(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 32 884 T2** 2004.09.02

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 748 213 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 32 884.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/01563**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 909 506.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/024183**
(86) PCT-Anmeldetag: **07.02.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.09.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.12.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **14.04.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.09.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 9/12**
A61K 38/28, A61K 9/72

(30) Unionspriorität:

207472	**07.03.1994**	**US**
383475	**01.02.1995**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Nektar Therapeutics, San Carlos, Calif., US

(74) Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

(72) Erfinder:
PATTON, John S., San Carlos, US; FOSTER, Linda C., Sunnyvale, US; PLATZ, Robert M., Half Moon Bay, US

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND MITTEL ZUR VERABREICHUNG VON INSULIN ÜBER DIE LUNGE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Verfahren und Zusammensetzungen für die respiratorische Verabreichung von Insulin an Diabetespatienten. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Verabreichung von trockenen Insulinpulverpräparationen über die Lunge für eine schnelle systemische Absorption durch die Lungen.

[0002] Insulin ist ein Polypeptidhormon mit 50 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 6000, das in den β-Zellen des Pankreas von normalen (nicht diabetischen) Individuen erzeugt wird. Insulin ist notwendig für die Regelung des Kohlenhydrat-Metabolismus durch Verringerung der Blutglucosespiegel, und ein systemischer Mangel verursacht Diabetes. Das Überleben von Diabetespatienten hängt von der regelmäßigen und dauerhaften Verabreichung von Insulin ab, um akzeptable Blutglucosespiegel aufrechtzuerhalten.

[0003] Insulin wird am häufigsten durch subkutane Injektion verabreicht, normalerweise in den Bauch oder in die obere Oberschenkelregion. Um akzeptable Blutglucosespiegel aufrechtzuerhalten ist es oft notwendig, Insulin mindestens einmal oder zweimal täglich zu injizieren, wobei zusätzliche Injektionen von schnell wirkendem Insulin verabreicht werden, falls nötig. Eine aggressive Behandlung von Diabetes kann sogar noch häufigere Injektionen erfordern, wobei der Patient unter Verwendung von diagnostischen Kits für Zuhause die Blutglucosespiegel sorgfältig überwacht. Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Verabreichung von schnell wirkenden Insulinen, welche Seruminsulinpeaks innerhalb einer Stunde und Glucoseminima innerhalb von 90 Minuten bereitstellen können.

[0004] In vielerlei Hinsicht ist die Verabreichung von Insulin mittels Injektion unerwünscht. Zunächst finden es viele Patienten schwierig und belastend, sich so häufig wie nötig zu injizieren, um akzeptable Blutglucosespiegel zu erhalten. Ein solcher Widerwille kann zu einem Nichtbefolgen führen, welches in den schwersten Fällen lebensbedrohend sein kann. Außerdem ist die systemische Absorption von Insulin aus einer subkutanen Injektion relativ langsam, häufig erfordert sie von 45 bis 90 Minuten, sogar wenn schnell wirkende Insulinformulierungen verwendet werden. Somit ist es seit langem ein Ziel gewesen, alternative Insulinformulierungen und Verabreichungswege bereitzustellen, die den Bedarf zur Selbstinjektion vermeiden und die eine schnelle systemische Verfügbarkeit des Insulins bereitstellen können.

[0005] Es ist eine Vielzahl solcher alternativer Wege der Insulinverabreichung vorgeschlagen worden, einschließlich der intranasalen, intrarektalen und intravaginalen Verabreichung.

[0006] Obwohl diese Verfahren die Unbequemlichkeit und schlechte Compliance vermeiden, welche mit einer subkutanen Injektion verbunden ist, leiden sie jeweils an ihren eigenen Beschränkungen. Eine intrarektale und intravaginale Verabreichung ist beschwerlich, unkomfortabel und Letzteres ist nicht für die gesamte Diabetespopulation verfügbar. Eine intranasale Verabreichung wäre bequem und wahrscheinlich weniger unangenehm als eine Injektion, erfordert aber die Verwendung von potenziell toxischen "Penetrationsverstärkern", um die Passage von Insulin über die Nasenschleimhaut zu bewirken, welche durch eine dicke Epithelschicht gekennzeichnet ist, die gegenüber der Passage von Makromolekülen resistent ist. Von besonderem Interesse für die vorliegende Erfindung ist die Insulinverabreichung über die Lunge, wobei ein Patient eine Insulinformulierung inhaliert und eine systemische Absorption durch die dünne Schicht der Epithelzellen in den Alveolarregionen der Lunge auftritt. Solch eine Insulinverabreichung über die Lunge scheint eine schnellere systemische Verfügbarkeit bereitzustellen als eine subkutane Injektion und vermeidet die Verwendung einer Nadel. Die Insulinverabreichung über die Lunge muss allerdings noch eine breite Akzeptanz erreichen. Bisher ist die Verabreichung über die Lunge meistens durch die Vernebelung von flüssigen Insulinformulierungen erreicht worden, was die Verwendung von unhandlichen Zerstäubern erfordert. Außerdem besitzen die durch solche Zerstäuber gebildeten Aerosole eine sehr geringe Insulinkonzentration, was eine große Anzahl an Inhalationen erfordert, um eine ausreichende Dosierung bereitzustellen. Die Insulinkonzentration ist beschränkt aufgrund der geringen Löslichkeit von Insulin in geeigneten wässrigen Lösungen. In einigen Fällen können bis zu 80 oder mehr Atemzüge erforderlich sein, um eine ausreichende Dosierung zu erreichen, was eine Verabreichungsdauer von 10 bis 20 Minuten oder mehr ergibt.

[0007] Es wäre wünschenswert, verbesserte Verfahren und Zusammensetzungen für die Insulinverabreichung über die Lunge bereitzustellen. Es wäre insbesondere wünschenswert, wenn solche Verfahren und Zusammensetzungen in ausreichendem Maße geeignet wären, um eine Selbstverabreichung, sogar weg von Zuhause, zu erlauben und wenn sie eine erwünschte Gesamtdosis mit einer relativ geringen Anzahl an Atemzügen, bevorzugt weniger als zehn, bereitstellen könnten. Solche Verfahren und Zusammensetzungen sollten ebenso eine schnelle systemische Absorption des Insulins bereitstellen, bevorzugt sollte ein Serumpeak innerhalb von 45 Minuten oder weniger erreicht werden und ein resultierendes Glucoseminimum sollte innerhalb einer Stunde oder weniger erreicht werden. Solch schnell wirkende Formulierungen sind bevorzugt für die Ver-

wendung bei aggressiven Behandlungsprotokollen geeignet, wobei die Injektion von mittelfristig und langfristig wirkendem Insulin verringert oder eliminiert werden kann. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sollten auch stabil sein, bevorzugt aus einer konzentrierten trockenen Pulverformulierung bestehen.

2. Beschreibung des Standes der Technik

[0008] Die respiratorische Verabreichung von vernebelten wässrigen Insulinlösungen wird in einer Anzahl von Referenzen beschrieben, beginnend mit Gänsslen (1925) Klin. Wochenschr. 4: 71, einschließlich Laube et al. (1993) JAMA 269: 2106-21-9; Elliott et al. (1987) Aust. Paediatr. J. 23: 293–297; Wigley et al. (1971) Diabetes 20: 552–556. Corthorpe et al. (1992) Pharm Res 9: 764–768; Govinda (1959) Indian J. Physiol. Pharmacol. 3: 161–167; Hastings et al. (1992) J. Appl. Physiol. 73: 1310–1316; Liu et al (1993) JAMA 269: 2106–2109; Nagano et al. (1985) Jikeikai Med. J. 32: 503–506; Sakr (1992) Int. J. Phar. 86: 1–7; und Yoshida et al. (1987) Clin. Res. 35: 160–166. Die Verabreichung über die Lunge von trockenen Pulverarzneimitteln wie etwa Insulin in einem Trägervehikel mit großen Partikeln wird im U.S. Patent Nr. 5,254,330 beschrieben. Ein Inhaliergerät für eine abgemessene Dosis (MDI, "metered dose inhaler") für die Verabreichung von kristallinem Insulin, welches in einem Treibmittel suspendiert ist, wird von Lee und Sciara (1976) J. Pharm. Sci 65: 567–572 beschrieben. Ein MDI zur Verabreichung von Insulin in einen Spacer zur Regulierung der Inhalationsfließrate wird im U.S. Patent Nr. 5,320,094 beschrieben. Die intrabronchiale Verabreichung von rekombinantem Insulin wird kurz in Schlüter et al. (Abstract) (1984) Diabetes 33: 75A und in Köhler et al. (1987) Atemw. Lungenkrkh. 13: 230–232 beschrieben. Eine intranasale und respiratorische Verabreichung einer Vielzahl von Polypeptiden einschließlich Insulin in Gegenwart eines Verstärkers werden im U.S. Patent Nr. 5,011,678 und von Nagai et al. (1984) J. Contr. Rel. 1: 15–22 beschrieben. Die intranasale Verabreichung von Insulin in Gegenwart von Verstärkern und/oder enthalten in Formulierungen zur gesteuerten Freisetzung werden in den U.S. Patenten Nr. 5,204,108; 4,294,829; und 4,153,689; den PCT-Anmeldungen WO 93/02712, WO 91/02545, WO 90/09780 und WO 88/04556, dem britischen Patent 1,527,605; Rydenund Edman (1992) Int. J. Pharm. 83: 1–10; und Björk und Edman (1988) Int. J. Pharm. 47: 233–238 beschrieben. Die Herstellung und Stabilität von amorphem Insulin wurden von Rigsbee und Pikal bei der "American Association of Pharmaceutical Sciences" (AAPS) am 14.–18. November 1993 in Lake Buena Vista, Florida beschrieben. Verfahren zum Sprühtrocknen eines Polypeptids, Polynukleotids oder anderen labilen Arzneimitteln in einem Träger, welcher eine amorphe Struktur bildet, die das Arzneimittel stabilisiert, werden in der europäischen Patentanmeldung 520 748 beschrieben.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Gemäß der vorliegenden Erfindung stellen Verfahren und Zusammensetzungen für die Vernebelung und systemische Verabreichung von Insulin an einen Säugetierwirt, insbesondere einen menschlichen Patienten, welcher an Diabetes leidet, eine schnelle Absorption in die Blutzirkulation bereit, wobei eine subkutane Injektion vermieden wird. Insbesondere betreffen die erfindungsgemäßen Verfahren die Insulinverabreichung über die Lunge in Form eines trockenen Pulvers. Überraschenderweise ist gefunden worden, dass inhalierte trockene Insulinpulver in den Alveolarregionen der Lunge abgelagert werden und schnell durch die Epithelzellen der Alveolarregion in die Blutzirkulation absorbiert werden. Somit kann die Verabreichung von Insulinpulvern über die Lunge eine wirksame Alternative zur Verabreichung durch eine subkutane Injektion darstellen.

