



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) UTLEGNINGSSKRIFT (11) Nr. 164277

(51) Int. Cl.* A 61 K 37/26

(83)

- (21) Patentsøknad nr. 852314
(22) Inngivelsesdag 07.06.85
(24) Løpedag 07.06.85
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.
- (71)(73) Søker/Patenthaver HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT,
D-6230 Frankfurt am Main 80,
DE.
- (86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringssdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 10.12.85
(44) Utlegningsdag 11.06.90
(72) Oppfinner ULRICH GRAU, Hofheim am Taunus,
GERHARD ROSS, Hofheim am Taunus,
DIETRICH HILLER, Wiesbaden,
HORST PAUL NEUBAUER, Königstein/Taunus,
DE.
- (74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.
(30) Prioritet begjært 09.06.84, DE, nr. 3421613,
09.06.84, DE, nr. 3421615,
01.12.84, DE, nr. 3443877.
- (54) Oppfinnelsens benevnelse FREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV ET MOT MEKANISK
BELASTNINGSSTABILISERT VANDIG INSULINPREPARAT OG
ANVENDELSE DERAV.
- (57) Sammendrag Fremgangsmåte til fremstilling av en mot mekanisk
belastning stabilisert vandig insulintilberedning
som har en insulinkonsentrasjon over 1 I.E./ml
og ved 4°C har en viskositet på minst 1,75 mPa.s,
idet til en vandig insulintilberedning settes
et fysiologisk tålbart fortykningsmiddel alene
eller i tillegg et fysiologisk tålbart overflate-
aktivt stoff. Det omtales også anvendelsen av
et slikt middel som legemiddel ved behandlingen
av Diabetes mellitus, spesielt til anvendelse
i innretninger til kontinuerlig insulinadmini-
strering eller som legemiddel med forsinket
virkning, anvendelsen av et fysiologisk tålbart
fortykningsmiddel alene eller sammen med et
fysiologisk tålbart overflateaktivt stoff til
stabilisering av ovennevnte vandige insulin-
tilberedninger og anvendelsen av et fortyknings-
middel som dephthjelpemiddel i vandige insulin-
tilberedninger.
- (56) Anførte publikasjoner Britisk (GB) patentsøknad, publ. nr. 2101482,
USA (US) patent nr. 2474729, 2574889,
Chem. Abstr. 77: 56944t.

Oppfinnelsen vedrører fremstilling av et mot mekanisk belastningsstabilisert vandig insulinpreparat som ved en temperatur på 4°C foreligger som hydrogel samt deres anvendelse, spesielt til behandling av Diabetes Mellitus.

5 Det er generelt kjent at det til den parenterale substitusjonsterapi med insulin stilles spesielle krav. Dertil hører spesielt det spørsmål om en forsinket farmakokinetikk, som muliggjør å innstille diabetikeren med en eller noen få
10 injeksjoner om dagen. Til oppnåelse av slike depoteffekter eksisterer noen klinisk godtatte prinsipper, herunder anvendelsen av zink eller protaminsulfat som dephjelpstoffer.

15 Disse kjente depotprinsipper beror på den fysikalske effekt av langsom gjenopløsning av en ved fysiologisk pH-verdi tungtoppløselig foreliggende form av insulinet, f.eks. i form av 2-zink-krystallen. Har derimot preparatet allerede en nøytral pH som med hensyn til den kjemiske stabilitet ved
20 lengere lagring er fordelaktig, så er disse preparater suspensjoner, som før dosering meget omhyggelig må homogent opprystes for å unngå feildoseringer.

De hittil kjente insulin-depotpreparater har dessuten meget
25 spesifikk, og bare innen visse grenser ved tilsetning av oppløst insulin, varierbar virkeprofil. Det finnes nå alltid pasienter hvor den alternative virkeprofil er ønskelig, f.eks. slike med noe mindre hurtig innsetning ved ca. like lang virkning. Har legen slike preparater til disposisjon, så
30 kan det gås inn på diabetikerens spesifikke vaner og egenheter. Ønskes det derimot at pasientene skulle omstille vanene, så ville dette medføre problemet av pasient-"Compliance", som til slutt vesentlig påvirker terapieresultatet.

35 Kraegen et al. omtaler i Brit. Med. J. 1975, 3, 464-466, en stabiliserende effekt av en tilsetning av inntil 3,5% hemacel til meget fortynnede insulinoppløsninger (0,04

164277

2

I.E./ml), hvorved det lar seg bl.a. hindre adsorpsjonen av insulinet på forrådskar og slangesystemer i infusjons-systemer.

5 Foreliggende oppfinnelse vedrører dermed en fremgangsmåte for fremstilling av et mot mekanisk belastningsstabilisert vandig insulinpreparat som ved en temperatur på 4°C foreligger som hydrogel, kjennetegnet ved at insulinpreparatet inneholder en insulinkonsentrasjon som ligger over 1 I.E./ml og at
10 viskositeten ved 4°C er på minst 1,75 mPa slik at insulinpreparatet er flytende ved rom- til kroppstemperatur, insulinet som benyttes er humaninsulin, et pattedyrinsulin, et modifisert insulin eller humant proinsulin og det tilsettes mer enn 1, fortrinnsvis 2-20 vekt-% fortykningsmiddel sammen med et fysiologisk følbart overflateaktivt
15 stoff, og at det som fortykningsmiddel tilsettes et fysiologisk tålbart fortykningsmiddel, kollagen resp. dets følgeprodukter, et polysakkarid resp. dets derivat eller polyvinylpyrrolidon og at pH innstilles til en verdi mellom 2,5 og
20 8,5, fortrinnsvis mellom 6 og 8 og at det eventuelt tilsettes et egnet isotonisk middel, et egnet konserveringsmiddel, en egnet bufferforbindelse og/eller zink i en mengde inntil 100 µg zinkioner/100 I.E.

25 De vandige insulinpreparatene har en overraskende forbedret fysikalsk stabilitet og andre forbedrede egenskaper, f.eks. med hensyn til virkeprofilen. Ifølge en utførelsesform av oppfinnelsen kan insulintilberedningen dessuten inneholde et fysiologisk tålbart overflateaktivt stoff, hvorved stabiliteten spesielt i Peristaltik-pumper godt stabilisert mot
30 mekanisk belastning, spesielt ved forhøyet temperatur, f.eks. rysting og pumpebevegelser.

Spørsmålet om stabilitet av insulintilberedninger har hittil
35 vært et vanskelig problem. Således er det kjent at oppløste proteiner som insulin adsorberes på grenseflater (hertil hører også grenseflaten vandig oppløsning/luft) (C.W.N.

Cumber og A.E. Alexander Trans. Faraday Soc. 46, 235 (1950)). Som følge av denne adsorpsjon til grenseflater iakttas forskjellige sekundærreaksjoner som generelt sammenfattes under begrepet "denaturering". Det kommer til en formendring av de adsorberte proteinmolekyler (endring av tertiær- og/eller sekundærstrukturen). Dessuten kan det komme til aggregasjon av adsorberte molekyler til oppløselige eller uoppløselige polymere former. Også den ved passering av insulinoppløsninger gjennom snevre kanaler opptredende turbulens synes å **begunste en insulindenaturering.**

Som en hovedhindring ved videreutviklingen og den kliniske anvendelse av kontinuerlig infusjonsinnretninger, har det vist seg tendens av insulinet å falle ut fra handelsvanlige oppløsninger og derved å tilstoppe mekaniske deler samt forsøringsveier. Videre foreligger det tendens til å redusere størrelsen av disse innretninger for således å få implanterbare systemer, hvorved det dannes et behov til høyere konsentrerte, stabile insulinoppløsninger, hvilket igjen dessuten vanskeliggjør de ovennevnte problemer.

