



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 657 530 A5

⑤ Int. Cl.4: A 61 K 37/26

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

<p>⑳ Gesuchsnummer: 657/83</p> <p>㉓ Anmeldungsdatum: 04.02.1983</p> <p>㉔ Priorität(en): 05.02.1982 DK 491/82</p> <p>㉕ Patent erteilt: 15.09.1986</p> <p>㉖ Patentschrift veröffentlicht: 15.09.1986</p>	<p>㉗ Inhaber: Novo Industri A/S, Bagsvaerd (DK)</p> <p>㉘ Erfinder: Brange, Jens Jorgen Vejlgard, Klampenborg (DK) Havelund, Svend, Hvidovre (DK)</p> <p>㉙ Vertreter: Dr. A. R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich</p>
--	--

⑤④ **Stabilisierte Insulinlösungen und Verfahren zu ihrer Herstellung.**

⑤⑦ Neuartige pharmazeutische Lösungen gelösten Insulins mit verbesserter physikalischer Stabilität werden durch Zufügen eines im wesentlichen im dissoziierten Zustand vorliegenden Zinksalzes zu einer Lösung in einer Konzentration, die einem Gehalt an Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen, von mehr als $4 \text{ Zn}^{2+}/\text{Insulin-Hexamerem}$ entspricht, hergestellt.

Die neuartigen Insulinlösungen sind insbesondere der Verwendung in Vorrichtungen zur kontinuierlichen Insulin-Abgabe angepasst.

PATENTANSPRÜCHE

1. Insulinlösung, die zur Verwendung bei kontinuierlicher Insulinabgabe dadurch geeignet ist, dass sie unter den Bedingungen einer derartigen Abgabe physikalisch stabil ist, ein die Lösung isotonisch machendes Agens und ein pH-Puffer-Agens aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung ein im wesentlichen im dissoziierten Zustand vorliegendes Zinksalz in einer einem Gehalt an Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen, entsprechenden Konzentration von mehr als $4 \text{ Zn}^{2+}/\text{Insulin-Hexamerem}$ aufweist.

2. Insulinlösung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt an Zinkionen, die dem Insulin in der Lösung zur Verfügung stehen, grösser als $4 \text{ Zn}^{2+}/\text{Insulin-Hexamerem}$ und weniger als $4,8 \text{ Zn}^{2+}/\text{Insulin-Hexamerem}$ ist.

3. Insulinlösung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt an Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen, im Bereich zwischen $4,2$ bis $4,5 \text{ Zn}^{2+}/\text{Insulin-Hexamerem}$ liegt.

4. Insulinlösung gemäss einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Zinksalz Zinkacetat oder Zinkchlorid ist.

5. Insulinlösung gemäss einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie als Konservierungsmittel Phenol und als die Lösung isotonisch machendes Agens Glycerin enthält.

6. Insulinlösung gemäss einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert im Bereich zwischen 7 bis 8 liegt.

7. Insulinlösung gemäss einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Insulinkonzentration im Bereich entsprechend 5 bis 750 , bevorzugt 40 bis 500 internationale Insulineinheiten pro ml liegt.

8. Insulinlösung gemäss einem der vorangehenden Ansprüche, die ferner ein Zink-komplexierendes Agens aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass der Gesamtzinkgehalt mindestens $5 \text{ Zn}^{2+}/\text{Insulin-Hexamerem}$ beträgt.

9. Insulinlösung gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Gesamtzinkgehalt mindestens $6 \text{ Zn}^{2+}/\text{Insulin-Hexamerem}$ beträgt.

10. Insulinlösung gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass sie als Zink-komplexierendes Agens Glyzin oder Zitronensäure aufweist.

11. Insulinlösung gemäss Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Gesamtzinkgehalt in Gegenwart eines schwach komplexierenden Agens im Bereich zwischen 5 bis $8 \text{ Zn}^{2+}/\text{Insulin-Hexamerem}$ beträgt.

12. Insulinlösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Stabilitätsfaktor 5 übersteigt.

13. Insulinlösung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Zinkionengehalt 50 bis 90% des Zinkionengehaltes beträgt, der Ausfallen des Zinkinsulin-Komplexes bewirken würde.

14. Insulinlösung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge Zinkionen 60 bis 90% der Menge Zinkionen beträgt, die Ausfallen des Zinkinsulin-Komplexes bewirken würde.

15. Insulinlösung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge Zinkionen 75% bis 90% der Menge Zinkionen beträgt, die Ausfallen des Zinkinsulin-Komplexes bewirken würde.

16. Verfahren zur Herstellung einer Insulinlösung gemäss einem der vorangehenden Ansprüche, die zur Verwendung bei kontinuierlicher Insulinabgabe dadurch geeignet ist, dass sie unter den Bedingungen der Abgabe stabil ist, ein die Lösung isotonisch machendes Agens und ein pH-Wert-Puffer-Agens aufweist, gekennzeichnet durch Zufügen eines im wesentlichen im dissoziierten Zustand vorliegenden Zinksalzes

in einer Konzentration, die einem Gehalt an Insulin zur Verfügung stehenden Zinkionen von mehr als $4 \text{ Zn}^{2+}/\text{Insulin-Hexamerem}$ entspricht.

