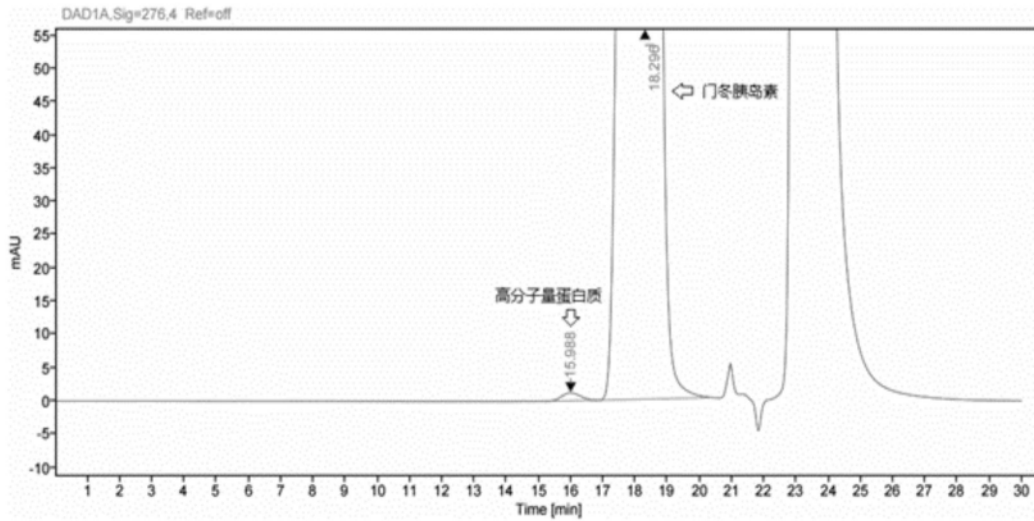
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	15.98	44.35	0.11	1.11
2	18.29	41644.69	98.89	967.43

图20



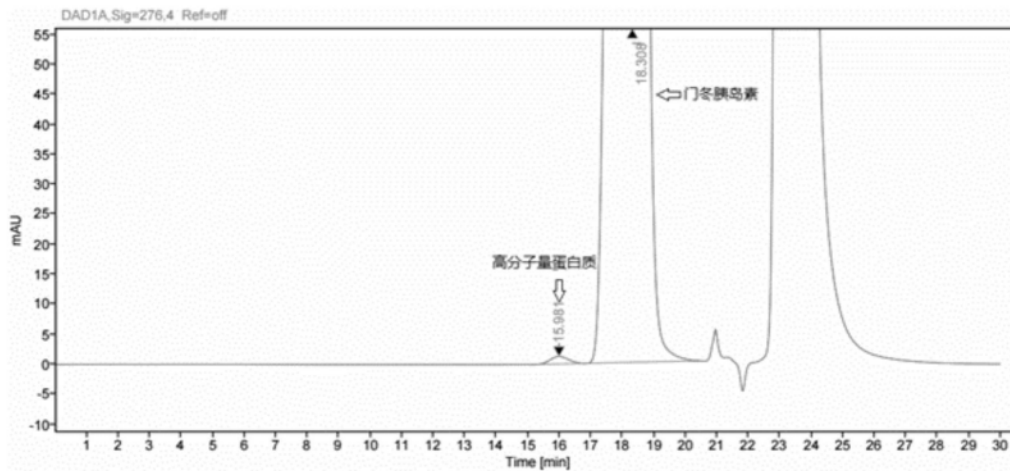
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	15.98	43.61	0.10	1.09
2	18.29	41695.81	99.90	968.12