Spørsmålet om fysikalsk stabilitet av insulinoppløsninger diskuteres spesielt siden utvikling av automatiske doseringsapparater. Det er generelt kjent at i slike apparater må det anvendes spesielt stabiliserte insuliner. I sammenheng med utilstrekkelig fysikalsk stabilitet av insuliner diskuteres ikke bare en redusert biologisk virkning, men i den senere tid også en over stimulering av makrofagen forløpende prosess ved dannelse av amyloid-A-protein i serumet, som kan føre til amyloidose i forskjellige organer (Brownlee et al., Lancet (1984), 411-413).

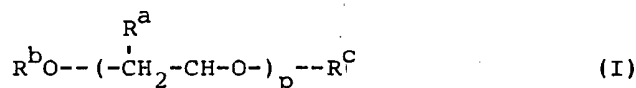
For løsning av dette problem er det allerede gjort en rekke forslag:

164277

4

Fra DE-A 29 17 535 er det kjent vandige insulinoppløsninger, som til beskyttelse mot denaturering inneholder et overflateaktivt stoff med den generelle formel I

5

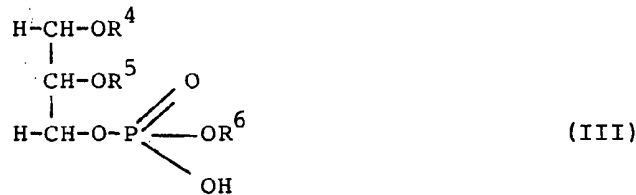


10 hvori R^a betyr hydrogen, metyl eller etyl, p betyr tallet 2-80, fortrinnsvis 8-45, og R^b og R^c er like eller forskjellige og betyr hydrogen, alkylalkoholrester med 1-20 C-atomer, karboksylsyrerester med 2-20 C-atomer, alkylfenolrester med en alkylkjede på 1-10 C-atomer eller alkylaminrester med 1-20 C-atomer som homopolymerisat, blokkpolymerisat eller blandingspolymerisat i en konsentrasjon
15 fra 2-200 mg/l.

I EP-A 18609 omtales mot denaturering bestandige vandige oppløsninger av insulin og et flertall andre proteiner, som er karakterisert ved et innhold av et overflateaktivt stoff med kjedeformet grunnstruktur, hvis ledd inneholder svakt hydrofobe og svakt hydrofile områder i alternerende anordning.
20

25 WO-A-83/00288 omtaler stabile vandige insulintilberedninger til anvendelse av insulindoseringsinnretninger, som har en pH-verdi fra 6,5-9, og som inneholder inntil ppm av en polyoksyetylenalkyleter med formel $R^7 - O - \left[\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} \right]_m - \text{H}$ (II),
30 hvori R^7 betyr en mettet eller umettet ($C_8 - C_{15}$)-alkylgruppe og m betyr et helt tall fra 2-25.

Fra DE-A 32 40 177 er det endelig kjent fysikalsk stabiliserte insulinoppløsninger, som er karakterisert ved at de inneholder stabiliserende mengder av et fosforlipid med
35 formel III



5

hvori R^4 og R^5 , som kan være like eller forskjellige, betyr hydrogen, alkylkarbonyl, alkenylkarbonyl, alkandienylkarbonyl, alkantrienylkarbonyl eller alkantetraenylkarbonyl med den forholdsregel at R^4 og R^5 ikke samtidig er hydrogen, og hvori R^6 betyr en hydrofil gruppe.

10

Disse grenseflateaktive stabilisatorer er meget effektive idet de tydelig øker insulinopløsningenes rystestabilitet. Utvilsomt er rysting en vesentlig negativ innvirkning på insulinet i doseringsapparater.

15

Nå har det imidlertid vist seg at spesielt i Peristaltikpumper påvirker pressingen av elastomer-pumpeslangen og/eller skjæreeffekter, som opptrer ved mange pumpeprinsipper i tillegg insulin stabiliteten. På denne måte kan det på tross av tilsetning av forskjellig hittil kjente stabilisatorer komme til insulinutfelling i pumpeslanger eller katetere.

20

Med "insuliner" forstås her som i det følgende, enhetlige produkter eller blandinger av forskjellige insuliner, nemlig ikke bare humaninsulin og insuliner av dyrisk opprinnelse, som pattedyrinsuliner (eksempelvis fra storfe eller svin), men også insuliner i en videre forstand, dvs. modifiserte insuliner som des-Phe^{B1}-insuliner (sammenlign f.eks. DE-PS 20 05 658, EP-A 46 979) eller ved C-terminus av B-kjeden basisk modifiserte insuliner (som insulin-B31-Arg-OH eller insulin-B31-Arg-Arg-OH, foreslått i de tyske søknader P 33 26 472.4, P 33 27 709.5, P 33 33 640.7, P 33 34 407.8) og humant eller andre proinsuliner eller proinsulinanaloger (sammenlign f.eks. DE-A 32 32 036), samt alkali- og ammoniumsaltene. Det kan også foreligge

30

35

flere av disse insuliner i blanding. Insulinkonsentrasjonen kan, avhengig av oppløseligheten, utgjøre inntil ca. 1500 I.E./ml, fortrinnsvis ligger den mellom 5 og ca. 1000 I.E./ml. I depotformer kan en ønskelig del av en eller flere insuliner uavhengig av hverandre respektivt foreligge i oppløst, amorf og/eller krystallinsk form.

Som fortykningsmiddel (også kalt geleringsmiddel) kommer det på tale fysiologisk tålbare polymere, som kollagen og dets følgeprodukter, som gelatiner, oksypolygelatiner ("Gelifundol"), modifisert flytende gelatin ("Physiogel"), gelatinpartialhydrolysater, som også kan være kryssbundet f.eks. med diisocyanater (polygelin, "Haemaccel") eller polysakkarider og derivatene, f.eks. dekstraner, laevaner og hydroksyetylstivelser, eller også polyvinylpyrrolidon. En del av de nevnte stoffer finner også anvendelse i kolloidale plasmaerstatningsmidler.

Fortykningsmidlene bevirker at insulintilberedningen ved lavere temperaturer, f.eks. 4°C, foreligger lett tyktflytende til tyktflytende eller som hydrogel. Tilberedningene ifølge oppfinnelsen har, målt ved 4°C, fortrinnsvis en viskositet på minst 2, og spesielt en slik på minst 2,5 mPa.s. Gelene flytendegjør seg under tiden allerede ved værelses-temperatur eller ved temperaturer nær legemstemperatur.

Preparatene ifølge oppfinnelsen, som har en høy fysisk stabilitet, inneholder fortrinnsvis mer enn 1, spesielt mellom 2 og 20 vekt-% fortykningsmiddel. Imidlertid kan det også ved tilsetning av mindre mengder fortykningsmidler allerede oppstå hydrogeler, eksempelvis er det her tilstrekkelig med tilsetning av ca. 0,2% agar eller 0.6% gelatiner. Oppad kan innholdet av geleringsmiddel, avhengig av dets type, utgjøre 30% og mer.