5 Die Erfindung betrifft eine Insulinlösung, die zur Verwendung bei kontinuierlicher Insulinabgabe dadurch geeignet ist, dass sie unter den Bedingungen einer derartigen Abgabe physikalisch stabil ist, ein die Lösung isotonisch machendes Agens und ein pH-Puffer-Agens aufweist, sowie ein Verfahren zum Herstellen einer Insulinlösung, die zur Verwendung bei kontinuierlicher Insulinabgabe dadurch geeignet ist, dass sie unter den Bedingungen der Abgabe stabil ist, ein die Lösung isotonisch machendes Agens und ein pH-Wert-Puffer-Agens aufweist.

10 Die Erfindung bezieht sich also auf neuartige stabilisierte Insulinlösungen, die spezifisch für den Einsatz in Vorrichtungen zur kontinuierlichen Insulinabgabe angepasst sind und auf ein Verfahren zur Herstellung derartiger stabilisierter Insulinlösungen.

20 Während der letzten Jahre sind ständig wachsende Bemühungen der Entwicklung tragbarer oder implantierbarer Systeme zur kontinuierlichen Insulininfusion gewidmet worden, wobei das Hauptziel der Bemühungen darin bestand, einem diabetischen Patienten eine Steuerung der Insulingabe zu ermöglichen, welche seinen während eines Tages variierenden physiologischen Anforderungen besser anpassbar ist, als durch konventionelle Insulin-Medikamente möglich ist.

30 Im wesentlichen weist der mechanische Teil einer Vorrichtung zur kontinuierlichen Insulinabgabe Elemente wie ein Insulinreservoir, eine Pumpeinrichtung und einen geeigneten Katheter zur Abgabe des Insulins an dem ausgewählten Ort, üblicherweise entweder subkutan, intravenös oder im Peritoneal-Raum, auf. Die Pumpvorrichtung kann automatisch aktiviert werden und auch mit einer zusätzlichen Steuerung zur Abgabe von Insulin zu Zeiten spezifischer Anforderungen ausgerüstet sein.

35 Falls die Insulinlösung mittels einer Spritze verabreicht wird, wird diese üblicherweise auch als Insulinreservoir dienen. Vorrichtungen des Spritzen-Typs werden im allgemeinen extracorporal getragen. Nichtsdestoweniger sind auch beträchtlich aufwendigere Systeme entwickelt worden, in denen die gesamte mechanische Einheit zur Implantation, üblicherweise subkutan, konstruiert ist. Das Insulinreservoir wird üblicherweise zur perkutanen Wiederauffüllung eingerichtet sein.

40 Die Neigung des Insulins, aus im Handel erhältlichen Lösungen auszufallen und dadurch sowohl mechanische Teile als auch Abgabe-Katheter zu verstopfen, hat sich als Haupthindernis der weiteren Entwicklung und klinischen Anwendung kontinuierlicher Infusionsausrüstungen erwiesen. Ferner gibt es offensichtlich Gründe, zu versuchen, die Grösse jedes Typs kontinuierlicher Abgabe-Systeme zu reduzieren, wodurch ein Bedarf an höher konzentrierten Insulinlösungen, als bisher erhältlich, entstanden, die wiederum die obengenannten Probleme noch schwerwiegender macht.

45 Es wird allgemein angenommen, dass die Erklärung des Präzipitationsphänomens in der Tendenz des Insulins, unlösliche Fasern zu bilden, insbesondere dann, wenn seine Lösungen bei erhöhten Temperaturen über längere Zeiträume aufbewahrt werden, zu suchen ist. Es gibt auch Anzeichen dafür, dass jegliche Bewegung der oder in der Lösung, eingeschlossen beispielsweise die durch ihre Passage durch ein kleines Lumen oder eine kleine Öffnung auftretende Turbulenz, eine Insulin-Fibrillierung hervorruft. Offensichtlich werden Insulinlösungen fast allen oder allen derartigen Einwirkungen in jedem Typ kontinuierlicher Abgabe-Ausrüstungen unterworfen. Die allgemeinen Nachteile von Insu-

lin-Präparationen nach dem Stand der Technik in dieser Hinsicht sind in der Literatur ausführlich dokumentiert, beispielsweise in einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel durch W. D. Loughheed et al. (*Diabetologia* vol. 19, 1980, S. 1–9).

Um dieses Problem zu lösen ist es vorgeschlagen worden, saure Insulinlösungen, die Glutaminsäure oder Asparaginsäure enthalten, zu verwenden (s. *Diabetes* 30, 1981, 83) oder neutrale, einen Zucker, wie Glukose, enthaltende Insulinformulierungen (D. S. Schade et al: *Satellite-Symposium to 16th European Association for the Study of Diabetes-Meeting*, Griechenland, 22–23. September, 1980, S. 107). Ferner ist es vorgeschlagen worden, eine nicht-ionische oberflächenaktive Verbindung einzusetzen (H. Thurow: *Deutsche Patentanmeldung P 29 52 119.5*).

Nichtsdestoweniger ist Insulin in Säure chemisch instabil, sogar unterhalb Körpertemperatur und kann reversibel oder irreversibel mit Kohlehydraten reagieren, s. J. Brange und S. Havelund, «*Properties of Insulin in Solution*», *Proceedings from International Symposium on Artificial Systems for Insulin Delivery*, Assisi, 20.–23. September, 1981, Raven Press (im Druck).

Ferner kann das obengenannte nicht-physiologische oberflächenaktive Agens in Arzneimitteln für den parenteralen Gebrauch als unerwünscht betrachtet werden.