[0010] In einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird Insulin als ein trockenes Pulver, normalerweise aber nicht notwendigerweise in einem im Wesentlichen amorphen Zustand bereitgestellt und in einem Luftstrom oder einem Strom eines anderen physiologisch akzeptablem Gases dispergiert, um ein Aerosol zu bilden. Das Aerosol wird in einer Kammer mit einem Mundstück eingefangen, wo es für eine nachfolgende Inhalation durch einen Patienten verfügbar ist. Gegebenenfalls wird das trockene Insulinpulver mit einem pharmazeutisch akzeptablen Trockenpulverträger kombiniert, wie es unten ausführlicher beschrieben wird. Das Insulinpulver umfasst bevorzugt Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 10 μm, mehr bevorzugt weniger als 7,5 μm und am meisten bevorzugt weniger als 5 μm, normalerweise im Bereich von 0,1 μm bis 5 μm. Überraschenderweise ist gefunden worden, dass die erfindungsgemäßen trockenen Insulinpulverzusammensetzungen in der Lunge ohne Verwendung von Penetrationsverstärkern absorbiert werden, wie etwa solche, welche für eine Absorption durch die Nasenschleimhaut und die oberen Atemwege erforderlich sind.

[0011] In einem zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Insulinzusammensetzungen bereit, welche im Wesentlichen aus trockenem Insulinpulver bestehen, mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von weniger als 10 μm, welche mit pharmazeutischen Trockenpulverträgern kombiniert werden können. Die Insulinzusammensetzung ist bevorzugt frei von Penetrationsverstärkern und umfasst Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 10 μm, bevorzugt weniger als 7,5 μm und am meisten bevorzugt weniger als 5 μm, normalerweise im Bereich von 0,1 μm bis 5 μm. Normalerweise besitzt das trockene Insulinpulver von 5% bis 99 Gew.-% Insulin in der Zusammensetzung, gewöhnlich von 15% bis 80%, in einem geeigneten pharmazeutischen Träger, normalerweise einem Kohlenhydrat, einem organischen Salz, einer Aminosäure, einem Peptid oder Protein,

wie es hierin nachfolgend ausführlicher beschrieben wird.

[0012] In einem dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung werden trockene Insulinpulver hergestellt durch Lösen von Insulin in einem wässrigen Puffer unter Bildung einer Lösung, und Sprühtrocknen der Lösung, um im Wesentlichen amorphe Partikel mit einer Partikelgröße von weniger als 10 μm zu erzeugen, bevorzugt weniger als 7,5 μm und am meisten bevorzugt weniger als 5 μm, normalerweise im Bereich von 0,1 μm bis 5 μm. Gegebenenfalls wird der pharmazeutische Träger auch im Puffer gelöst, um eine homogene Lösung zu bilden, wobei das Sprühtrocknen der Lösung einzelne Partikel bereitstellt, die Insulin, Träger, Puffer und beliebige andere Komponenten umfassen, welche in der Lösung vorlagen. Bevorzugt ist der Träger ein Kohlenhydrat, ein organisches Salz, eine Aminosäure, ein Peptid oder Protein, welches beim Sprühtrocknen eine im Wesentlichen amorphe Struktur erzeugt. Der amorphe Träger kann entweder glasartig oder gummiartig sein und verbessert die Stabilität des Insulins während der Lagerung. Vorteilhafterweise können solche stabilisierten Formulierungen auch bei der Inhalation Insulin wirksam zum den Blutstrom zu den Alveolarregionen der Lungen liefern.

[0013] Ein weiterführendes Verständnis des Wesens und der Vorteile der Erfindung wird unter Bezugnahme auf die verbleibenden Teile der Beschreibung und die Zeichnungen offensichtlich.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0014] **Fig.** 1 ist eine schematische Darstellung eines Systems zum Vernebeln einer Insulindosis gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens.

[0015] **Fig.** 2 ist eine schematische Darstellung eines Patienten, welcher eine vernebelte Insulindosis aus dem System von **Fig.** 1 inhaliert.

[0016] **Fig.** 3A und 3B sind graphische Darstellungen der Absorption von rekombinantem humanem Insulin bei Ratten und der resultierenden Glucoseantwort nach der Vernebelung von drei verschiedenen trockenen Pulverformulierungen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von drei unterschiedlichen Ratten dar. Zum Zeitpunkt null wurde der Trockenpulver-Aerosolerzeuger angeschaltet. Die Vernebelung war nach 5 Minuten, 14 Minuten bzw. 20 Minuten für 87% Insulin/Citratpulver, 20% Insulin-Mannit/Citratpulver bzw. 20% Insulin-Raffinose/Citratpulver vollständig. Die Tiere fasteten über Nacht.

[0017] **Fig.** 4A und 4B sind graphische Darstellungen, welche die Profile der mittleren Serumkonzentration-Zeit von Insulin bzw. Glucose veranschaulichen, wobei Aerosolverabreichungen und subkutane Verabreichungen bei Javaneraffen verglichen werden. Der Mittelwert für drei Affen wird für die Aerosolgruppe aufgezeichnet und der Mittelwert für vier Affen wird für die subkutane Gruppe aufgezeichnet.

[0018] **Fig.** 5A ist eine graphische Darstellung, welche die mittlere Insulinkonzentration gegen die Zeit bei einer subkutanen Injektion (o) und bei einer Inhalation von drei Atemzügen (•) beim Menschen veranschaulicht.

[0019] **Fig.** 5B zeigt die mittlere Glucosekonzentration, welche den Insulinkonzentrationen von **Fig.** 5A entspricht.

[0020] **Fig.** 6A ist eine graphische Darstellung, welche die Seruminsulinkonzentration gegen die Zeit als Ergebnis einer subkutanen Injektion (o) und von drei Atemzügen einer Aerosolverabreichung (•) beim Menschen veranschaulicht.

[0021] **Fig.** 6B ist eine graphische Darstellung, welche die mittlere Glucosekonzentrationen veranschaulicht, die den Insulinkonzentrationen von **Fig.** 6A entspricht.

[0022] **Fig.** 7A und 7B stellen einen Vergleich der Variabilität des Seruminsulins (7A) und der Glucosespiegel (7B) zwischen den Objekten bei einer subkutanen Verabreichung (o) und einer Aerosolverabreichung (•) bereit.

[0023] Die **Fig.** 8A, 8B und 8C zeigen rpHPLC-Chromatogramme von Humaninsulin. **Fig.** 8A ist ein Chromatograph eines Insulinstandards, behandelt („stressed") in 10 mM HCl bei 25°C, welches zeigt, dass Humaninsulin bei 23,87 Minuten eluiert, Desamidoinsulin bei 30,47 Minuten eluiert. **Fig.** 8B zeigt ein ähnliches Chromatogramm eines Humaninsulinstandards. **Fig.** 8C zeigt ein ähnliches Chromatogramm einer wiederhergestellten sprühgetrockneten Insulinformulierung, hergestellt gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0024] **Fig.** 9 zeigt ein Ultraviolettspektrum einer Insulinformulierung vor und nach dem Sprühtrocknen. Es wurde im sichtbaren Spektrum keine Lichtstreuung beobachtet, was anzeigt, dass das Insulin während des Sprühtrocknungsverfahrens nicht aggregiert.

[0025] Ausführliche Beschreibung spezieller Ausführungsformen Gemäß der vorliegenden Erfindung wird Insulin als ein trockenes Pulver bereitgestellt. „Trockenes Pulver" bedeutet, dass der Feuchtigkeitsgehalt des Pulvers unterhalb von etwa 10 Gew.-% liegt, normalerweise unterhalb von etwa 5 Gew.-% und bevorzugt unterhalb von etwa 3 Gew.-%. „Pulver" bedeutet, dass das Insulin freifließende Teilchen mit einer Größe umfasst, welche so gewählt ist, dass ein Eindringen in die Lungenalveolen ermöglicht wird, bevorzugt mit weniger als 10 μm im Durchmesser, bevorzugt mit weniger als 7,5 μm und am meisten bevorzugt mit weniger als 5 μm und normalerweise im Bereich von 0,1 μm bis 5 μm Durchmesser.