Ved tilstrekkelig høy mengde av fortykningsmiddel er det felles for alle tilberedninger at de under lagringsbetingelser foreligger i fast form som hydrogel. Dette er en

fordel med hensyn til den fysikalske stabilitet, da som kjent oligomerdannelse og denaturering akseleres sterkt ved bevegelse, altså prinsippielt ikke sikkert kan utelukkes ved håndtering av flytende insulintilberedninger. Lagringen i gelform kan også være fordelaktig, fordi 5 denne form ved lagring forblir vesentlig mer homogen enn en oppløsning respektivt suspensjon. Det er f.eks. ved sedimenterte krystallsuspensjoner ved lengere lagring absolutt tenkelig at det danner seg relativt stabile 10 krystallassosiatér, som da mindre lett kan opprystes til en homogen suspensjon, således at det kan inntre doseringsfeil. Foreligger derimot krystallsuspensjonen homogent "innfrosset" i en gel, så kan insulinmolekylene bare långsamt diffundere til karveggen eller grenseflaten 15 væske/luft, og det er å utelukke slike effekter. Dessuten er bevegelser og turbulenser innen gelene under håndtering betraktelig redusert. Preparatene, fremfor alt slike med et innhold av overflateaktive stoffer har derfor en spesielt god lagringsstabilitet.

20 Før anvendelse bringes gelene, som også ved vanlige insuliner, til værelses- til kroppstemperatur, idet de flytendegjøres, men har allikevel dessuten en i forhold til vanlige insulinoppløsninger, øket viskositet. Normalt sedimenteres da 25 suspensjonene ikke med en gang, således at inhomogeniteter og doseringsfeil ikke så lett kan opptre, et inhomogenitetsproblem eksisterer selvsagt ikke ved klare geltilberedninger. I ethvert tilfelle lar de vanlige injeksjonskar seg anvende.

30 Den økede fysikalske stabilitet av gelene er dessuten også til en viss grad tilstede ved legemstemperatur, altså i flytende tilstand. Belastes slike oppløsninger i et rotasjonsforsøk ved 37°C termisk-mekanisk, så 35 lar det seg iaktta en relativ stabilitet fra ca. 3-5 ovenfor vanlige insulinoppløsninger, som ikke inneholder fortykningsmidler.

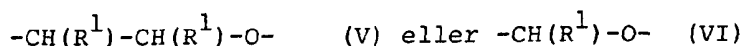
164277

8

Av insulinpreparatene med et innhold av overflateaktive stoffer er slike foretrukket som inneholder et fra EP-A 18 609 kjent overflateaktivt stoff med kjedeformet grunnstruktur, hvis ledd har svakt hydrofobe og svakt hydrofile områder i alternerende anordning, spesielt slike som er et polymerisat, nemlig homopolymerisat, blandingspolymerisat eller blokkpolymerisat av formel



hvor X_n betyr en kjede av n ledd av formlene



i vilkårlig rekkefølge, og $n = 2-80$, fortrinnsvis $8-45$, $Y = -O-$ eller $-NH-$, og R^1 betyr H , $-CH_3$ eller $-C_2H_5$, idet restene R^1 kan være like eller forskjellige, imidlertid minst i halvparten av kjedeleddene forekommer $X = -CH_3$ eller $-C_2H_5$, og hvori R^2 og R^3 uavhengig av hverandre betyr H eller en organisk rest. R^2 og R^3 betyr fortrinnsvis respektivt alkyl med $1-20$ C-atomer, karboksyalkyl med $2-20$ C-atomer eller alkylfenyl med $1-10$ alkyl-C-atomer, R^2 er imidlertid, hvis Y betyr $-NH-$, bare alkyl med $1-20$ C-atomer, R^2 og/eller R^3 kan også være flerverdig og forbundet med tre eller flere polyalkoksykjeder $-X_n-$ til forgrenede produkter. Disse forbindelser er allerede virksomme i konsentrasjoner på $2-200$ mg/l.

Som overflateaktive stoffer kan det videre finne anvendelse de fra DE-A 32 40 177 kjente fosfolipider av ovennevnte formel III, hvori R^4 og R^5 har den der nevnte betydning, og inneholder respektivt $8-22$, fortrinnsvis ca. $12-22$ C-atomer. Konsentrasjonen av disse forbindelser utgjør generelt $1-20$, fortrinnsvis $1-10$, spesielt $2,5-7,5$ vekt-%. Eksempler på slike hydrofile grupper er 2-(trimetylammonium)-etyl, 2-aminoetyl, 2-karboksy-2-aminoetyl, 2,3-dihydroksypropyl eller 2,3,4,5,6-pentahydroksycykloheksyl.

- Foretrukket er forbindelser, hvori R^4 og R^5 hver betyr alkylkarbonyl. Videre foretrukket er forbindelser, hvori R^6 betyr 2-(trimetylammonium)etyl, idet slike forbindelser er kjent som lecitiner og slike forbindelser, hvori R^4 og R^5 hver
- 5 betyr alkylkarbonyl med ca. 8-16 C-atomer eller med ca. 12-16 C-atomer, og hvori R^6 betyr 2-(trimetylammonium)etyl, spesielt slike forbindelser hvori R^4 og R^5 hver betyr oktanoyl.
- 10 Videre kommer det som overflateaktive stoffer på tale de fra DE-A 29 17 535 og de fra WO-A 83/00288 kjente polyoksyalkylenforbindelser, f.eks. forbindelser av ovennevnte formel II, hvori R^7 betyr alkyl med 8-15 C-atomer eller en tilsvarende olefinisk gruppe, og m betyr et helt tall fra
- 15 2-25. Disse forbindelser tilsettes vanligvis i en mengde fra 2-200 mg/l. R^7 betyr fortrinnsvis (C_{12} eller C_{13})-alkyl, m betyr fortrinnsvis 4-23, spesielt 6-15.
- 20 Alle preparatene ifølge oppfinnelsen lar seg prinsipielt fremstille av oppløst eller av amorft krystallinsk insulin (klare resp. uklare geler). De har vanligvis en pH-verdi mellom 2,5 og 8,5, spesielt imidlertid mellom 6 og 8, inneholder fortrinnsvis et egnet isotonisk middel, et egnet konserveringsmiddel og eventuelt et egnet pufferstoff, f.eks. de
- 25 videre nedenfor nevnte. Det virksomme stoff foreligger fortrinnsvis oppløst.
- 30 Preparatene uten overflateaktive stoffer har i dyreforsøk i forhold til tilsvarende sammenligningspreparater uten tilsetning av fortykningsmidler en tydelig forsinket virkning, idet forsinkelseeffekten øker med økende mengde av fortykningsmiddel (fig. 3). Dette er meget overraskende, spesielt for de undersøkte tilberedninger som er klart flytende
- 35 ved legemstemperatur, hvor den ved andre depotformer tilstedeværende tungtoppløselighetseffekt (krystaller eller amorfe suspensjoner) altså ikke foreligger.