Die Aufgabe der Erfindung besteht also darin, die Nachteile bisher bekannter Insulinlösungen zur Anwendung in Vorrichtungen zur kontinuierlichen Insulinabgabe zu vermeiden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäss durch neuartige Insulinlösungen gelöst, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Lösung ein im wesentlichen im dissoziierten Zustand vorliegendes Zinksalz in einer einem Gehalt an Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen, entsprechenden Konzentration von mehr als 4 Zn^{2+} /Insulin-Hexamerem aufweist.

Ein erfindungsgemässes Verfahren zur Herstellung einer Insulinlösung ist gekennzeichnet durch Zufügen eines im wesentlichen im dissoziierten Zustand vorliegenden Zinksalzes in einer Konzentration, die einem Gehalt an Insulin zur Verfügung stehenden Zinkionen von mehr als 4 Zn^{2+} /Insulin-Hexamerem entspricht.

Erfindungsgemäss werden also neuartige Insulinlösungen vorgeschlagen, in denen Insulin eine beträchtlich geringere Neigung zur Präzipitation unter den Bedingungen zeigt, die in Ausrüstungen zur kontinuierlichen Insulinabgabe vorherrschen, als bei konventionellen Insulinpräparationen vorlag.

Die Erfindung ist auf der Beobachtung begründet, dass Zinkionen bei bestimmten Konzentrationen eine äusserst stabilisierende Wirkung auf neutrale Insulinlösungen ausüben.

Zink ist jahrelang als Kristallisations-beförderndes Metall zur Herstellung von Insulin-Kristallen verwandt worden. Insulin-Kristalle, die für die Herstellung von neutralen Insulinlösungen eingesetzt werden, enthalten daher üblicherweise Zink, siehe beispielsweise das britische Patent 840 870 und das dänische Patent 116 527.

Die Obergrenze für den Zinkgehalt in neutralen Insulinlösungen beträgt etwa 1 Gew.-% Zinkionen (berechnet auf der Grundlage trockener Insulin-Kristalle).

In Gegenwart von Substanzen, die schwach lösliche oder Komplex-Verbindungen mit Zink bilden, können die Präparationen beträchtlich mehr Zink enthalten, falls deren Gehalt an Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen und daraus folgend nicht durch derartige Substanzen gebunden sind, die obengenannte obere Grenze nicht überschreiten.

Falls der Gehalt an Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen, die obengenannte obere Grenze von etwa 1 Gew.-%, entsprechend etwa 5 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem, überschreitet, fallen Zink-Insulin-Komplexe aus der Lösung aus.

Um sicherzustellen, dass ein Ausfallen von Zink-Insulin-Komplexen vermieden wird, ist der Zinkgehalt in handelsüblichen Insulinlösungen stets weit unterhalb der obengenannten oberen Grenze gehalten worden und tatsächlich haben die Untersuchungen des Anmelders aller bekannten neutralen handelsüblichen Insulin-Präparationen gezeigt, dass die Zinkionen-Konzentration etwa 2 bis $3,5 \text{ Zn}^{2+}$ pro Insulin-Hexamerem beträgt.

Nichtsdestoweniger sind, wie aus Fig. 1 ersichtlich, Insulin-Präparationen mit einem Zinkionengehalt von 2 und sogar bis zu 4 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem unter den Bedingungen für die kontinuierliche Insulinabgabe instabil, da Insulin in wenigen Tagen ausfällt.

Es ist daher eine überraschende Beobachtung, dass eine Steigerung des Zinkionengehalts bis zu bestimmten spezifischen Konzentrationen gerade unterhalb der Obergrenze für die Zink-Insulin-Präzipitation von etwa 5 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem unter den obengenannten Bedingungen eine stabilisierende Wirkung auf Insulinlösungen für die kontinuierliche Abgabe ausübt.

Die vorliegende Erfindung liefert eine neuartige Insulinlösung, die sich dadurch für die Verwendung bei kontinuierlicher Insulinabgabe eignet, dass sie physikalisch stabil unter den Bedingungen einer derartigen Abgabe ist und gegebenenfalls ein Konservierungsmittel, ein Lösung isotonisch machendes Agens und ein pH-pufferndes Agens aufweist, wobei diese Lösung dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein im wesentlichen im dissoziierten Zustand vorliegendes Zinksalz in einer Konzentration entsprechend einem Gehalt an Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen, von mehr als 4 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem aufweist.

Unter dem Ausdruck «Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen» sollen Zinkionen verstanden werden, die nicht durch andere Substanzen, wie beispielsweise Citrat, Glycin, oder Phosphat, gebunden sind.

Die Obergrenze für den Zinkionengehalt ist die Menge Zink, die Ausfallen des Zink-Insulin-Komplexes hervorruft, nämlich etwa 5 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem, wie oben angegeben.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung überschreitet der Gehalt an Zink-Ionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen, $4,8 \text{ Zn}^{2+}$ /Insulin-Hexamerem nicht und ist bevorzugt im Bereich $4,2$ bis $4,5 \text{ Zn}^{2+}$ /Insulin-Hexamerem.

Bevorzugte Zn-Salze sind Zinkacetat und Zinkchlorid.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung beschäftigt sich mit der Verwendung von Phenol als Konservierungsmittel und Glycerin als Agens, um die Lösung isotonisch zu machen.