[0026] Die vorliegende Erfindung basiert zumindest teilweise auf der überraschenden Beobachtung, dass trockenes Insulinpulver leicht und schnell durch die Lungen eines Wirts absorbiert werden. Es war überraschend,

dass trockenes Insulinpulver die Alveolarregion der Lungen erreichen konnten, da wasserlösliche Arzneimittel wie etwa Insulinpartikel bekanntermaßen hygroskopisch sind. Siehe z. B. Byron, Ed., Respiratory Drug Delivery, CRC Press, Boca Raton (1990), S. 150. Somit würde erwartet werden, dass bei der Passage der Partikel durch die Luftwege der Lunge (welche eine relative Feuchtigkeit im Überschuss von 99% bei 37°C besitzen) die einzelnen Partikel eine Tendenz besitzen, Wasser zu absorbieren und zu einer tatsächlichen Partikelgröße anzuwachsen, die größer ist als die erfindungsgemäße obere Grenze von 10 μm. Wenn ein wesentlicher Teil der Insulinpartikel größer ist als der Zielbereich der Größe, würde erwartet werden, dass sich die Partikel eher innerhalb der zentralen Luftwege der Lunge als in der Alveolarregion ablagern, wodurch die Verabreichung und nachfolgende systemische Absorption beschränkt würde. Außerdem ist die Fluidschicht auf den Epithelzellen der Lungen sehr dünn, normalerweise ein Bruchteil des Durchmessers der zu verabreichenden Insulinpulver. Vor der vorliegenden Erfindung war es somit nicht vorhersehbar, ob sich die Insulintrockenpartikel bei Ablagerung innerhalb der Alveolarregionen der Lungen auflösen würden. Überraschenderweise sind die trockenen Insulinpulver offensichtlich in der Lage, sowohl in die Alveolarregionen der Lunge einzudringen als auch sich aufzulösen, wenn sie sich innerhalb der Alveolarregion der Lunge abgelagert haben. Das gelöste Insulin kann dann über die Epithelialzellen in die Zirkulation gelangen.

[0027] Es wird gegenwärtig angenommen, dass die wirksame Absorption des Insulins aus einer schnellen Auflösung in der ultradünnen (< 0,1 μm) Fluidschicht der Alveolarauskleidung resultiert. Die erfindungsgemäßen Partikel besitzen somit eine mittlere Größe, welche 10 bis 50 mal größer ist als die Lungenfluidschicht, wodurch es überraschend wird, dass die Partikel aufgelöst werden und das Insulin auf eine schnelle Art und Weise systemisch absorbiert wird. Wie im experimentellen Teil hierin nachfolgend gezeigt wird, können die erfindungsgemäßen trockenen Insulinformulierungen tatsächlich sogar schnellere Seruminsulinpeaks und Glucoseminima bereitstellen, als durch eine subkutane Injektion geleistet wird, welche gegenwärtig die häufigste Verabreichungsform darstellt. Ein Verständnis des genauen Mechanismus ist jedoch für das Praktizieren der vorliegenden Erfindung wie hierin beschrieben, nicht notwendig.

[0028] Bevorzugte erfindungsgemäße Zusammensetzungen sind im Wesentlichen frei von Penetrationsverstärkern. „Penetrationsverstärker" sind oberflächenaktive Verbindungen, welche die Penetration von Insulin (oder anderen Arzneimitteln) durch die Mukosamembran oder die Auskleidung fördern, und welche für eine Verwendung bei intranasalen, intrarektalen und intravaginalen Arzneimittelformulierungen vorgeschlagen werden. Beispielhafte Penetrationsverstärker schließen Gallensalze, beispielweise Taurocholat, Glycocholat und Desoxycholat, Fusidate, beispielweise Taurodehydrofusidat und biokompatible oberflächenaktive Substanzen, beispielweise Tweens, Laureth-9 und dergleichen ein. Die Verwendung von Penetrationsverstärkern ist aber in Formulierungen für die Lungen im Allgemeinen unerwünscht, weil die Epithelialblutschranke in der Lunge durch solche oberflächenaktive Verbindungen geschädigt werden kann. Überraschenderweise ist gefunden worden, dass die trockenen Insulinpulverzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung leicht in den Lungen absorbiert werden, ohne dass Penetrationsverstärker verwendet werden müssen.

[0029] Trockene Insulinpulver, welche für eine erfindungsgemäße Verwendung geeignet sind, schließen amorphe Insuline, kristalline Insuline und Gemische sowohl aus amorphen als auch kristallinen Insulinen ein. Trockene Insulinpulver werden bevorzugt hergestellt durch Sprühtrocknen unter Bedingungen, welche ein im Wesentlichen amorphes Pulver mit einer Partikelgröße innerhalb des oben angegebenen Bereichs ergeben. Alternativ können amorphe Insuline hergestellt werden durch Lyophilisierung (Gefriertrocknung), Vakuumtrocknung oder Verdunstungstrocknung einer geeigneten Insulinlösung unter Bedingungen zur Erzeugung der amorphen Struktur. Das so erzeugte amorphe Insulin kann dann zerkleinert oder gemahlen werden, um Partikel innerhalb des gewünschten Größenbereichs zu erzeugen. Kristalline trockene Insulinpulver können aus einer kristallinen Insulinmasse formuliert werden durch Zerkleinern oder Bearbeiten in einer Strahlmühle. Das bevorzugte Verfahren zur Bildung von Insulinpulvern, welches Teilchen im gewünschten Größenbereich umfasst, ist das Sprühtrocknen, wobei eine Masse reinen Insulins (normalerweise in einer kristallinen Form) zuerst in einem physiologisch akzeptablen wässrigen Puffer gelöst wird, normalerweise einem Citratpuffer mit einem pH im Bereich von etwa 2 bis 9. Das Insulin wird mit einer Konzentration von 0,01 Gew.-% bis 1 Gew.-%, normalerweise von 0,1% bis 0,2% gelöst. Die Lösungen können dann sprühgetrocknet werden in einer konventionellen Sprühtrocknungsanlage von kommerziellen Herstellern wie etwa Buchi, Niro und dergleichen, was ein im Wesentlichen amorphes partikuläres Produkt ergibt.

[0030] Die trockenen Insulinpulver können im Wesentlichen aus Insulinpartikeln innerhalb des erforderlichen Größenbereichs bestehen und können im Wesentlichen frei sein von anderen biologisch aktiven Bestandteilen, pharmazeutischen Trägern und dergleichen. Solche „sauberen" Formulierungen können Begleitstoffe enthalten, wie etwa Konservierungsmittel, welche in geringen Mengen vorliegen, typischerweise unterhalb 10 Gew.-% und normalerweise unterhalb 5 Gew.-%. Unter Verwendung solcher sauberen Formulierungen kann die Zahl der Inhalationen, welche für gleich hohe Dosierungen erforderlich sind, wesentlich verringert werden, oft bis auf einen einzelnen Atemzug.

[0031] Die erfindungsgemäßen Insulinpulver können gegebenenfalls mit pharmazeutischen Trägern oder Arzneimittelträgern kombiniert werden, welche für eine respiratorische Verabreichung und eine Verabreichung

über die Lunge geeignet sind. Solche Träger können einfach als Volumenmittel dienen, wenn eine Verringerung der Insulinkonzentration im Pulver, welches einem Patienten verabreicht wird, gewünscht ist, können aber auch dazu dienen, die Stabilität der Insulinzusammensetzungen zu verbessern und die Dispergierbarkeit des Pulvers in einer Vorrichtung zur Pulverdispersion zu verbessern, um eine effizientere und reproduzierbare Verabreichung des Insulins bereitzustellen und die Handhabungscharakteristika des Insulins, wie etwa die Fließfähigkeit und Konsistenz zu verbessern, um die Herstellung und Pulverbefüllung zu erleichtern.

[0032] Geeignete Trägermaterialien können in Form eines amorphen Pulvers, eines kristallinen Pulvers oder einer Kombination aus amorphen und kristallinen Pulvern vorliegen. Geeignete Materialien schließen Kohlenhydrate, z. B. Monosaccharide wie etwa Fructose, Galactose, Glucose, D-Mannose, Sorbose und dergleichen, Disaccharide wie etwa Lactose, Trehalose, Cellobiose und dergleichen, Cyclodextrine, wie etwa 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin, und Polysaccharide wie etwa Raffinose, Maltodextrine, Dextrane und dergleichen; (b) Aminosäuren, wie etwa Glycin, Arginin, Asparginsäure, Glutaminsäure, Cystein, Lysin und dergleichen; (c) organische Salze, welche aus organischen Säuren und Basen hergestellt werden, wie etwa Natriumcitrat, Natriumascorbat, Magnesiumgluconat, Natriumgluconat, Tromethaminhydrochlorid und dergleichen; (d) Peptide und Proteine wie etwa Aspartame, humanes Serumalbumin, Gelatine und dergleichen; (e) Alditole wie etwa Mannit, Xylitol und dergleichen ein. Eine bevorzugte Gruppe von Trägern schließt Lactose, Trehalose, Raffinose, Maltodextrine, Glycin, Natriumcitrat, Tromethaminhydrochlorid, humanes Serumalbumin und Mannit ein.

[0033] Solche Trägermaterialien können mit dem Insulin vor der Sprühtrocknung kombiniert werden, d. h. durch Zugabe des Trägermaterials zur Pufferlösung, welche für die Sprühtrocknung hergestellt wird. Auf diese Art und Weise wird das Trägermaterial gleichzeitig mit und als ein Teil der Insulinpartikel gebildet. Wenn der Träger zusammen mit dem Insulin durch Sprühtrocknung gebildet wird, liegt das Insulin normalerweise in jedem einzelnen Partikel mit einem Gewichtsprozent im Bereich von 5% bis 95%, bevorzugt von 20% bis 80% vor. Der Rest des Partikels ist hauptsächlich Trägermaterial (typischerweise von 5 bis 95%, normalerweise von 20% bis 80 Gew.-%), wird aber auch einen oder mehrere Puffer enthalten und kann andere Bestandteile wie oben beschrieben enthalten. Es wurde gefunden, dass das Vorliegen des Trägermaterials in den Partikeln, welche die Alveolarregion der Lunge erreichen (d. h. die Partikel im erforderlichen Größenbereich unterhalb von 10 μm), die systemische Absorption von Insulin nicht wesentlich stört.