Det er også mulig å forsterke depoteffekten ved kombinasjon med vanlige hjelpemidler med forsinkende virkning, som f.eks. ved tilsetning av egnede mengder av zink, surfen, globin eller protaminsulfat. Den tilsatte zinkmengde kan derved utgjøre inntil 100 μg Zn^{2+} /100 insulinenheter, fortrinnsvis ligger den over 35 og for det meste under 50 μg Zn^{2+} /100 insulinenheter. Protaminmengden kan f.eks. utgjøre mellom 0,28 mg og 0,6 mg pr. 100 enheter (referert til protaminsulfat). På denne måte er det fremstillbart hittil ikke tilgjengelige, spesielt langvirkende preparater, hvis anvendelse er interessant, fordi etter nyere erkjennelser fra terapien med insulindoseringsapparater nettopp en basalmengde av insulin synes terapeutisk fordelaktig.

Som fysiologisk ufarlig og med insulinene forenlig bærermedium egner det seg en steril vandig oppløsning, som gjøres isotonisk til blod på vanlig måte, f.eks. ved hjelp av glyserol, koksalt, glukose, og dessuten inneholder en eller flere av de vanlige konserveringsmidler, f.eks. fenol, m-kresol, benylalkohol eller p-hydroksybenzoesyreester. Bærermediet kan i tillegg inneholde en pufferforbindelse, f.eks. natriumacetat, natriumcitrat, natriumfosfat, tris-(hydroksymetyl)-aminometan. Til innstilling av pH anvendes fortynnede syrer (typisk HCl) resp. lut (typisk NaOH).

Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte til fremstilling av mot mekanisk belastning stabiliserte vandige insulinpreparater, idet fremgangsmåten er karakterisert ved at til en vandig insulintilberedning settes et fysiologisk tålbart geleringsmiddel og et fysiologisk tålbart overflateaktivt stoff. Preparatene utmerker seg ved spesiell stabilitet og ved subkutan eller intramuskulær administrering ved en forsinket virkning.

Videre vedrører oppfinnelsen anvendelse av et fysiologisk tålbart fortykningsmiddel sammen med et fysiologisk tålbart overflateaktivt stoff til stabilisering av vandige in-

sulinpreparater som ble fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, spesielt mot denaturering på fasegrenseflater og/eller for rensing av insulin ved hjelp av kromatografi eller krystallisering.

5

Insulinpreparatene ifølge oppfinnelsen kan appliseres til behandling av Diabetes mellitus parenteralt, dvs. intravenøst, subkutant eller intramuskulært. Preparatenes depoteffekt med overflateaktive stoffer viser seg mest

10 utpreget ved den subkutane applikasjonsmåte, er imidlertid også tydelig ved intramuskulær injeksjon. Applisert intravasalt virker de klare oppløste preparatene ifølge oppfinnelsen hurtig som de kjente oppløste insuliner. De er derfor fremragende egnet til anvendelse i automatiske
15 doseringsapparater, som pumper, hvor det infunderte insulin med en gang må være virksomt, da det bare således er mulig en hurtig styring, f.eks. tilsvarende blodglukosespeilet.

20 Ved noen doseringsprinsipper er det nødvendig, eller i det minste fordelaktig, å ifylle avgasset insulinoppløsning i reservoirtet. Luft i forbindelse med materialkontakt er, som det ofte er vist, den uheldigste omgivelse for insulin. Dette er ved vanlige oppløsninger et praktisk problem, da det fra fremstilleren av
25 eventuelle avgassede oppløsninger igjen oppløses luft ved bevegelse (f.eks. transport) og diffusjon. Derimot underligger en stivnet gel som ble avgasset som væske, mye mindre for denne innvirkning, til en omstendelig avgassing (og dermed forbundede fare for usterilitet) direkte før anvendelsen i pumpen kan det
30 da muligensvis sees bort fra.

En ytterligere praktisk fordel ved preparatene ifølge oppfinnelsen kan bestå i at, hvis det dreier seg om ved lagringstemperatur stivnede geler, unngås en direkte kontakt med
35 korken. De vanlige korker tenderer nemlig f.eks. til absorpsjon av stabilisatoren, hvilket kan være problematisk i betraktning av de delvis små mengder.

Oppfinnelsen skal forklares nærmere ved hjelp av noen eksempler. De deri fremstilte preparatene har ved 4°C samtlige en viskositet på over 1,75 mPa.s. Tallene ved dekstran, f.eks. 60, angir multiplisert med 10³ molvekten. Det destillerte vann var respektivt p.o. av pH 7,3. Polygelin er et produkt fra Behringwerke AG, Marburg.

Eksempler

1-3) - Insulinpreparater med 20% polygelin

10 Ifølge eksempel 1 ble det under sterile betingelser forenet hver gang en steril oppløsning av

- a) 250 g polygelin, lyofylisert, oppfylt i destillert vann til 1 liter, og
- 15 b) 4,464 g humaninsulin (28 I.E./mg), 21,25 g glycerol, 7,50 g tris-(hydroksymetyl)-aminometan, 3,375 g fenol, så meget vannfritt zinkklorid at det samlede zinkinnhold utgjorde 0,035 g, og 0,125 g polypropylenglykol, hvortil det på begge sider respektivt var påpolymerisert
- 20 ca. 5% polyetylenglykol (midlere molekylvekt 1800), oppfylt i destillert vann til 250 ml.

Ifølge eksempel 2 ble eksempel 1 gjentatt med den modifikasjon at det til oppløsning b) ikke var satt polypropylenglykol.

25 Ifølge eksempel 3 ble det under sterile betingelser forenet hver gang en steril oppløsning av

- a) 200 g polygelin i destillert vann oppfylt til 800 ml, og av
- 30 b) 1,429 g humaninsulin (28 I.E./mg), 1,50 g m-kresol, 1,00 g fenol, 17,00 g glycerol, så meget vannfritt zinkklorid at det samlede zinkinnhold utgjorde 0,028 mg og 0,030 g leceitin i destillert vann, oppfylt til 200 ml.

35 De ifølge eksempel 1-3 fremstilte oppløsninger avfylles på vanlig måte i små glassflasker. Ved ca. 15°C stivnet de som klare geler med 100 I.E./ml.

4-8) Insulinpreparater med 8 resp. 16% dekstran

Ifølge eksemplene 4 og 5 ble det under sterile betingelser forenet hver gang en steril oppløsning av

- 5 a) 180 g dekstran 60 resp. 160 g dekstran 60, oppfylt i destillert vann til 800 ml, og av
- b) 3,571 g humaninsulin (28 I.E./mg), 6,00 g tris-(hydroksymetyl)-aminometan, 2,00 g m-kresol, 1,00 g fenol, 17,00 g glycerol og så meget vannfritt zinkklorid at det samlede zinkinnhold utgjorde 0,028 g, 10 og 0,010 g polypropylenglykol (se eksempel 1) i destillert vann, oppfylt til 200 ml.

Disse preparatene ble på vanlig måte oppfylt i små glassflasker.

15

Ifølge eksemplene 6-8 ble det analogt eksempel 4 fremstilt insulinpreparater, imidlertid med 10 resp. 20% dekstran av forskjellig molekylvekt (se tabell 1).