Wie bereits erwähnt, beziehen sich die obengenannten Zinkgehalte auf die Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen. In Gegenwart von Zink-komplexierendem Agens wird etwas Zink durch das komplexierende Agens gebunden. Da nichtsdestoweniger der Gehalt an Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen, immer noch oberhalb 4 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem sein soll, muss mehr Zink zugegeben werden. Demzufolge liegt der Gesamtzinkgehalt in einer ein Zink-komplexierendes Agens aufweisenden Insulin-Präparation mehr oder weniger oberhalb der obengenannten Grenzen, abhängig von der Menge und der Komplexbildungs-Konstante des eingesetzten Komplexbildungs-Agens.

Es ist häufig bevorzugt, ein Zink-komplexierendes Agens

einzusetzen, wodurch ein grösserer Arbeitsbereich für den Gesamtzinkgehalt, auf der Grundlage des Insulingehalts sichergestellt wird. Wenn man beispielsweise annimmt, dass einige Ausrüstungsteile, die für das Reservoir die Pumpeinrichtung, Röhren usf. eingesetzt werden, Zink binden oder freisetzen, würde die Gegenwart eines Zink-komplexierenden Agens sicherstellen, dass das Zinkionen-Niveau, das dem Insulin zur Verfügung steht, sich sicher innerhalb des erfindungsgemässen Bereiches befindet.

Die vorliegende Erfindung liefert daher auch eine neuartige Insulinlösung, die sich für die Verwendung bei kontinuierlicher Insulinabgabe dadurch eignet, dass sie unter den Bedingungen einer derartigen Abgabe physikalisch stabil ist und gegebenenfalls ein Konservierungsmittel, ein die Lösung isotonisch machendes Agens, ein pH-Puffer-Agens aufweist und ferner ein Zink-komplexierendes Agens aufweist, wobei die Lösung dadurch gekennzeichnet ist, dass der Gesamtzinkgehalt mindestens 5 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem beträgt und bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung der Gesamtzinkgehalt mindestens 6 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem beträgt.

Die Zink-komplexierenden Agentien zur Verwendung in den neuartigen Insulinlösungen sollten löslich und physiologisch verträglich sein.

Geeignete Zink-Komplexierung-Agentien sind Aminosäuren, beispielsweise Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Phenylalanin, Prolin, Tryptophan, Asparagin, Glutaminsäure, Histidin und Oligopeptide, wie Diglycin.

Eine weitere Gruppe geeigneter Zink-komplexierender Agentien sind Carbonsäuren, wie Essigsäure oder Hydroxycarbonsäuren, wie Zitronensäure, 3-Hydroxybuttersäure, und Milchsäure.

Bevorzugte Zink-komplexierende Agentien sind Glycin und Zitronensäure. Diglycin und Histidin sind ebenfalls bevorzugt.

Die minimale Gesamtzinkionen-Konzentration, um einen merklichen stabilisierenden Effekt zu erzielen, nämlich einen Stabilitätsfaktor (wie in dem ausführlichen Teil der Beschreibung definiert) im Bereich von 5 bis 10, ist abhängig davon, welches Komplexierungs-Agens eingesetzt wird. Nichtsdestoweniger ist ein Stabilitätsfaktor oberhalb von 10 bevorzugt.

Im Falle eines schwachen Komplexierungs-Agens, beispielsweise von 10 mM Glyzin, wird eine signifikante Stabilisierung bei einem Gesamtzinkgehalt von etwa 5 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem erreicht, siehe Tabelle I und Fig. 2, wobei der bevorzugte Bereich für den Gesamtzinkgehalt zwischen 5 bis etwa 8 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem beträgt.

Tabelle I

Lösungen von 40 IU Schweineinsulin pro ml in 10^{-2} molarer Glyzinlösung mit variierenden Zinkkonzentrationen wurden analog Beispiel 7 hergestellt.

Zink-Konzentration (M)	Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem	Stabilitätsfaktor
$1,0 \cdot 10^{-4}$	2,4	1
$1,8 \cdot 10^{-4}$	4,4	4
$2,0 \cdot 10^{-4}$	4,9	7
$2,2 \cdot 10^{-4}$	5,4	45
$2,6 \cdot 10^{-4}$	6,4	49
$3,4 \cdot 10^{-4}$	8,4	8
$3,8 \cdot 10^{-4}$	9,4	10
$4,0 \cdot 10^{-4}$	9,9	15

+ Gesamtgehalt an Zinkionen.

Wenn ein stärkeres Zink-komplexierendes Agens eingesetzt wird, beispielsweise Zitronensäure, wird ein Gesamtzinkgehalt von zwischen etwa 40 bis 200 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem benötigt, um eine signifikante Stabilisierung zu erzielen, siehe nachfolgende Tabelle II.

Wenn Zitronensäure als Komplexierungs-Agens eingesetzt wird, kann der bevorzugte Gesamtzinkgehalt beim pH-Wert 7,4 in mM durch $0,004 \times A + k \times B$ ausgedrückt werden, wobei A die internationalen Einheiten Insulin pro ml ist und B die millimolare Citrat-Konzentration. k bewegt sich im Bereich zwischen 0,5 bis 1,0, wobei ein k-Wert zwischen etwa 0,7 bis 0,9 bevorzugt ist.