[0034] Alternativ können die Träger getrennt in Form eines trockenen Pulvers hergestellt werden und mit dem trockenen Insulinpulver durch Mischen vereinigt werden. Die getrennt hergestellten Pulverträger sind normalerweise kristallin (um Wasserabsorption zu vermeiden), können in einigen Fällen aber amorph sein oder Gemische aus kristallin und amorph. Die Größe der Trägerpartikel kann so gewählt werden, dass die Fließfähigkeit des Insulinpulvers verbessert wird, normalerweise liegt sie im Bereich von 25 μm bis 100 μm. Trägerpartikel in diesem Größenbereich dringen im Allgemeinen nicht die Alveolarregion der Lunge ein und trennen sich in der Lieferungsvorrichtung vor der Inhalation oft vom Insulin ab. Folglich bestehen die Partikel, welche in die Alveolarregion der Lunge eindringen, im Wesentlichen aus Insulin und Puffer. Ein bevorzugtes Trägermaterial ist kristallines Mannit mit einer Größe im oben genannten Bereich.

[0035] Die erfindungsgemäßen trockenen Insulinpulver können mit auch anderen Wirkstoffen kombiniert werden. Beispielsweise kann es wünschenswert sein, kleine Mengen von Amylin oder aktiven Amylinanaloga in den Insulinpulvern zu kombinieren, um die Diabetesbehandlung zu verbessern. Amylin ist ein Hormon, welches bei normalen (nicht diabetischen) Individuen mit dem Insulin von den β-Zellen des Pankreas sekretiert wird. Es wird angenommen, dass Amylin die Insulinaktivität in vivo moduliert und es ist vorgeschlagen worden, dass eine gleichzeitige Verabreichung von Amylin mit Insulin die Blutglucoseregulierung verbessern könnte. Die Kombination von trockenem Amylinpulver mit Insulin in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen stellt ein besonders zweckmäßiges Produkt zum Erreichen einer solchen gleichzeitigen Verabreichung dar. Amylin kann mit Insulin kombiniert werden mit von 0,1 Gew.-% bis 10 Gew.-% (bezogen auf das Gesamtgewicht des Insulins in einer Dosierung), bevorzugt von 0,5% bis 2,5 Gew.-%. Amylin ist erhältlich von kommerziellen Anbietern wie etwa Amylin Corporation, San Diego, Californien, und kann leicht in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen formuliert werden. Amylin kann beispielsweise in wässrigen oder anderen geeigneten Lösungen zusammen mit dem Insulin und gegebenenfalls mit Trägerstoffen gelöst werden, und die Lösung kann sprühgetrocknet werden, um das pulvrige Produkt zu erzeugen.

[0036] Die erfindungsgemäßen trockenen Insulinpulverzusammensetzungen werden bevorzugt durch Dispersion in einem Luftstrom oder einem Strom eines anderen physiologisch akzeptablen Gases auf konventionelle Art und Weise vernebelt. Ein geeignetes System für eine solche Dispersion wird in der parallel anhängigen Anmeldung mit der Seriennummer 07/910,048, welche als WO 93/00951 veröffentlicht worden ist, beschrieben, wobei die vollständige Offenbarung davon hierin als Referenz enthalten ist. Unter Bezug auf die hierin vorliegende **Fig.** 1 wird hierin trockenes freifließendes Insulinpulver in einen Luft- oder Gasstrom mit hoher Geschwindigkeit eingebracht, und die resultierende Dispersion wird in eine Vorratskammer **10** eingebracht. Die Vorratskammer **10** umfasst ein Mundstück **12** am Ende gegenüber der Eintrittsstelle der Luft-Pulver-Dispersion. Das Volumen der Kammer **10** ist ausreichend groß, um eine gewünschte Dosis aufzufangen und kann gegebenenfalls Stauplatten („Baffles") und/oder Einwegventile zum Begünstigen des Einschlusses besitzen.

Nachdem eine Dosis des Insulinpulvers in der Kammer **10** aufgefangen wurde, inhaliert ein Patient P (**Fig.** 2) am Mundstück **12**, um die vernebelte Dispersion in seine Lungen zu ziehen. Wenn der Patient P inhaliert, wird Ausgleichsluft durch eine tangential orientierte Lufteinlassöffnung **14** eingebracht, wobei die Luft normalerweise in einem Wirbelmuster fließt, um das vernebelte Insulin aus der Kammer in die Lungen des Patienten auszuspülen. Das Volumen der Kammer und die vernebelte Dosis sind so, dass ein Patient die gesamte vernebelte Insulindosis vollständig inhalieren kann, gefolgt von ausreichend Luft, um sicherzustellen, dass das Insulin die niedrigen Alveolarregionen der Lunge erreicht.

[0037] Solche vernebelten Insulinpulver sind besonders nützlich anstelle von subkutanen Injektionen von schnell wirkendem Insulin bei der Behandlung von Diabetes und verwandten Insulindefiziten. Überraschenderweise ist gefunden worden, dass die Aerosolverabreichung von trockenem Insulinpulver eine wesentlich schnellere Insulinabsorption und Glucoseantwort ergibt, als durch eine subkutane Injektion erreicht wird. Somit sind die erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen besonders wertvoll bei Behandlungsprotokollen, bei denen ein Patient die Blutglucosespiegel häufig überwacht und Insulin so verabreicht, wie es benötigt wird, um eine angestrebte Serumkonzentration zu erhalten, sie sind aber ebenso jedes Mal nützlich, wann eine systemische Insulinverabreichung erforderlich ist. Der Patient kann eine gewünschte Dosierung durch Inhalation einer geeigneten Insulinmenge erreichen, wie eben beschrieben. Die Wirksamkeit einer systemischen Insulinverabreichung über das eben beschriebene Verfahren liegt normalerweise im Bereich von etwa 15% bis 30%, wobei Einzeldosierungen (pro Inhalation) normalerweise im Bereich von etwa 0,5 mg bis 10 mg liegen. Normalerweise liegt die gewünschte Insulingesamtdosierung während einer respiratarischen Einzelverabreichung im Bereich von etwa 0,5 mg bis 15 mg. Somit kann die gewünschte Dosierung wirksam sein, wenn der Patient einem bis vier Atemzüge nimmt.

[0038] Die folgenden Beispiele werden als Veranschaulichung bereitgestellt, nicht als Beschränkung.

Experimenteller Teil

Material und Methoden

Materialien

[0039] Kristallines humanes Zinkinsulin, 26,3 Unit/mg, (Lilly Partie #784KK2) wurde von Eli Lilly und Company, Indianapolis, IN erhalten und war > 99% rein, wie durch rpHPLC gemessen wurde. USP-Mannit wurde von der Roquette Corporation (Gurnee, IL) erhalten. Raffinose wurde von Pfanstiehl Laboratories (Waukegan, IL) bezogen. Natriumcitrat-Dihydrat, USP, ACS und Zitronensäure-Monohydrat USP wurden von J. T. Baker (Phillipsburg, NJ) erhalten.

Pulverherstellung

[0040] Die Insulinpulver wurden hergestellt durch Lösen von einer kristallinen Insulinmasse in Natriumcitratpuffer, welcher einen Arzneimittelträger (Mannit oder Raffinose oder keines davon) enthielt, um eine Endkonzentration an Feststoffen von 7,5 mg/ml und einen pH von 6,7 ± 0,3 zu ergeben. Der Sprühtrockner wurde betrieben mit einer Einlasstemperatur zwischen 110°C und 120°C und einer Flüssigkeitszufuhrrate von 5 ml/min, was eine Auslasstemperatur zwischen 70°C und 80°C ergab. Die Lösungen wurden dann durch ein 0,22 µm Filter filtriert und in einem Buchi-Sprühtrockner unter Bildung eines feinen weißen amorphen Pulvers sprühgetrocknet. Die resultierenden Pulver wurden in dicht verschlossenen Behältern in einer trockenen Umgebung (< 10% RH) gelagert.

Analysen der Pulver

[0041] Die Größenverteilung der Partikel der Pulver wurde durch Flüssigzentrifugalsedimentation in einem Horiba CAPA-700 Partikelgröße-Analysator nach der Dispersion der Pulver in Sedisperse A-11 (Micromeritics, Norcross, GA) gemessen. Der Feuchtigkeitsgehalt der Pulver wurde durch das Karl Fischer-Verfahren unter Verwendung eines Mitsubishi CA-06 Feuchtemessers gemessen.

[0042] Die Integrität des Insulins vor und nach der Pulverbearbeitung wurde gemessen gegenüber einem Referenzstandard von humanem Insulin durch Wiederauflösen abgewogener Pulverportionen in destilliertem Wasser und durch Vergleich der wiederaufgelösten Lösung mit der originalen Lösung, welche in den Sprühtrockner eingeführt wurde. Die Retentionszeit und die Peakfläche der rpHPLC wurden verwendet, um zu bestimmen, ob die Insulinmoleküle im Verfahren chemisch modifiziert oder abgebaut wurden. Die UV-Extinktion wurde verwendet, um die Insulinkonzentration (bei 278 nm) und das Vorliegen oder die Abwesenheit von unlöslichen Aggregaten (bei 400 nm) zu bestimmen. Außerdem wurden die pH-Werte der Ausgangs- und wiederhergestellten Lösungen gemessen. Die amorphe Beschaffenheit des Insulinpulvers wurde durch Polarisa-

tionslichtmikroskopie bestätigt.