图21



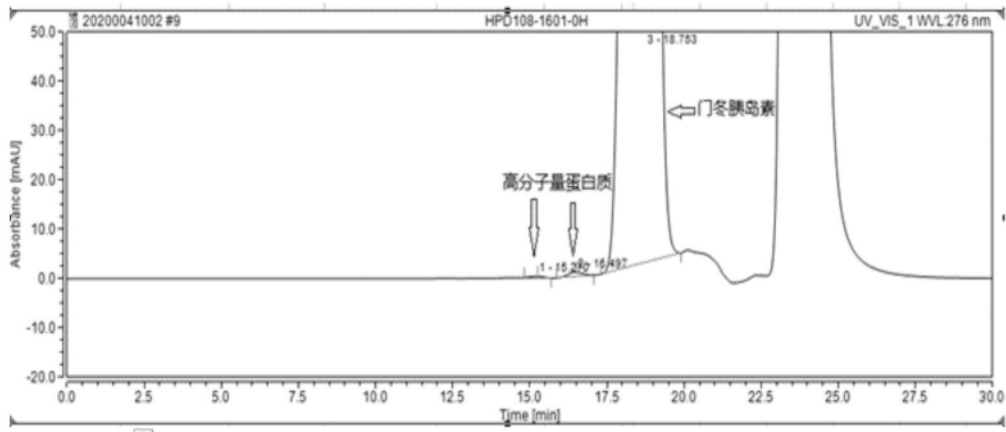
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	15.99	47.78	0.11	1.18
2	18.30	42739.64	99.89	986.09

图22



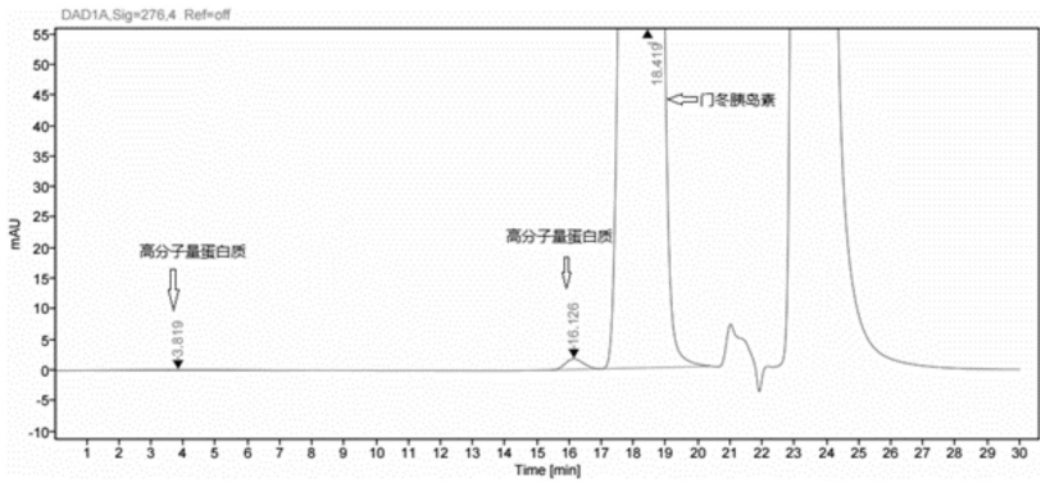
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	15.98	50.37	0.11	1.26
2	18.31	44505.07	99.89	1005.27

图23



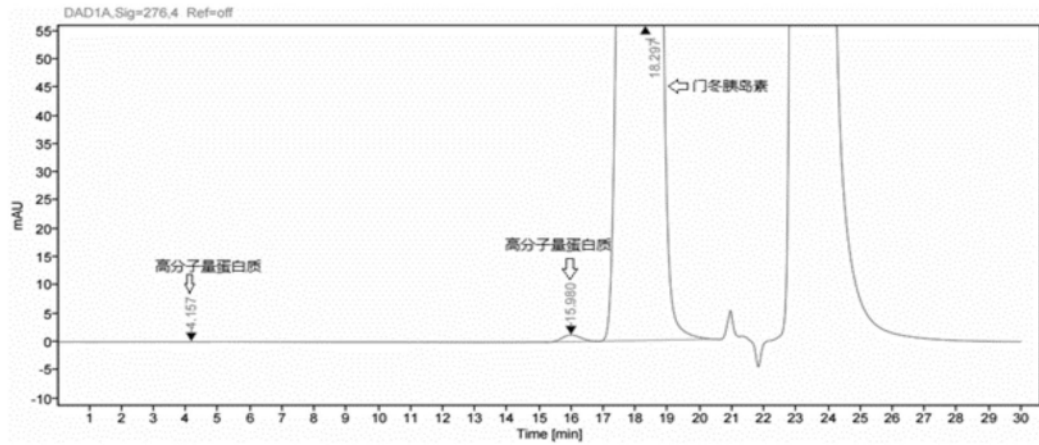
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	15.270	0.147	0.02	0.337
2	16.497	0.514	0.07	0.898
3	18.753	691.170	99.90	974.552