Tabelle II

40 IU Schweineinsulin pro ml wurden analog Beispiel 8 unter Variation der Zink- und Citrat-Konzentrationen hergestellt.

Zink-Konzentration (M)	Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem	Citrat (M)	Stabilitätsfaktor
$1,0 \cdot 10^{-4}$	2	10^{-2}	1
$0,6 \cdot 10^{-2}$	150	10^{-2}	6
$0,8 \cdot 10^{-2}$	200	10^{-2}	10
$0,9 \cdot 10^{-2}$	225	10^{-2}	10
$0,95 \cdot 10^{-2}$	238	10^{-2}	19
$1,0 \cdot 10^{-4}$	2	$2,0 \cdot 10^{-3}$	1
$1,6 \cdot 10^{-3}$	40	$2,0 \cdot 10^{-3}$	6
$1,8 \cdot 10^{-3}$	45	$2,0 \cdot 10^{-3}$	30
$2,0 \cdot 10^{-3}$	50	$2,0 \cdot 10^{-3}$	19

+ Gesamtgehalt an Zinkionen.

Falls ein Zink-komplexierendes Agens eingesetzt wird, ist die Obergrenze des Gesamtzinkgehalts die Menge Zink, die zur Präzipitation des Zinkinsulin-Komplexes führt, nämlich dann, wenn die Menge Zinkionen, die nicht durch das komplexierende Agens gebunden sind, 5 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem übersteigt.

Der hier beschriebene Stabilitätstest ist empfehlenswert, um sicherzustellen, dass die vorgeschlagenen komplexierenden Agentien und deren Konzentrationen die bevorzugten $4,2$ bis $4,5 \text{ Zn}^{2+}$ -Ionen pro Insulinhexamerem zur Verfügung des Insulins lassen. Der Gesamtzinkgehalt in der komplexierenden Agens enthaltenden Insulinlösung wird bei schwachen komplexbildenden Agentien zwischen 5 und 10 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem erwartet, und zwischen etwa 10 bis etwa 200 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem bei Gegenwart von starken Komplexbildnern.

Zusätzlich zum Stabilitätstest kann die Obergrenze für den Gesamtzinkgehalt, nämlich der Zinkgehalt, der Ausfällen des Zink-Insulinkomplexes bewirkt, eingesetzt werden, um die Menge Gesamtzink in der komplexierenden Agens enthaltenden Insulinlösung zu bestimmen, wodurch eine wesentliche Stabilitätssteigerung erzielt werden kann.

Nach den Erfahrungen des Erfinders kann erwartet werden, dass der Gesamtzinkionengehalt in der komplexierenden Agens enthaltenden Insulinlösung zwischen etwa 50 bis etwa 90% der Menge Zinkionen beträgt, die Ausfällen des Zink-Insulinkomplexes bewirken würde.

Die Gesamtzinkionenmenge beträgt bevorzugt zwischen etwa 60 bis etwa 90%, besonders bevorzugt zwischen etwa 75 bis etwa 90% der Menge Zinkionen, die Ausfällen des Zink-Insulinkomplexes bewirken würde.

Neutrale Insulin-Präparationen, die komplexierende Agentien oder Puffer enthalten, die Komplexe mit Zink bilden, sind aus dem obengenannten dänischen Patent Nr.

116 527 und der dänischen Patentanmeldung Nr. 1851/80 bekannt. Nichtsdestoweniger ist der höchste bisher beschriebene Zinkgehalt 1% Zink, berechnet zum Trockengewicht von Insulin, siehe Beispiele 2 und 6. Die Anmelder haben diese beiden Beispiele reproduziert, siehe die nachfolgenden Beispiele 9 und 10. Aus diesem folgt, dass die bekannten Präparationen Stabilitätsfaktoren von lediglich 3,5 und 1 zeigen.

Die Insulin-Konzentration der Lösung ist bevorzugt im Bereich zwischen 5 und 750 I. U. und besonders bevorzugt zwischen 40 bis 500 I. U. pro ml.

Die vorliegende Erfindung weist auch ein Verfahren zur Herstellung neuartiger Insulinlösungen auf, die zum Einsatz bei kontinuierlicher Insulinabgabe dadurch geeignet sind, dass sie physikalisch unter den Bedingungen einer derartigen Abgabe stabil sind und gegebenenfalls ein Konservierungsagens, ein die Lösung isotonisch machendes Agens und ein pH-pufferndes Agens aufweisen, wobei das Verfahren durch Zugabe eines im wesentlichen dissoziierten Zinksalzes in einer einem Gehalt an Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen, von mehr als 4 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem entsprechenden Konzentration charakteristisch ist.

Ein Beispiel der Herstellung der erfindungsgemässen Insulinlösungen weist Auflösen von kristallinem Zink-Insulin, beispielsweise eines hochgereinigten Insulins, wie «Monokomponenten»-Insulins (siehe britisches Patent Nr. 1 285 023) in Wasser in Gegenwart von Säure, beispielsweise Salzsäure, auf. Eine wässrige Lösung des Konservierungsagens, beispielsweise Phenol oder ein Alkylphenol, wie Cresol, oder Methylparahydroxybenzolat, wird getrennt davon hergestellt, und enthält auf Wunsch ebenfalls ein den osmotischen Druck steuerndes Agens, wie Glycerin, bevorzugt in einer derart berechneten Menge, um die endgültige Lösung isotonisch zu machen und (falls erwünscht) ein Zink-komplexierendes Agens, wie Citrat oder Glyzin. Diese Lösung wird sodann zur saueren Insulinlösung, gefolgt durch Zugabe einer Base, beispielsweise einer Natriumhydroxid-Lösung, gegeben, um den pH-Wert auf Neutralität einzustellen. In dieser Beschreibung soll Neutralität als ein pH-Wert im Bereich von zwischen etwa 7 bis etwa 8 verstanden werden. Die berechnete Menge Zinksalz, wie Zinkacetat; Pufferagens (falls erwünscht), wie TRIS; und ein Zink-komplexierendes Agens können in dieser Stufe zugegeben werden, gefolgt durch Wiedereinstellung des pH-Wertes. Alternativ dazu, kann das Zinksalz vor der Neutralisation in die saure Insulinlösung eingebracht werden. Die entstehende Lösung wird anschliessend auf das berechnete Volumen mit Wasser aufgefüllt, durch Filtration sterilisiert und anschliessend in sterile Gefässe überführt.