Ratten-Aerosolexpositionen

[0043] Ratten-Experimente wurden in einem Aerosolexpositionsraum durchgeführt. Weibliche Ratten (280 bis 300 g) wurden über Nacht ausgehungert. Die Tiere (21-24/Experiment) wurden in Plexiglasröhren platziert und in einer 48-Port Aerosolexpositionskammer nur für die Nase (In-Tox Products, Albuquerque, NM) befestigt. Der Luftfluss zu der Atmungszone wurde bei 7,2 bis 9,8 Liter/Minute gehalten und durch Vakuum entfernt, sodass ein leicht negativer Druck (~1,5 cm H_2O) in der Kammer vorlag, wie es durch ein Magnahelic-Messinstrument gemessen wurde. Die Aerosolexpositionszeiten betrugen zwischen 5 bis 20 Minuten in Abhängigkeit davon, wieviel Pulver in die Kammer zugegeben wurde. Die Pulver wurden von Hand in eine kleine Venturidüse zugeführt, welche die Pulverpartikel dispergierte und einen feinen Aerosolnebel bildete. Die Venturidüse wurde mit einem Druck von mehr als 15 psig betrieben und der Luftfluss wurde auf 7,2 l/min bis 9,8 l/min eingestellt. Die Venturidüse wurde in den Boden einer Dispersionskammer aus klarem Plexiglas (750 ml) eingepasst, welche das Aerosol direkt in eine Expositionskammer nur für Nase leitete.

Kalibrierung der Ratten-Aerosolkammer

[0044] Die Konzentration des Pulvers in der Atmungszone wurde gemessen durch Entnehmen mehrerer geregelter Filterproben in der Atmungszone mit In-Tox-Filterhaltern bei einem Vakuumfluss von 2 Liter/min. Die Kammer wurde sowohl mit als auch ohne Tiere kalibriert. Die Pulvermasse wurde gravimetrisch bestimmt. Die Partikelgröße der Pulver in der Atmungszone wurde gemessen mit einem Kaskadenimpaktor (In Tox Products), welcher am Atmungsloch platziert war und mit einem Fluss von 2 Liter/min betrieben wurde. Die Pulvermasse in jedem Stadium wurde gravimetrisch bestimmt.

[0045] Bei jedem Pulvertest wurden 21 bis 24 Ratten verwendet, und die Aerosolexposition dauerte 5 bis 20 Minuten. Drei Ratten wurden zum Zeitpunkt 0 getötet und dann ~7, 15, 30, 60, 90, 120, 180 und 240 Minuten nach Beendigung der Aerosolexposition. Die Tiere wurden anästhesiert, ihre Abdomen geöffnet und aus der ventralen Aorta wurde eine große Blutprobe entnommen. Die Tiere wurden dann durch zervikale Dislokation getötet.

[0046] Das Blut gerann für 30 Minuten bei Raumtemperatur und wurde dann für 20 Minuten bei 3500 rpm in Serumabtrennröhrchen zentrifugiert. Das Serum wurde entweder unmittelbar analysiert oder bis zur Analyse bei –80°C eingefroren. Sobald als möglich (0 bis 7 Minuten) nach der Beendigung der Aerosoldosierung wurden 3 Ratten getötet, ihr Blut entnommen und ihre Lungen mit sechs Spülungen mit 5 ml Phosphat-gepufferter Saline (PBS) gespült. Die Menge an Insulin in der letzten vereinigten Spülprobe wurde bei den Berechnungen der Bioverfügbarkeit als Aerosoldosis für die Ratte verwendet.

Primaten-Expositionssystem

[0047] Junge, wild gefangene männliche Javaneraffen vom Stamm Macaca fascicularis (2 bis 5 kg) (Charles River Primates, Inc.) wurden für die Aerosoluntersuchungen bei Primaten verwendet (3 bis 4 Tiere/Gruppe). Die Tiere wurden entweder subkutan mit Humulin (Eli Lilly, Indianapolis, Indiana) injiziert oder einem Insulinpulveraerosol ausgesetzt. Jedes Tier wurde in einer Expositionseinheit nur für den Kopf platziert, um eine frische Zufuhr der Testatmosphäre mit einer geeigneten Fließrate (7 l/min) bereitzustellen, um die minimalen Sauerstoffanforderungen des Tiers bereitzustellen. Die Tiere wurden in einem stuhlartigen Apparat eingesperrt, welcher sie in einer aufrechten Sitzposition platzierte. Die Hauben waren klar, was den Tieren eine komplette Visualisierung ihrer Umgebung erlaubte. Im Fuß wurde ein Dauerkatheter gelegt, sodass zu jedem Zeitpunkt Blutproben entnommen werden konnten. Die Affen waren während des gesamten Verfahrens vollständig wach und schienen ruhig zu sein. Das Primatenblut wurde wie das Rattenblut behandelt (siehe oben).

[0048] Das Primaten-Aerosolexpositionssystem enthielt einen Atemmonitor, welcher eine Quantifizierung der Menge der von jedem Affen inhalierten Luft ermöglichte. Dieser Wert, gekoppelt mit den Messungen der Insulinkonzentration in der eingeatmeten Luft ermöglichten die genaue Berechnung, wieviel Insulin von jedem Tier inhaliert wurde.

Versuche am Menschen

[0049] Insulin wurde an 24 normale humane Patienten subkutan und auch als Inhalation von vernebelten trockenen Insulinpulvern verabreicht. Jede subkutane Injektion bestand aus 10,4 U Humulin R, 100 U/ml (Eli Lilly, Indianapolis, Indiana). Die trockenen Insulinpulver waren amorph und hergestellt durch Sprühtrocknen wie oben beschrieben mit 20 Gew.-% Mannitolträgersubstanz. Die Dosen (5 mg) des trockenen Insulinpulvers wurden in einem Hochgeschwindigkeitsluftstrom dispergiert, um ein feines Aerosol zu erzeugen, welches in einer

Kammer aufgefangen wurde. Jede Versuchsperson inhalierte das Aerosolpulver durch Aufnahme eines langsamen, tiefen Atemzugs von jedem Aerosol-Bolus oder „Atemzug". Das Pulver wurde in drei Atemzügen verabreicht (für eine Dosis von 31,9 U). Seruminsulin und Glucosespiegel wurden über die Zeit bestimmt, wie oben beschrieben.

Serumassays

[0050] Die Seruminsulinspiegel bei Ratten, Primaten und Menschen wurden unter Verwendung eines Coat-A-Count Radio-Immunassaykits für humanes Insulin (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) bestimmt. Die Standardkurven wurden mit jeder Probencharge gefahren. Die Empfindlichkeit des Assays betrug ungefähr 43 pg/ml. Die Variabilität innerhalb des Assays (% CV) beträgt < 5%. Die Glucoseassays wurden von California Veterinary Diagnostic, Inc. in West Sacramento, CA unter Verwendung des Glucose/HK-Reagenziensystempacks für das Analysegerät Boehringer Mannheim/Hitachi 747 durchgeführt. Die Variabilität innerhalb des Assays (% CV) beträgt < 3%.

[0051] Bei den Rattenexperimenten wurden die relativen Bioverfügbarkeiten des Aerosols berechnet durch Vergleich der Fläche des dosisangepassten immunreaktiven Insulins (IRI) unter der Kurve (AUC) des Konzentrations-Zeitprofils mit der Fläche, welche bei einer subkutanen Injektion erhalten wurde. Bei Ratten wurde die gesamte gespülte Insulinmasse als die Aersoldosis verwendet. Da ein Teil des Insulins absorbiert wird, ehe die Lungen gespült werden können, ist die durch dieses Verfahren geschätzte Dosis wahrscheinlich eine leichte Unterbewertung der gesamten abgelagerten Dosis. Für diesen angenommenen Verlust wurden keine Korrekturen durchgeführt.

[0052] Bei den Experimenten mit Affen wurden die relativen Bioverfügbarkeiten ähnlich wie bei den Ratten oben berechnet, außer dass anstelle der Verwendung des gespülten Lungeninsulins als die Aerosoldosis die Gesamtmenge an inhaliertem Insulin verwendet wurde. Bei den Ratten wurde nur das in den Lungen abgelagerte Material, nicht aber das in den Nasenpassagen und im Rachen abgelagerte Material in die geschätzte Dosis aufgenommen. Bei den Affen wurde das gesamte Insulin, welches in die Tiere gelangte, in die geschätzte Dosis aufgenommen.

Ergebnisse der Insulinabsorption bei Ratten

[0053] Alle in den Tierversuchen verwendeten Insulinpulver besaßen Partikelgrößen (mittlere Massedurchmesser) im Bereich zwischen 1 bis 3 μm und Feuchtigkeitsgehalte < 3%. Die durch rpHPLC gemessene Insulinreinheit der Pulver betrug > 97%. Repräsentative Chromatogramme der 20%-igen Insulinformulierung sind in **Fig.** 8C gezeigt. Die Pulver ergaben eine klare Lösung bei Wiederherstellung mit reinem Wasser mit einem Ultraviolett-Extinktianswert < 0,01 bei 400 nm und einem pH-Wert von 6,7 ± 0,3. Repräsentative Ultraviolett-(UV-) Spektren für die 20%-ige Insulinformulierung sind in **Fig.** 9 gezeigt.

[0054] Die folgenden drei Insulinpulverformulierungen wurden an Ratten als Aerosole in der In-Tox 48-Port-Expositionskammer getestet.

1. 87,9% Insulin; 11,5% Natriumcitrat; 0,6% Zitronensäure.
2. 20% Insulin; 66% Mannit; 12,4% Natriumcitrat; 0,6% Zitronensäure.
3. 20% Insulin; 66% Raffinose; 12,4% Natriumcitrat; 0,6% Zitronensäure.