20

9) Proinsulinpreparat med 20% polygelin

Under sterile betingelser ble det forenet hver gang en steril oppløsning av

- 25 a) 20 g polygelin i destillert vann, oppfylt til 80 ml og av
- b) 100 m proinsulin fra svin, 0,21 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,30 g m-kresol, så meget vannfritt zinkklorid at det samlede zinkinnhold utgjorde 0,0012 g, 0,010 g polyoksyetylen-23-lauryleter av molekylvekt 1200 oppfylt 30 i destillert vann til 20 ml.

10 + 11) Insulinpreparat med 8% polygelin

Under sterile betingelser ble det forenet hver gang en steril oppløsning av

35

- a) 1 liter av en 10%-ig oppløsning av polygelin og
- b) ifølge eksempel 10 1,786 g svineinsulin resp.

164277

14

ifølge eksempel 11 1,786 g humaninsulin (resp. 28 I.E./mg) og 4,25 g glycerol, 1,50 g tris-(hydroksymetyl)-aminometan, 2,50 g fenol og så meget vannfritt zinkklorid at det samlede zinkinnhold utgjorde 0,014 g, oppfylt i destillert vann, til 250 ml.

De således fremstilte preparatene inneholdt etter biologisk prøve 40 I.E./mg.

10 Fysikalsk stabilitet av preparatene ifølge eksemplene 1 og 4-8.

I et standardisert pumpeforsøk ved hjelp av en peristaltikkpumpe (37°C, bevegelse, pumpegrad 12 I.E./d) ble det oppnådd følgende stabilitetsdata:

20 Tabell 1

Oppløsning	Tidsrom til første uklarhet	Relativ stabilitet
"H-Insulin" Hoechst	3 dager	1
25 Preparat b) ifølge eksempel 1, oppfylt med destillert vann til 1,25 l	45 dager	15
Preparat ifølge eksempel 1	> 80 dager	> 27
Preparat med 8% dekstran (eksempel 4)	> 60 dager	> 20
30 Preparat med 16% dekstran (eksempel 5)	> 80 dager	> 27
Preparat med 10% dekstran 32 (eksempel 6)	> 60 dager	> 20
Preparat med 10% dekstran 100 (eksempel 7)	> 60 dager	> 20
35 Preparat med 20% dekstran 100 (eksempel 8)	> 80 dager	> 27

Fysikalsk stabilitet av preparatene ifølge eksemplene
2 og 10.

5 I et standardisert rotasjonsforsøk ved 37°C, i Hz, undersøkes hver gang 5 små flasker av et preparat ifølge eksempel 2 og 10. Til sammenligning ble det undersøkt en standard-insulin.

Tabell 2

Oppløsning	Tidsrom til første uklarhet	Relativ stabilitet
"H-Insulin" Hoechst	2 dager	1
15 Preparat b) ifølge eksempel 10, oppfylt med destillert vann til 1,25 l	4 dager	2
Preparat ifølge eksempel 2	15 dager	7,5
Preparat ifølge eksempel 10	22 dager	11

20

Fysikalsk stabilitet av preparatene ifølge eksemplene

25 3 og 9

De fremstilte oppløsninger ble undersøkt i et standardisert sirkulasjonspumpeforsøk ved hjelp av en peristaltikkpumpe (37°C, bevegelse, resyklerende pumping med en grad på 5 ml/h = 500 I.E./h = 12.000 I.E./d) på sin fysikalske stabilitet.

30

35

164277

16

Tabell 3

Oppløsning	Tidsrom til første uklarhet	Relativ stabilitet
5 "H-Insulin" Hoechst	20 h	1
Preparat med 20% polygelin (eksempel 3)	> 7 dager	> 8
Preparat ifølge eksempel 3, oppløsning b)*	2 dager	2,4
10 Preparat med 20% polygelin (eksempel 9)	> 7 dager	> 8
Preparat ifølge eksempel 9, oppløsning b)*	30 h	1,5

*respektivt uten polygelin, imidlertid oppfylt til 1 liter (eksempel 3) resp. 100 ml (eksempel 9) med destillert vann.

12 + 13) krystallinsk insulinpreparat med 10 resp. 20% polygelin.

Under sterile betingelser ble det forenet hver gang en steril oppløsning av

- 20 a) 125 resp. 250 g polygelin, lyofylisert, i destillert vann, oppfylt til 1 liter,
- b) 2,10 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 16,00 g glycerol, 0,60 g fenol og 1,50 g kresol i destillert vann, oppfylt til 100 ml, og
- 25 c) en steril krystallsuspensjon av 1,786 g humaninsulin (28 I.E./mg), 0,159 g protaminsulfat, 0,525 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,00 g glycerol, 0,15 g fenol, 0,375 g m-kresol og så meget vannfritt zinkklorid at det samlede zinkinnhold utgjorde 0,0108 g, i destillert vann, oppfylt
- 30 til 150 ml.

Disse suspensjoner ble oppfylt i handelsvanlige små glassflasker. Man lar dem deretter ved 4°C direkte etter avfylling

35 stivne, idet det dannet seg homogene uklare geler med 40 I.E./ml med 10 resp. 20% polygelin.

Sedimentasjonsforsøk av suspensjoner ifølge eksemplene 12 og 13

5 Småflasker av suspensjonene ble uten bevegelse inkubert ved 37°C og gjennom Septum innført en kanyle inntil kar-
bunnen, en annen like under Meniskus. Uten bevegelse av småflaskene ble det i bestemte tidsavstander hver gang
uttatt en Aliquot og insulininnholdet bestemt ved hjelp
10 av høytrykk-væskekromatografi (High Performance Liquid Chromatography). Det ble fastslått følgende verdier beregnet i I.E./ml.

Tabell 4

15	Uttak etter	10% polygelin (Eks. 12)		20% polygelin (eks. 13)	
		Karbunn	Meniskus	Karbunn	Meniskus
	0 min.	40 I.E. (ml)	40 I.E./ml	40 I.E./ml	40 I.E./ml
	5 "	41	39	41	40
	15 "	41	40	40	41
	30 "	40	40	40	41
20	60 "	46	35	40	40
	120 "	66	14	46	35

14 + 15) Insulinpreparater med 8 resp. 16% dekstran 60 med forsinkende virkning.

- 25 Under sterile betingelser ble det forenet hver gang en steril oppløsning av
- a) 80 resp. 160 g dekstran 60 i destillert vann, oppfylt til 800 ml, og av
 - 3) b) 1,455 g desPhe-(BI)-svineinsulin (27,5 I.E./mg), 17,00 g glycerol, 6,00 g tris-(hydroksymetyl)-aminometan, 1,50 g m-kresol og 1,00 g fenol, i destillert vann, oppfylt til 200 ml.

164277

18

Disse oppløsninger, som forelå tyktflytende ved 4°C, ble fylt i handelsvanlige småflasker. Etter biologisk prøve utgjorde virkningen respektivt 40 I.E./mg. I en dosering på 0,2 I.E./kg på kaniner virker disse insulinpreparater ved s.c. applikasjon så sterkt eller sterkere forsinket enn et handelsvanlig nøytral-protamin-Hagedorn-forsinkelsespreparat (fig. 4).

16) Insulinpreparat med 20% polygelin.