Die vorliegende Erfindung liefert ein Verfahren zum Infundieren von Insulin in Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass die dafür eingesetzte Insulin-Präparation eine dem Anspruch 1 entsprechende Insulin-Präparation ist.

Stabilitätstest

Die derart hergestellten Insulinlösungen werden einem Stabilitätstest unter erzwungenen Bedingungen in folgender Weise unterworfen:

Ampullen (12,5 ml Fassungsvermögen), die die Testprobe (10 ml) enthielten und jeweils mit einer Gummikappe ausgerüstet waren, werden vertikal auf einer Schüttel-Plattform (Typ 01 T623TBSH02, geliefert durch HETO, Birkerød, Dänemark), die vollständig in einem bei $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehaltenem Wasserbad eingetaucht ist, gesetzt. Die Plattform wurde horizontalen Schüttelbewegungen mit einer Frequenz von 100 Umdrehungen pro Minute und einer Amplitude von 50 mm unterworfen.

Die Trübung der Testproben wurde in regelmässigen Zeitabständen auf einem Fischer DRT 1000 Nephelometer überprüft, der mit einem Adapter für Ampullen ausgerüstet war. Die Fibrillationszeit ist als der Zeitraum definiert, in der die Testprobe eine Trübung von 10 nephelometrischen Trübungseinheiten (NTU) entwickelt.

Jeder Test wird mit Testproben und Kontrollproben ohne zugegebenes Zinksalz (jeweils 4 bis 5 Ampullen) durchgeführt, die nebeneinander behandelt wurden. Die Kontrollproben entsprechen den Testproben, ausser dass anstatt 2 Zn^{2+} pro Insulin-Hexamerem der Zinkionengehalt in den Kontrollproben von der Insulin-Kristallisation stammt. Der Stabilitätsfaktor wird als das Verhältnis der durchschnittlichen Fibrillationszeit der Testproben zu derjenigen der Kontrollproben berechnet.

Die Erfindung wird nun in weiteren Einzelheiten unter Bezugnahme auf die begleitenden Zeichnungen erläutert, wobei:

Fig. 1 den Stabilitätsfaktor bei $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ als Funktion der Zinkionenkonzentration (100 UI Schweineinsulin pro ml, hergestellt gemäss Beispiel 1) und

Fig. 2 den Stabilitätsfaktor bei $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ als Funktion des Gesamtzinkionengehaltes in Gegenwart eines schwach komplexierendes Agens (40 IU Schweineinsulin pro ml in 10 mM Glycin, analog Beispiel 7 hergestellt), zeigt.

Aus Fig. 1 ergibt sich, dass die Stabilität der Insulinlösung drastisch bei einem Zinkionengehalt von oberhalb 4 Zn^{2+} /Insulinhexamerem ansteigt.

In Gegenwart eines schwach komplexierenden Agens wird ein wesentliches Anwachsen der Stabilität bei einem höheren Zinkionengehalt erzielt, nämlich bei etwa 5 Zn^{2+} /Insulinhexamerem, da einiges Zink durch das Komplexierungsagens gebunden ist, und dementsprechend nicht dem Insulin zur Verfügung steht.

Weitere Einzelheiten der Durchführung der vorliegenden Erfindung werden anhand der nachfolgenden Beispiele erklärt, sie sollen jedoch nicht derart betrachtet werden, dass sie irgendwelche Begrenzungen hinsichtlich des Schutzbereiches der Erfindung auferlegen.

In den Beispielen wurden die wässrige Lösung und das Wasser sterilisiert, erstere durch Filtration, und die nachfolgenden Behandlungen wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

Beispiel 1

100 I. U. Schweineinsulin pro ml, mit einem Gehalt von 4,2 Zn^{2+} /Insulinhexamerem

Kristallines Monokomponenten-Schweineinsulin (264 mg), welches 0,4% Zink enthielt und eine Gesamtkativität von 10 000 I. U. besass, wurde in Wasser gelöst (50 ml), das Salzsäure (325 μl N) enthielt, gefolgt durch Zugabe einer wässrigen Lösung (25 ml), die Glycerin (1,6 g) und Phenol (200 mg) enthielt. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,5 mittels einer Natriumhydroxidlösung eingestellt. Zinkacetat (1,56 ml einer 10 mM Lösung) wurde zugegeben, der pH-Wert auf 7,5 wiedereingestellt und das Gesamtvolumen auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt. Die resultierende Lösung wurde durch Filtration sterilisiert und anschliessend aseptisch in Ampullen (10 ml) abgefüllt.

Stabilitätsfaktor: > 15.