[0055] Tabelle 1 listet die Schlüsselmessungen in den drei unterschiedlichen Ratten-Expositionsstudien auf, einschließlich der Kennzeichnungen des Aerosols in der Atmungszone und der Betriebsbedingungen der Kammer. Ein Bruchteil des Pulvers, welches in die Venturidüse zugegeben wurde, erreichte die Atmungszonen der Ratten (34%–67%), aufgrund der Verluste in den Wänden aufgrund der Impaktion und einer unvollständigen Dispersion des Pulvers während der Pulverzufuhr. Die Partikelgröße des Aerosols an der Atmungszone war jedoch für eine Lungenablagerung ideal (1,3–1,9 μm) und war etwas kleiner als die Partikelgröße der ursprünglichen Formulierung (2,0– 2,8 μm) aufgrund eines selektiven Verlusts der größeren Partikel in der Tierexpositionskammer.

Tabelle 1. Messungen der Ratten-Aerosolexposition

	88% Insulin	20% Insulin Mannit	20% Insulin Raffinose
Kammerfliessrate	7,2 l/min	9,6 l/min	9,8 l/min
Mittlerer Durchmesser der Pulvermasse (MMD)	2,2 µm	2,8 µm	2,0 µm
Pulverzufuhr in die Kammer	70 mg	255 mg	260 mg
Dauer der Pulverzufuhr	5 min	14 min	20 min
Pulver in der Atemzone	40 mg	171 mg	88 mg
Insulin in der Atemzone	35 mg	34 mg	18 mg
% Gesamtpulver in der Atemzone	57%	67%	34%
Mittlerer aerodynamischer Massedurchmesser (MAD)	1,1 mg/l	1,3 mg/l	0,45 mg/l
Partikelgröße in der Atemzone	1,4 µm	1,9 µm	1,3 µm
In der Spülung rückgewonnenes Insulin	30,7 ± 5,2 µg	12,7 ± 6,9 µg	31,6 ± 12,9 µg
Seruminsulin AUC (ng min/ml)	104	201	150

[0056] Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse des Rattenseruminsulins und der Glucose von den drei Aerosolstudien und einer SC-Studie. **Fig.** 3A und 3B zeigen die Profile der Konzentration des immunreaktiven Seruminsulins (IRI)-Zeit und der Serumglucosekonzentration-Zeit für die drei Formulierungen, welche mittels Aerosol verabreicht wurden. Tabelle 3 zeigt Insulin t_{max}, Glucose t_{min} aus den unterschiedlichen Studien ebenso wie die relative Bioverfügbarkeit des Aerosols im Vergleich mit einer SC-Injektion.

Tabelle 2. Ergebnisse des Seruminsulins und der Glucose bei Messungen der Ratten-Aerosolexposition

Formulierung	Verabreichungs-art	Zeit (min)	Seruminsulin (pg/ml ± 1 S.D.) n = 3Ratten/Zeitpt.	Serumglucose (mg/dl ± 1 S.D.) n = 3Ratten/Zeitpt.
88% Insulin (Aerosolexposition nach 5 Minuten vollständig) Durchschnittliche Dosis = 31 µg/Ratte	Aerosol	0	230 ± 184	106 ± 12
	Aerosol	12	1020 ± 312	114 ± 10
	Aerosol	21	165 ± 768	81 ± 10
	Aerosol	36	876 ± 764	66 ± 7
	Aerosol	66	684 ± 416	62 ± 15
	Aerosol	96	568 ± 128	65 ± 10
	Aerosol	126	554 ± 260	73 ± 11
	Aerosol	186	712 ± 140	93 ± 5
20% Insulin-Mannit (Aerosolexposition nach 14 Minuten vollständig) Durchschnittliche Dosis = 13 µg/Ratte	Aerosol	0	476 ± 56	165 ± 18
	Aerosol	22	1476 ± 428	117 ± 15
	Aerosol	35	2480 ± 892	101 ± 19
	Aerosol	57	1204 ± 64	64 ± 13
	Aerosol	87	1084 ± 396	63 ± 17
	Aerosol	117	664 ± 180	105 ± 38
	Aerosol	147	1228 ± 416	108 ± 22
	Aerosol	207	676 ± 100	119 ± 33
20% Insulin-Raffinose (Aerosolexposition nach 20 Minuten vollständig) Durchschnittliche Dosis = 32 µg/Ratte	Aerosol	0	426 ± 97	157 ± 37
	Aerosol	27	2948 ± 2816	139 ± 46
	Aerosol	42	1504 ± 592	181 ± 11
	Aerosol	57	1272 ± 496	124 ± 45
	Aerosol	87	852 ± 164	128 ± 17
	Aerosol	117	604 ± 156	124 ± 9
	Aerosol	147	532 ± 172	172 ± 12
	Aerosol	207	556 ± 100	218 ± 34
20% Insulin-Mannit Dosis = 30 µg Insulin /Ratte	Subkutan	0	360 ± 140	107 ± 5
	Subkutan	15	14200 ± 3160	53 ± 2
	Subkutan	30	10160 ± 720	24 ± 5
	Subkutan	60	11000 ± 1080	28 ± 6
	Subkutan	90	2440 ± 1160	25 ± 7
	Subkutan	120	3520 ± 840	49 ± 3
	Subkutan	180	1280 ± 800	40 ± 17
	Subkutan	240	400 ± 260	77 ± 34

Tabelle 3. Vergleich von Aerosol- und subkutanem (SC) Insulin bei Tieren

	Ratte SC	Ratte Aerosol 88% Insulin	Ratte Aerosol 20% Insulin Mannit	Ratte Aerosol 20% Insulin Raffinose	Affe SC	Affe Aerosol 20% Insulin Mannit
Insulin Max*	15 min	16 min	21 min	17 min	15 min	30 min
Glucose Min*	30 min	31 min	43 min	37 min	45 min	45 min
Glucoseabfall	77%	42%	62%	21%	45%	73%
Rel. Bioverfügbarkeit	100%	10%**	44%**	14%**	100%	12%***

*Zeiten gemessen vom Ende der Aerosolexpositionsperiode. Glucose min = Zeit bis > 85% der maximalen Reduktion, beobachtet in der Untersuchung

**Bezogen auf das Insulin, welches an Ende der Aerosolexposition durch Spülung aus der Lunge wiedergewonnen wurde.

***Bezogen auf das inhalierte Insulin, enthält Verluste in den Nasenpassagen und im Rachen.

[0057] Alle drei Formulierungen stellten schnell absorbierendes Insulin für die systemische Rattenzirkulation bereit (**Fig.** 3A und 3B). Die Bioverfügbarkeit und Glucoseantwort waren bei dem 20%-igen Insulin/Mannitpulver (Tabelle 3) höher, obwohl es ohne die Durchführung vieler Wiederholungsexperimente unsicher ist, ob der Unterschied signifikant war.

Ergebnisse der Primaten

[0058] Eine Dosis, welche mit der bei den Versuchen am Menschen verwendeten Dosis identisch war (0,2 U/kg, ~27 µg/Affe), wurde in vier Affen injiziert, um die SC-Daten bereitzustellen, mit denen die Aerosolergebnisse verglichen wurden (**Fig.** 4A und 4B). Tabelle 4 zeigt die Daten der Affen für die Aerosolexposition. Tabelle 5 zeigt die mittleren Seruminsulinwerte und Glucosewerte bei der Aerosolexposition und der subkutanen Untersuchung. Die Aerosoldosis ergab eine kräftige Insulin- und Glucoseantwort (hohe Dosis). **Fig.** 4 zeigt einen Vergleich der mittleren Seruminsulinprofile von den zwei Aerosolstudien und einer SC-Studie. Aus den AUC-Werten dieser Profile wurde die relative Bioverfügbarkeit des Aerosolinsulins als 12% berechnet.

Tabelle 4. Affendaten der Aerosolexposition

Tier ID	Grav.-filter-masse (mg)	Durch-schnittl. Aerosol Konz. (µg/l)	Inhaliertes Volumen (l)	Geschätzte inhalierte Aerosol-masse (µg)	Geschätzte inhalierte Insulinmasse (µg)	Körper-gewicht (kg)	Geschätzte Insulin-dosis (µg/kg)	AUC (ng min/ml)
#1, 23-46	1,07	178	8,96	1597	320	3,92	81,5	347
#2, 23-48	1,01	168	19,98	3363	673	3,81	176,6	1196
#3,122-55	0,97	162	14,68	2373	475	4,1	115,7	739
					489 ± 178			

Ergebnisse beim Menschen

[0059] Die Vergleichsergebnisse zwischen einer respiratorischen Verabreichung und einer subkutanen Injektion sind in Tabelle 5 unten dargestellt. Die respiratorische Aerosolverabreichung ergab eine schnellere Absorption (Peak nach 20 Minuten) als die Injektion (Peak nach 60 Minuten), mit einer schnelleren Glucoseantwort (Minimum bei 60 Minuten) als bei der Injektion (Minimum bei 90 Minuten). Die Reproduzierbarkeit beim Aerosol war ebenso gut, wenn nicht besser als bei der Injektion, sowohl bei der Insulin- als auch der Glucoseantwort. Die Injektionsdosen wurden sorgfältig bezüglich des Gewichts eingestellt, die Aerosoldosen nicht. Die biologische Aktivität des Aerosolinsulins bezogen auf die Glucoseantwort betrug im Vergleich mit der Injektion 28 bis 36%. Die Bioverfügbarkeit des Aerosolinsulins, bezogen auf die Fläche unter der Insulinkurve betrug im Vergleich zur Injektion 22,8% für die Gruppe mit 3 Atemzügen.