Under sterile betingelser ble det forenet en steril oppløsning av

- a) 200 g polygelin, oppløst i destillert vann, oppfylt til 800 ml, og av
- b) 3,571 g humaninsulin (28 I.E./mg), 2,10 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,00 g m-kresol og 1,00 g fenol oppløst i destillert vann, oppfylt til 200 ml.

Preparatet ble fylt i handelsvanlige småflasker. Den biologiske prøve viste en virkning på 100 I.E./ml. Den forsinkede virkning ble bekreftet på kaniner.

17 - 19) Insulinpreparater med 20% dekstran av forskjellig molekylvekt og deres forsinkede virkning.

Under sterile betingelser ble det forenet hver gang en steril oppløsning av

- a) 20 g dekstran 32 (eksempel 17) resp. dekstran 60 (eksempel 18) resp. dekstran 100 (eksempel 19) i destillert vann, oppfylt til 80 ml, og av
- b) 0,0071 g humaninsulin (28 I.E./mg), 0,60 g tris-(hydroksymetyl)-aminometan, 0,20 g m-kresol, 0,10 g fenol, 17,00 g glycerol og så meget vannfritt zinkklorid at det samlede zinkinnhold utgjorde 0,0028 g, i destillert vann, oppfylt til 20 ml.

Disse oppløsninger viste på kaniner en dosering på 0,2 I.E./kg ved s.c. applikasjon en sterkt forsinket virkning (fig. 5). Virkningsvarigheten var på kaniner omtrent like lang som for "Basal-H-Insulin" fra Hoechst.

Virkningsprofil av insulinpreparatene ifølge eksemplene
1, 2, 11, 14, 15 og 17-19.

A) i.v. applikasjon på hund og kaniner.

5 Det ble av preparatet ifølge eksempel 1 applisert hver gang
0,2 I.E./kg legemsvekt i ørevenen. Som sammenligningsinsulin
tjente "Humaninsulin Hoechst" (II). Fig. 1 og 2 viser det tids-
messige forløp av blodglukosespeilet ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Verdiene ble
fastslått fra målinger på hver gang 5 dyr. Tilberedningen
10 ifølge eksempel 1 (I) var så vel hos hund (fig. 1) som også
hos kaniner (fig. 2) så hurtig eller sågar enda hurtigere
virksom enn sammenligningen altinsulin (II).

B) s.c. applikasjon på kaniner.

15 Med en tilsvarende Placebo-oppløsning ble preparatene
fortynnet til respektivt 10 I.E./kg og deretter applisert
subkutant i en dosering på 0,2 I.E./kg på hver gang 5 kaniner.
Blodglukoseverdiene ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) ble målt etter 0, 0,5, 1, 2, 3, 5
og 7 timer. På fig. 3 er det vist den ved applikasjon av en
20 oppløsning av humaninsulin analogt eksempel 11 (kurve I), av
en oppløsning analogt eksempel 2 (kurve II), samt av en opp-
løsning analogt eksempel 2, men uten polygelintilsetning
(kurve III). På fig. 4 er det gjengitt de ved applikasjon
av en oppløsning av desPhe-(Bi)-svineinsulin oppnådde verdier
25 ifølge eksempel 14 (kurve I), eksempel 15 (kurve II) samt
av en handelsvanlig suspensjon av et humaninsulin-forsinkelses-
preparat ("Basal-Insulin-Hoechst") (kurve III). På fig. 5
er det gjengitt de samme verdier for tilberedningen ifølge
eksemplene 17 (kurve I), 18 (kurve II), 19 (kurve III) og
30 for det nevnte humaninsulin-forsinkelsespreparat (kurve IV).
På fig. 6 er det gjengitt de samme verdier for en tilberedning
ifølge eksempel 1 (kurve I) og for det nevnte humaninsulin-
forsinkelsespreparat (kurve II).

35 På fig. 1-6 antyder lengden av avstrykningene ved de enkelte
måleverdier på vanlig måte standardavvikningen fra middel-
verdien (SEM).

164277

20

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for fremstilling av et mot mekanisk belastnings-
stabilisert vandig insulinpreparat som ved en temperatur på
4°C foreligger som hydrogel, k a r a k t e r i s e r t
v e d at insulinpreparatet inneholder en insulinkonsentra-
sjon som ligger over 1 I.E./ml og at viskositeten ved 4°C er
10 på minst 1,75 mPa slik at insulinpreparatet er flytende ved
rom- til kroppstemperatur, insulinet som benyttes er
humaninsulin, et pattedyrinsulin, et modifisert insulin eller
humant proinsulin og det tilsettes mer enn 1, fortrinnsvis 2-
20 vekt-% fortykningsmiddel sammen med et fysiologisk følbart
overflateaktivt stoff, og at det som fortykningsmiddel
15 tilsettes et fysiologisk tålbart fortykningsmiddel, kollagen
resp. dets følgeprodukter, et polysakkarid resp. dets derivat
eller polyvinylpyrrolidon og at pH innstilles til en verdi
mellom 2,5 og 8,5, fortrinnsvis mellom 6 og 8 og at det
eventuelt tilsettes et egnet isotonisk middel, et egnet
20 konserveringsmiddel, en egnet bufferforbindelse og/eller zink
i en mengde inntil 100 µg zinkioner/100 I.E.

2.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at insulinkonsentrasjonen som benyttes ligger inntil
ca. 1500, fortrinnsvis mellom 5 og 1000 I.E./ml.

3.

30 Fremgangsmåte ifølge ett eller flere av kravene 1-2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at viskositeten til
preparatet som benyttes er minst 2,5 mPa.s.

4.

35 Anvendelse av et fysiologisk tålbart fortykningsmiddel
sammen med et fysiologisk tålbart overflateaktivt stoff til
stabilisering av vandige insulinpreparater, som ble fremstilt
ved fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, spesielt mot

denaturering på fasegrenseflater og/eller for rensing av insulin ved hjelp av kromatografi eller krystallisering.