Beispiel 2

500 I. U. Schweineinsulin pro ml, mit einem Gehalt von 4,2 Zn^{2+} /Insulinhexamerem

Kristallines Monokomponenten-Schweineinsulin (20,75 g), das 0,4% Zink enthielt und eine Gesamtkativität von 550 000 I. U. besass, wurde in Wasser (550 ml) gelöst, das Salzsäure enthielt (10 ml normaler Salzsäure). Zu einem

Teil dieser Lösung (50 ml) wurde Zinkacetat (78 µl einer molaren Lösung) gegeben, gefolgt durch Zugabe einer wässrigen Lösung (25 ml), die Glycerin (1,6 g) und Phenol (200 mg) enthielt.

Der pH-Wert der Lösung wurde mittels einer Natriumhydroxidlösung auf 7,4 eingestellt und das Gesamtvolumen mittels Wasser auf 100 ml. Die entstehende Lösung wurde filtrationssterilisiert und anschliessend aseptisch in Ampullen (10 ml) überführt.

Stabilitätsfaktor: 5.

Beispiel 3

100 I. U. Humaninsulin pro ml mit einem Gehalt von 4,3 Zn^{2+} /Insulinhexamerem

Kristallines Monokomponenten-Humaninsulin (1,67 g), mit einem Gehalt von 0,4% Zink und einer Gesamtaktivität von 45 000 I. U. wurde in Wasser (225 ml), das Salzsäure (1,46 ml normaler Salzsäure) enthielt, gelöst. Zu einem Teil dieser Lösung (25 ml) wurde Zinkacetat (100 µl einer 0,1 M Lösung) gegeben, gefolgt durch Zugabe einer wässrigen Lösung (10 ml), die Glycerin (0,8 g) und Phenol (0,1 g) enthielt. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,4 mittels einer Natriumhydroxidlösung eingestellt und das Volumen auf 50 ml mit Wasser aufgefüllt. Die resultierende Lösung wurde filtrationssterilisiert und anschliessend aseptisch in Ampullen (10 ml) überführt.

Stabilitätsfaktor: 26.

Beispiel 4

100 I. U. Schweineinsulin pro ml, mit einem Gehalt an 4,5 Zn^{2+} /Insulinhexamerem

Das Verfahren wurde analog demjenigen des Beispiels 1 durchgeführt, ausser dass 1,89 ml einer 10 mM Zinkacetatlösung zugegeben wurde, wodurch eine Menge von 4,5 Zn^{2+} /Insulinhexamerem zur Verfügung gestellt wurde.

Stabilitätsfaktor: > 33

Beispiel 5

40 I. U. Humaninsulin pro ml, die 4,2 Zn^{2+} /Insulinhexamerem enthalten

Kristallines Monokomponenten-Humaninsulin (741 mg), das 0,4% Zink enthielt und eine Gesamtaktivität von 20 000 I. U. besass, wurde in Wasser (60 ml) gelöst, das Salzsäure (640 µl normaler Salzsäure) und Zinkacetat (3,96 ml 0,01 M Lösung) enthielt. Eine wässrige Lösung (400 ml) von Phenol (1 g) und Glycerin (8 g) wurde zugegeben, schliesslich der pH-Wert auf 7,45 durch Natriumhydroxidlösung eingestellt und das Volumen auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde filtrationssterilisiert und anschliessend aseptisch in Ampullen abgefüllt (10 ml).

Stabilitätsfaktor: 34

Beispiel 6

100 I. U. Humaninsulin pro ml, die 4,2 Zn^{2+} /Insulinhexamerem in 10^{-2} molarer TRIS-Lösung enthielten

Kristallines Monokomponenten-Humaninsulin (1852 mg), welches 0,4% Zink enthielt und eine Gesamtaktivität von 50 000 I. U. besass, wurde in Wasser (60 ml), welches Salzsäure (1600 µl normaler Salzsäure) und Zinkacetat (99 µl einer molaren Lösung) enthielt, aufgelöst. Eine wässrige Lösung (400 ml) von Phenol (1 g) und Glycerin (8 g) wurde zugegeben und schliesslich der pH-Wert auf 7,45 mittels TRIS (606 mg) und Natriumhydroxidlösung eingestellt und

das Volumen auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt. Die entstehende Lösung wurde filtrationssterilisiert und anschliessend aseptisch in Ampullen (10 ml) überführt.

Stabilitätsfaktor: 16

Beispiel 7

40 I. U. Schweineinsulin pro ml in einer Lösung, die $2,6 \cdot 10^{-4}$ molar Zink und 10^{-2} molar an Glycin war Kristallines Monokomponenten-Schweineinsulin (1,49 g), welches 0,4% Zink enthielt und eine Gesamtaktivität von 40 000 I. U. besass, wurde in Wasser (120 ml) gelöst, das Salzsäure (1280 ml normaler Salzsäure) enthielt, gefolgt durch Zugabe einer wässrigen Lösung (730 ml) von Phenol (2 g), Glycerin (8 g) und Glycin (751 mg). Der pH-Wert wurde auf 7,5 mittels Natriumhydroxidlösung eingestellt. Zinkacetat (160 µl einer molaren Lösung) wurde zugegeben, der pH-Wert auf 7,5 wiedereingestellt und das Volumen auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml mit Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde filtrationssterilisiert und anschliessend aseptisch in Ampullen (10 ml) überführt.