Tabelle 5 Seruminsulin- und Glucoseergebnisse beim Menschen

INSULIN

Patient #	Dosis/Injektion oder Blasen	Dosis im Patienten*	Anstieg im Seruminsulin µU/ml	Zeitpunkt des Maximums	Relative Bioverfügbarkeit bezogen auf Insulin AUC
1-24 (SC-Injektion)	10,4 U	10,4 U	5,8 - 20,9	60 min	100,0%
7-24 (3 Atemzüge)	76,0 U	31,9 U	6,1 – 28,5	20 min	22,8%

GLUCOSE

Patient #	Abfall der mittleren Serum-glucose mg/dl	mg/dl Abfall	Zeitpunkt des Minimums	% SC	Relative biologische Aktiviät bezogen auf Glucoseabfall
1-24 (SC-Injektion)	93,6 – 64,9	28,7	90 min	100%	100%
7-24 (3 Atemzüge)	91,8 – 67,6	24,2	60 min	84,3%	27,4%

*Vorrichtung Eff = 42%

[0060] Die Ergebnisse der Versuche beim Menschen werden weiterhin in den **Fig.** 5A bis 5B dargestellt. **Fig.** 5A zeigt das mittlere Seruminsulin gegen die Zeit für die subkutane Injektion (O), Inhalation (drei Atemzüge, •). Die mittleren Serumglucosespiegel werden in **Fig.** 5B auf ähnliche Art und Weise dargestellt. Insulinpeaks und Glucoseminima sind in den **Fig.** 6A bzw. **Fig.** 6B gezeigt, während die Variabilität des Seruminsulins und der Glucose zwischen den Objekten in den **Fig.** 7A bzw. **Fig.** 7B dargestellt werden.

[0061] Außerdem stellen die flachen Atemzüge (periodische Atmung) der Affen während der Aerosolexpositionen nicht das optimale Atemmanöver für eine tiefe Lungenablagerung dar. Eine höhere Bioverfügbarkeit wurde wie erwartet beim Menschen beobachtet (Tabelle 5), als das optimale Atemmanöver genutzt wurde und der Aeroso-Bbolus eher durch die orale Inhalation als durch die nasale Inhalation aufgenommen wurde.

[0062] Obwohl die vorhergehende Erfindung ausführlich zur Zwecke der Klarheit des Verständnisses anhand von Veranschaulichungen und Beispielen dargestellt wurde, können selbstverständlich Veränderungen und Modifikationen innerhalb des Rahmens der angefügten Ansprüche ausgeführt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Vernebeln einer Insulindosis, wobei das Verfahren umfasst:
Bereitstellen von Insulin als trockenes Pulver,
Dispergieren einer Menge des trockenen Pulvers in einem Gasstrom, um ein Aerosol zu bilden, und
Einfangen des Aerosols in einer Kammer mit einem Mundstück.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Insulin im Wesentlichen frei von Penetrationsverstärkern ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Insulin in einem Trockenpulverträger vorliegt, mit einer Gewichtskonzentration im Bereich von etwa 5% bis 99%, worin der Pulverträger ein Kohlenhydrat, organisches Salz, eine Aminosäure, ein Peptid oder Protein umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 1, worin das trockene Insulinpulver Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von weniger als 10 µm umfasst.

5. Verfahren nach Anspruch 1, worin das trockene Pulver einzelne Partikel umfasst, welche sowohl Insulin als auch ein Trägermaterial enthalten, wobei das Insulin in den einzelnen Partikeln mit 5 Gew.-% bis 99 Gew.-% vorliegt.

6. Verfahren zur Herstellung einer stabilen trockenen Insulinpulverzusammensetzung, wobei das Verfahren umfasst:
Lösen von Insulin in einem wässrigen Puffer, um eine Lösung zu bilden, und
Sprühtrocknen der Lösung, um im Wesentlichen amorphe Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von weniger als 10 µm zu erzeugen.

7. Verfahren nach Anspruch 6, worin das Insulin zusammen mit einem pharmazeutischen Träger in einem wässrigen Puffer gelöst wird, worin beim Sprühtrocknen ein trockenes Pulver mit einem Insulingehalt in den einzelnen Partikeln von 5 Gew.-% bis 99 Gew.-% erzeugt wird, und worin der pharmazeutische Träger ein Kohlenhydrat, welches ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Mannit, Raffinose, Lactose, Maltodextrin und Trehalose, ein organisches Salz, welches ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Natriumcitrat, Natriumacetat und Natriumascorbat, eine Aminosäure, ein Peptid oder ein Protein ist, welches beim Spühtrocknen ein Pulver erzeugt.

8. Insulinzusammensetzung für eine Verabreichung über die Lunge, wobei die Zusammensetzung einzelne Partikel umfasst, welche ein sprühgetrocknetes amorphes Insulinpulver enthalten, das mit 5 Gew.-% bis 99 Gew.-% in einem pharmazeutischen Trägermaterial vorliegt, und eine Größe von weniger als 10 µm aufweisen.

9. Insulinzusammensetzung nach Anspruch 8, worin die Zusammensetzung im Wesentlichen frei von Penetrationsverstärkern ist.

10. Insulinzusammensetzung nach Anspruch 8, worin das pharmazeutische Trägermaterial ein Kohlenhydrat, welches ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Mannit, Raffinose, Lactose, Maltodextrin und Trehalose, oder ein organisches Salz, welches ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Natriumcitrat, Natriumgluconat und Natriumascorbat umfasst.

11. Insulinzusammensetzung nach Anspruch 8, welche im Wesentlichen aus einem trockenen Insulinpulver mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von weniger als 10 µm besteht.

12. Verwendung von trockenem Insulin zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verabreichung über die Lunge.

13. Verwendung nach Anspruch 12, worin das Insulin in Form einer Insulinzusammensetzung nach einem der Ansprüche 8 bis 11 vorliegt.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

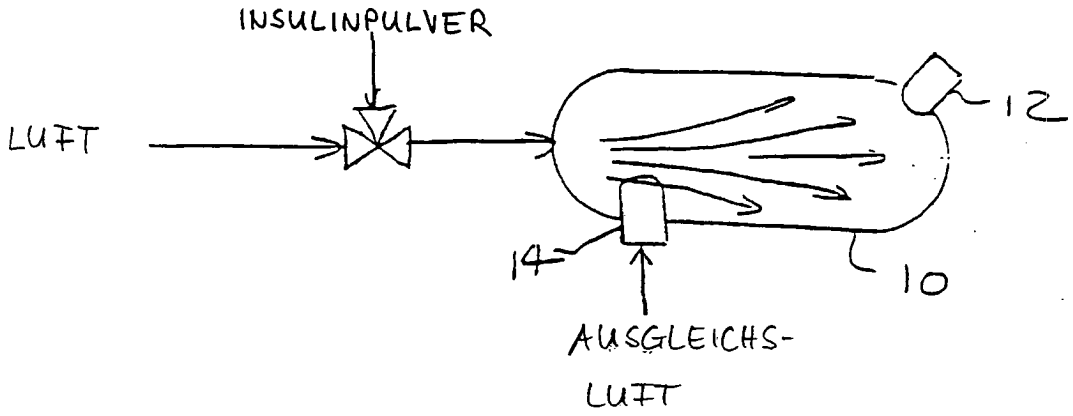


FIG_ 1

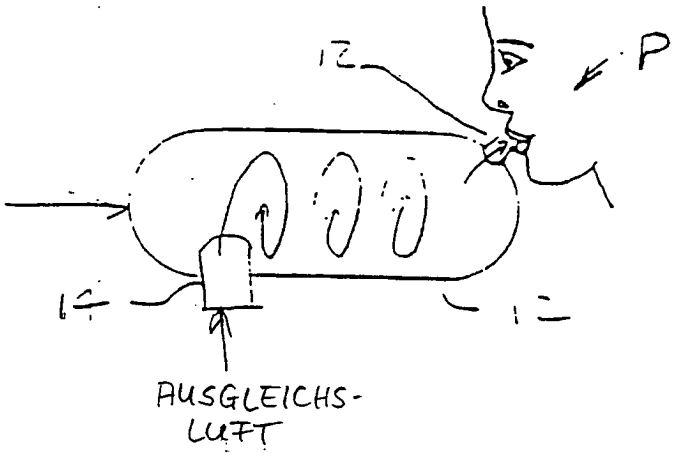


FIG_ 2

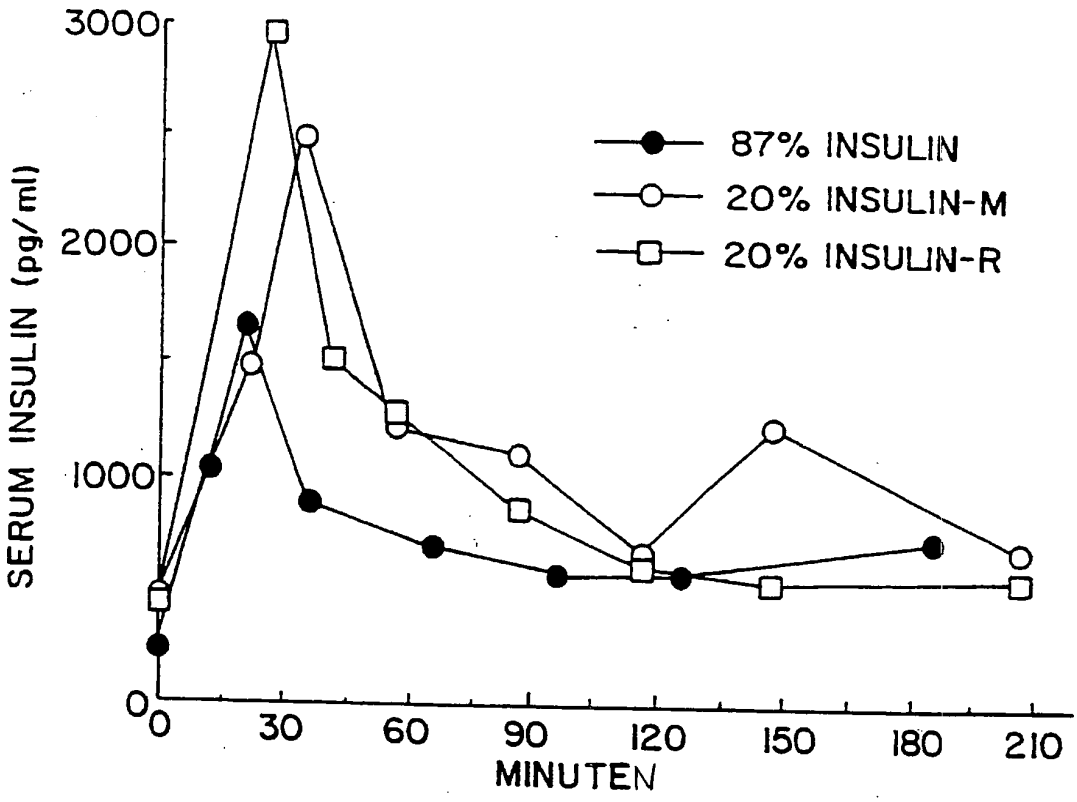

3000
2000
1000
0
SERUM INSULIN (pg/ml)
87% INSULIN
20% INSULIN-M
20% INSULIN-R
0
30
60
90
120
150
180
210
MINUTEN

FIG. 3A.