5

10

15

20

25

30

35

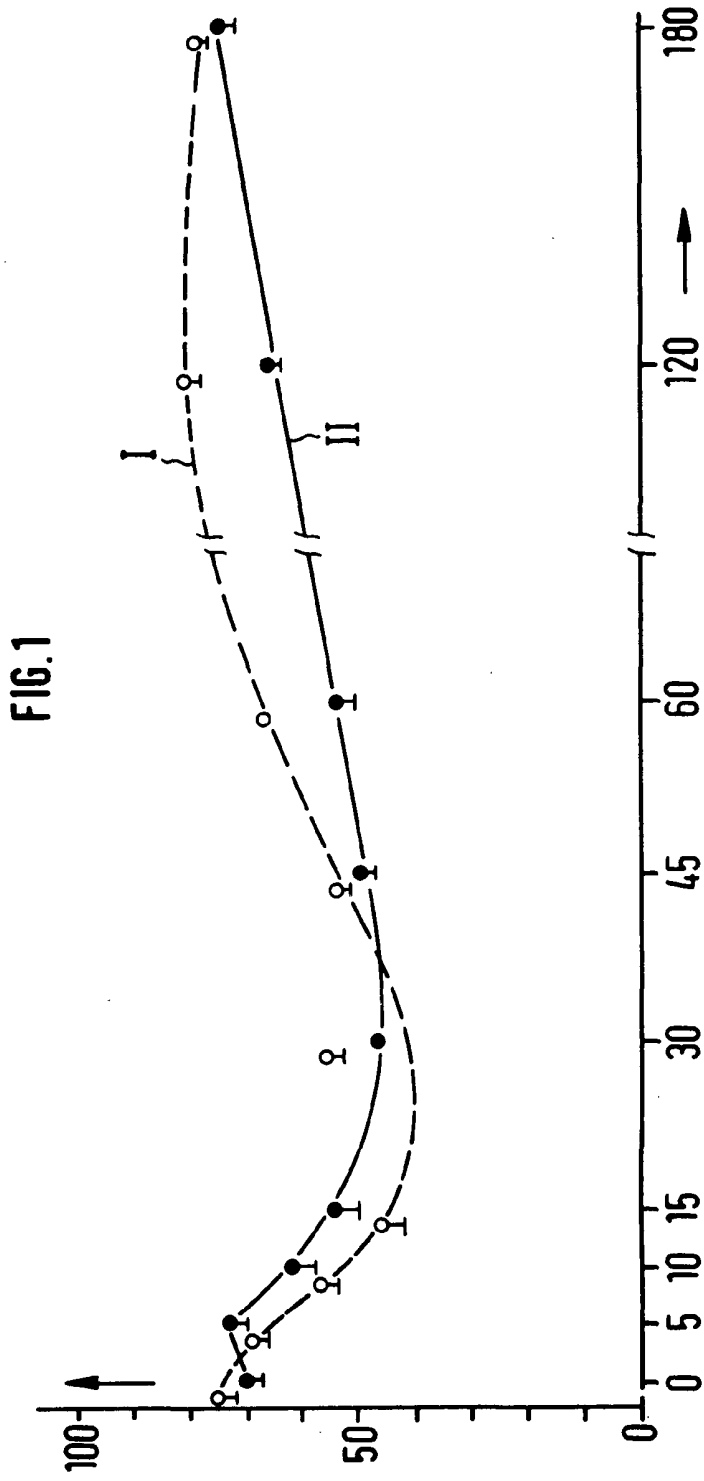


FIG. 2

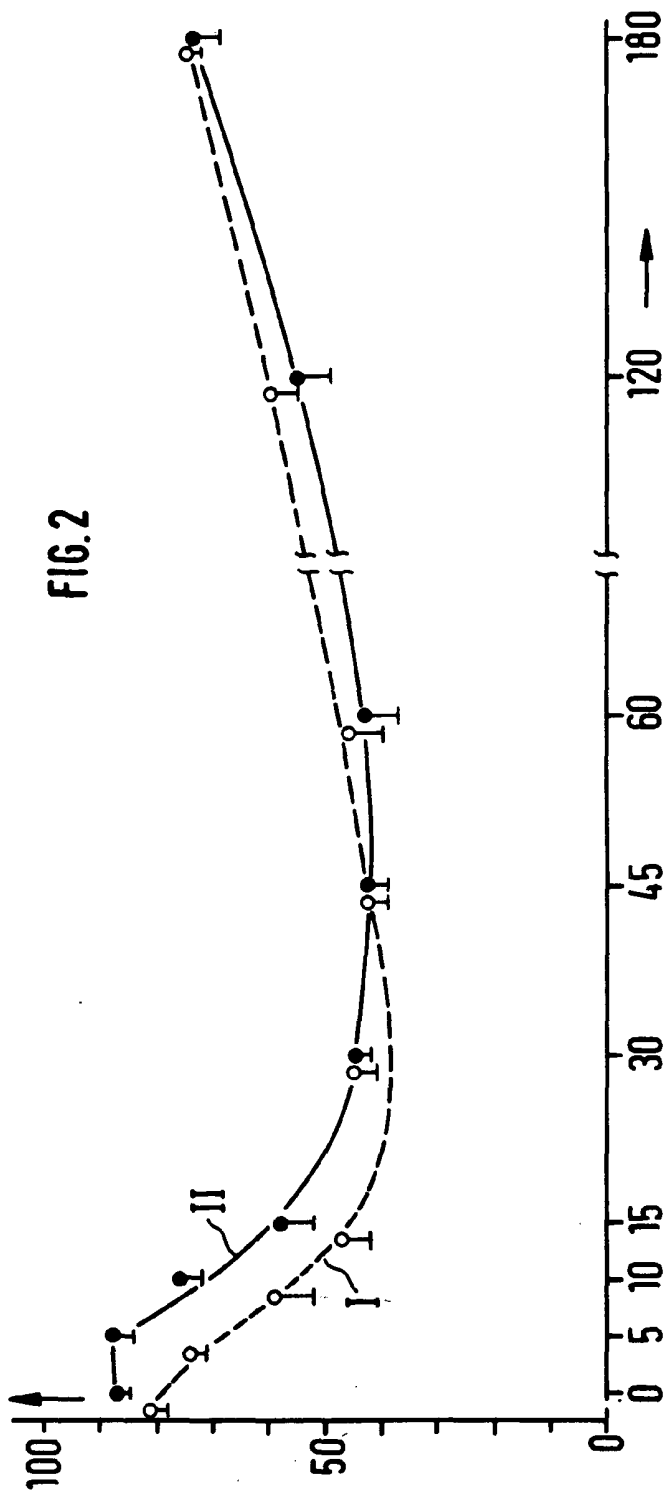


FIG. 3