图24



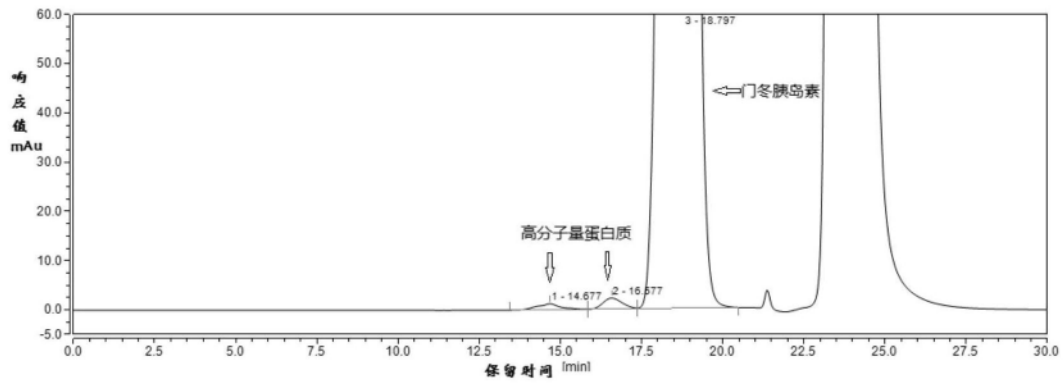
#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	3.82	30.55	0.07	0.11
2	16.13	68.72	0.16	1.75
3	18.42	42460.62	99.77	1003.98

图25



#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	4.16	7.75	0.02	0.05
2	15.98	47.62	0.11	1.19
3	18.30	43041.30	99.87	988.59