Stabilitätsfaktor: 63

Beispiel 8

40 I. U. Schweineinsulin pro ml einer $1,8 \cdot 10^{-3}$ molaren Zink- und $2 \cdot 10^{-3}$ molaren Citrat-Lösung Kristallines Monokomponenten-Schweineinsulin (746 mg), welches 0,4% Zink enthielt und eine Gesamtaktivität von 20 000 I. U. besass, wurde in Wasser (60 ml) gelöst, welches Salzsäure (640 µl normaler Salzsäure) enthielt. Eine wässrige Lösung (400 ml) von Phenol (1 g) und Glycerin (8 g) wurde zugegeben und der pH-Wert auf 7,5 mittels Natriumhydroxidlösung eingestellt. Zitronensäure (210 mg des Monohydrats) und Zinkacetat (850 µl einer molaren Lösung) wurde zugegeben und der pH-Wert auf 7,5 wiedereingestellt. Die Lösung wurde durch Filtration sterilisiert und anschliessend aseptisch in Ampullen überführt (10 ml).

Stabilitätsfaktor: 30

Beispiel 9 (Vergleich)

40 I. U. Rinderinsulin pro ml in einer 13,3 mM Lösung von Natriumphosphat (Gesamtzink: 1%, ~ etwa 5,5 Zn^{2+} /Insulinhexamerem)

Das Beispiel 2 des dänischen Patentes Nr. 116 527 wurde wiederholt. Der Zinkgehalt wurde auf etwa 5,5 Zn^{2+} /Insulin-Hexamerem durch Zugabe von Zinkacetat eingestellt und der pH auf 6,91 wiedereingestellt. Die Lösung wurde filtrationssterilisiert und anschliessend aseptisch in Ampullen (10 ml) überführt.

Stabilitätsfaktor: 3,5

Beispiel 10 (Vergleich)

40 I. U. Rinderinsulin pro ml in einer 10 mM Citratlösung. (Gesamtzink 1%, ~ etwa 5,5 Zn^{2+} /Insulinhexamerem).

Beispiel 6 des dänischen Patentes Nr. 116 527 wurde wiederholt. Der Zinkgehalt wurde auf etwa 5,5 Zn^{2+} /Insulinhexamerem durch Zugabe von Zinkacetat eingestellt und der pH auf 7,5 wiedereingestellt. Die Lösung wurde filtrationssterilisiert und anschliessend aseptisch in Ampullen (10 ml) überführt.

Stabilitätsfaktor: 1

FIG. 1
 40 IU SCHWEINE-INSULIN PRO ML IN 10 mM GLYCIN
 Stabilitäts-Faktor

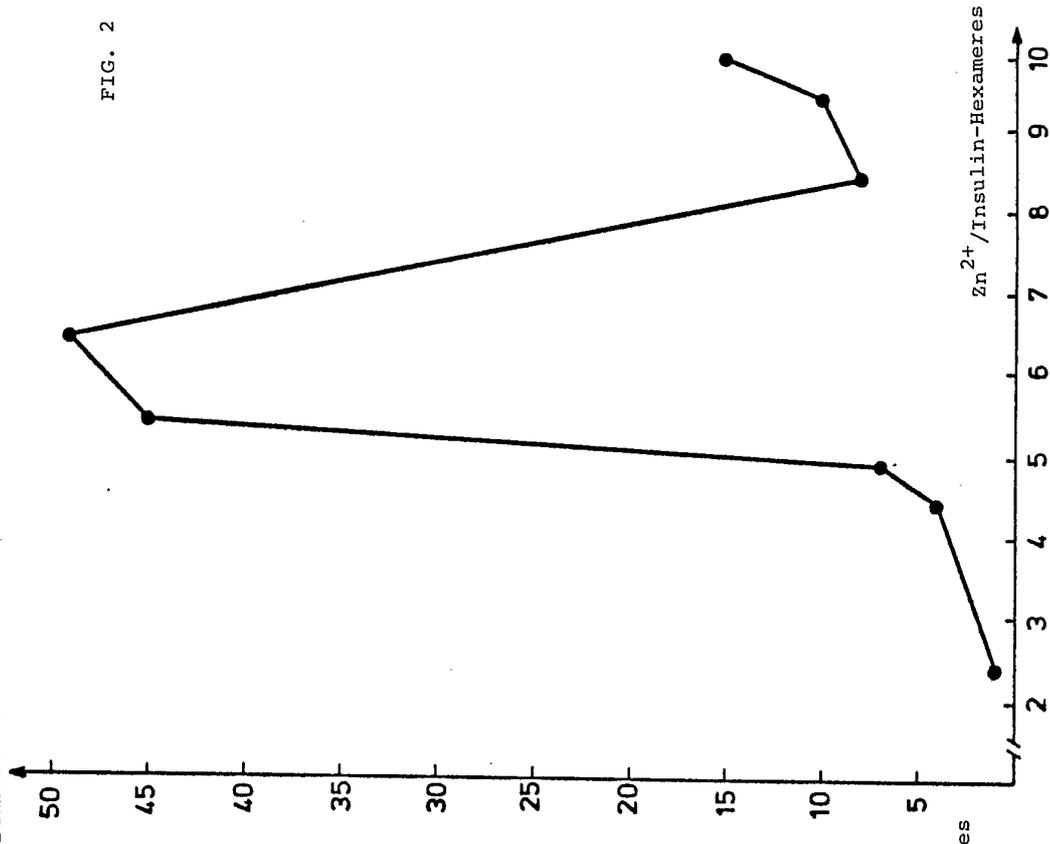


FIG. 2

100 IU SCHWEINEINSULIN PRO ML