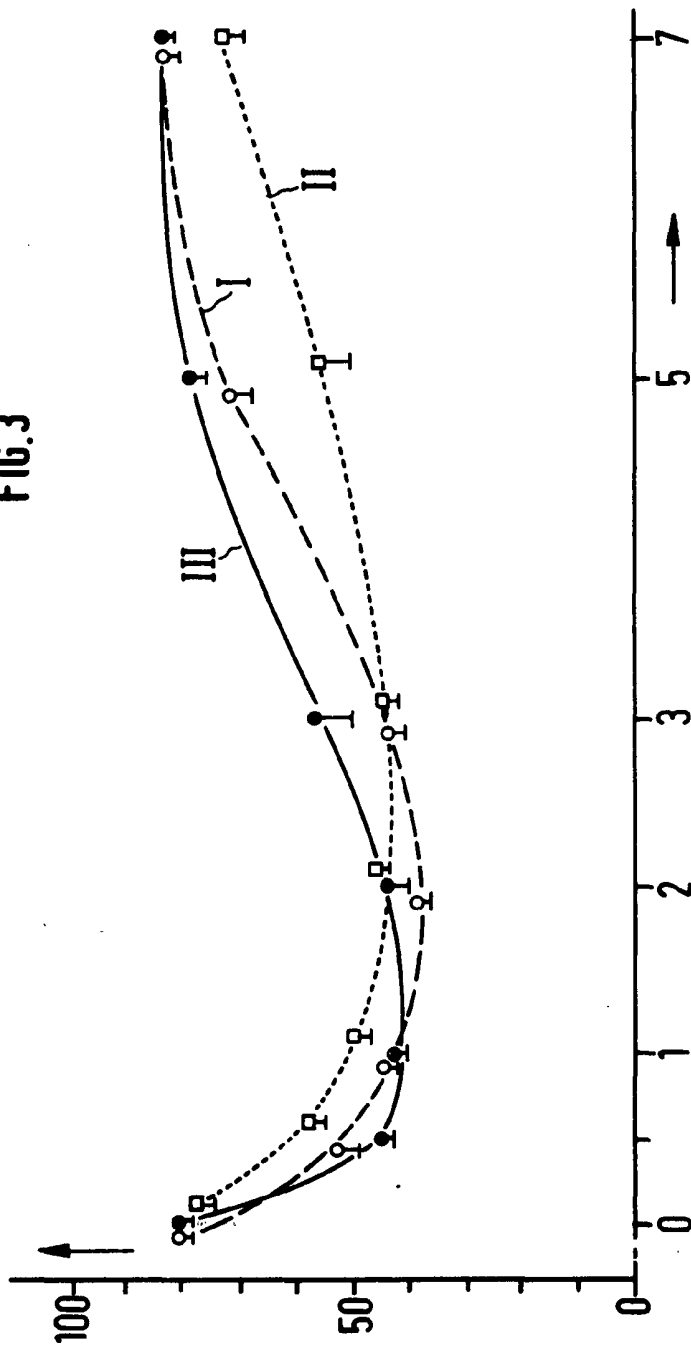
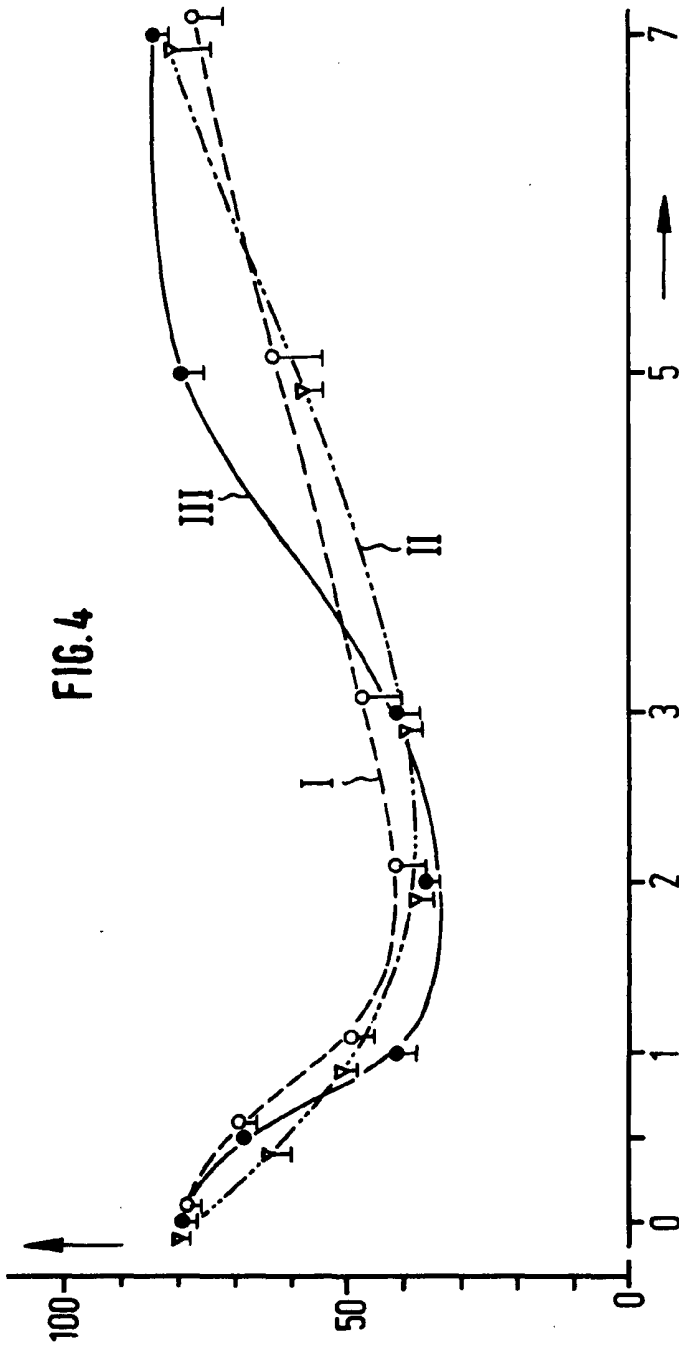


FIG. 4



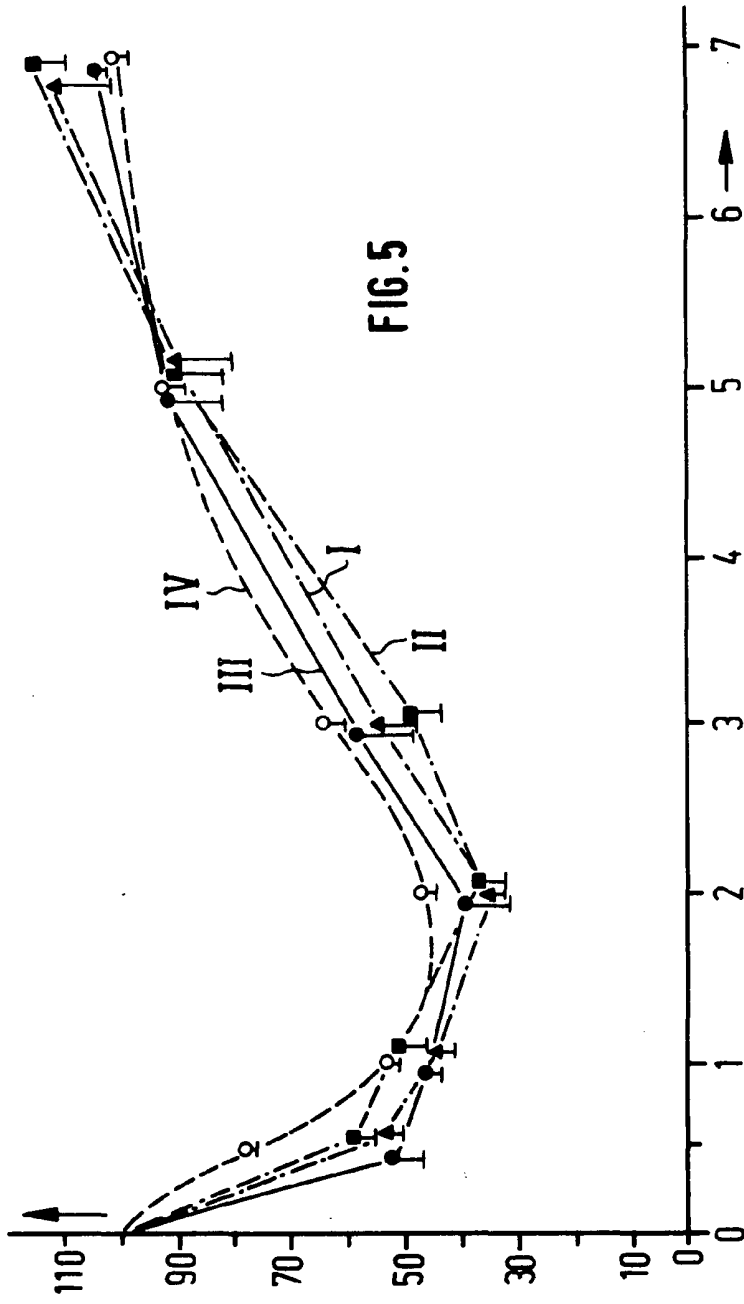


FIG. 6