图26



#	保留时间 min	峰面积 mAu*min	相对峰面积 %	峰高 mAu
1	14.677	0.994	0.14	1.211
2	16.577	1.521	0.22	2.219
3	18.797	700.610	99.64	972.240

图27

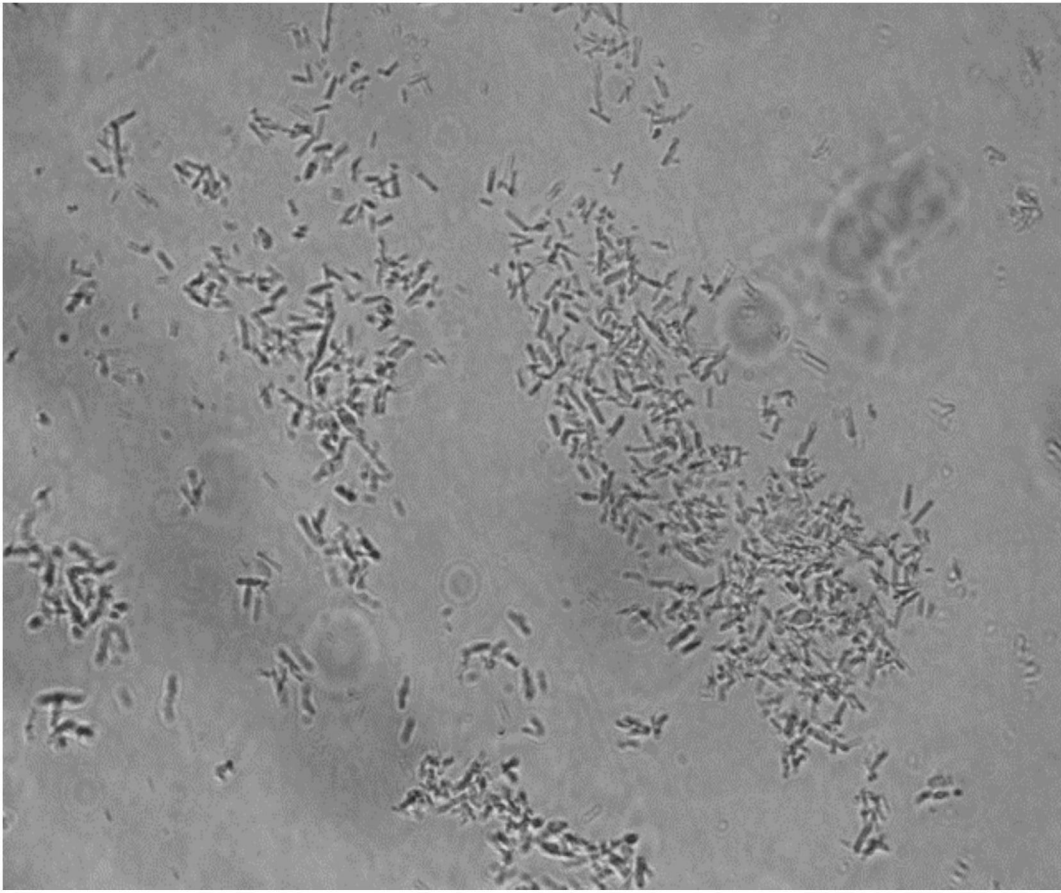


图28

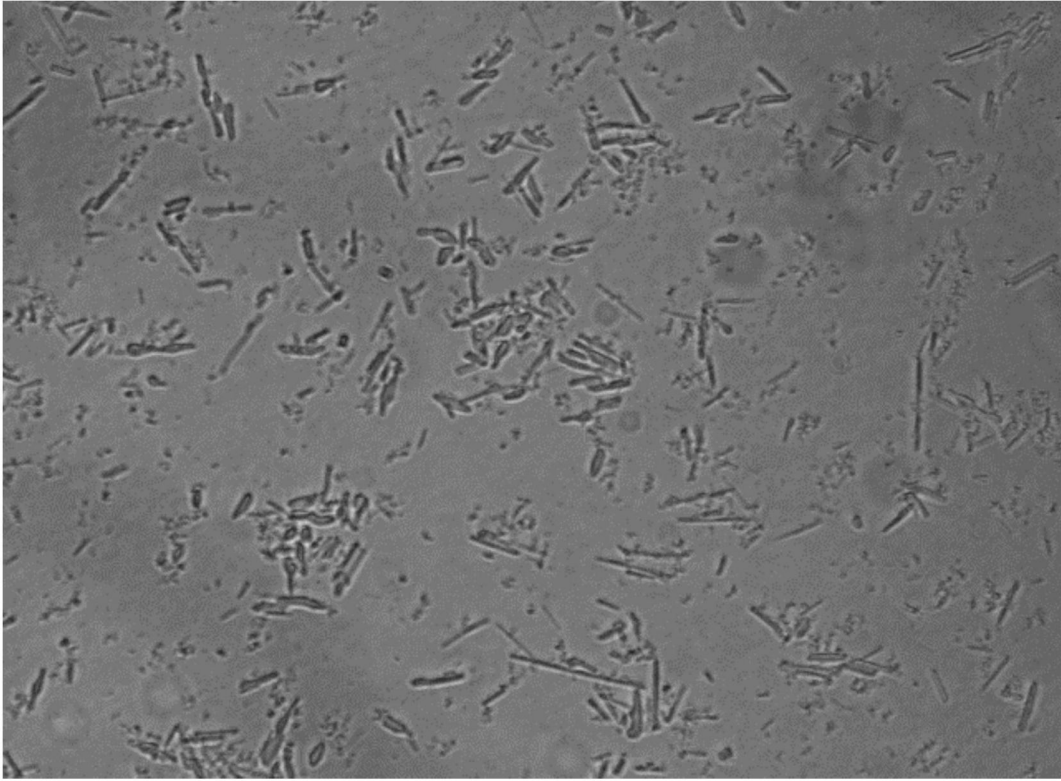


图29