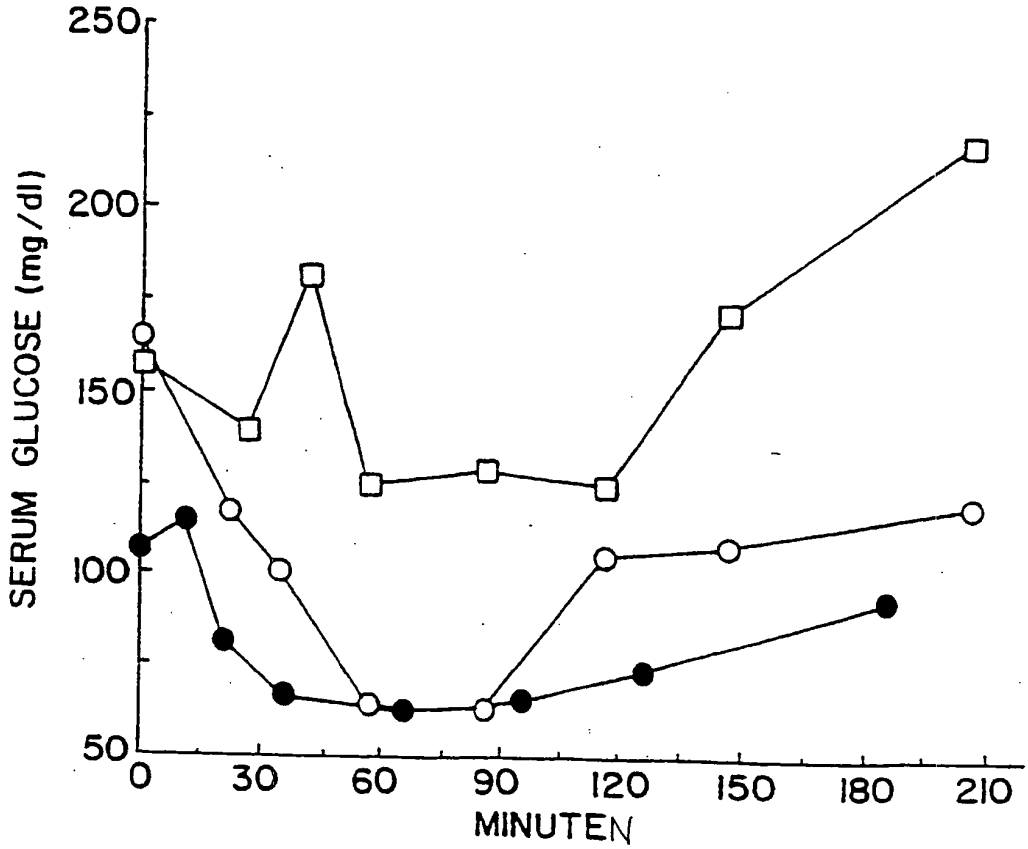

250
200
150
100
50
SERUM GLUCOSE (mg/dl)
0
30
60
90
120
150
180
210
MINUTEN

FIG. 3B.

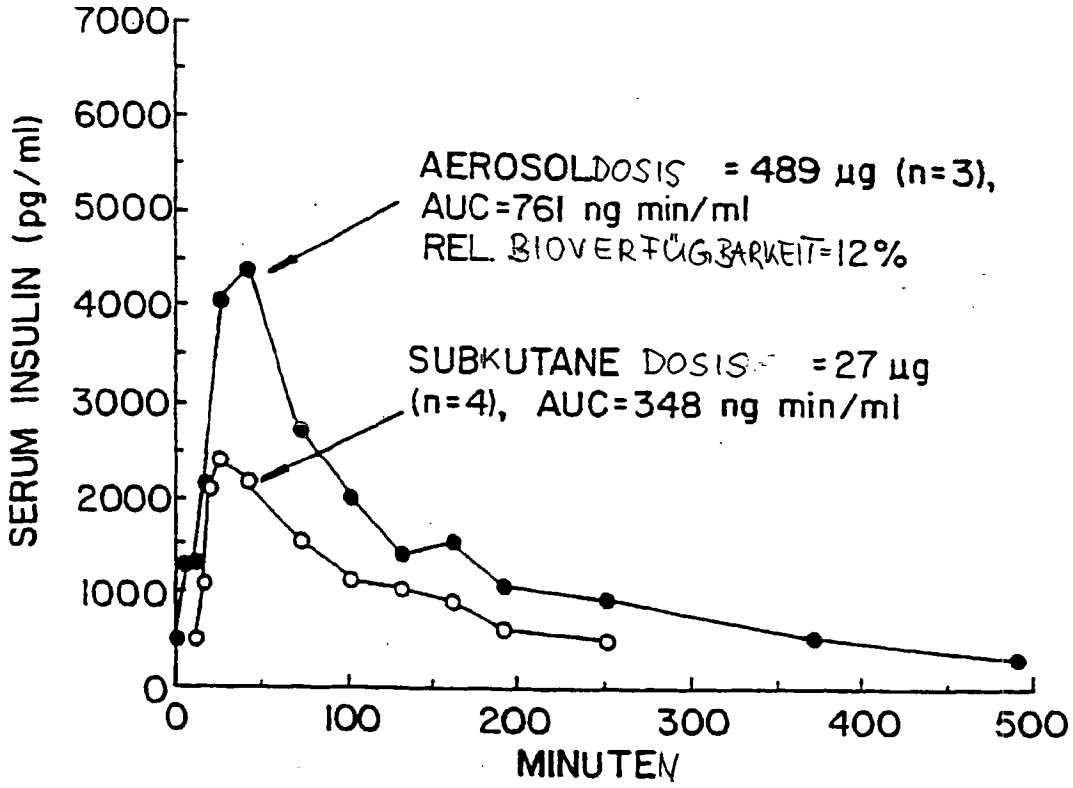

SERUM INSULIN (pg/ml)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
100
200
300
400
500
MINUTEN
AEROSOLDOSIS = 489 µg (n=3),
AUC=761 ng min/ml
REL. BIOVERFÜGBARKEIT=12%
SUBKUTANE DOSIS = 27 µg
(n=4), AUC=348 ng min/ml

FIG. 4A.

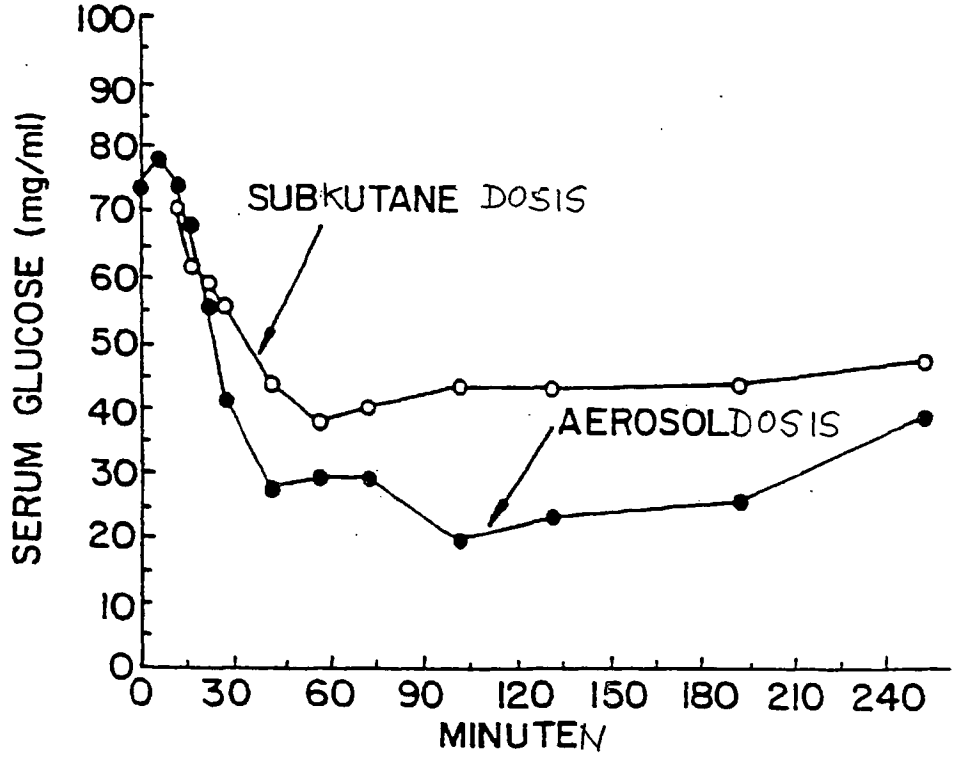

SERUM GLUCOSE (mg/ml)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
30
60
90
120
150
180
210
240
MINUTEN
SUBKUTANE DOSIS
AEROSOLDOSIS

FIG. 4B.

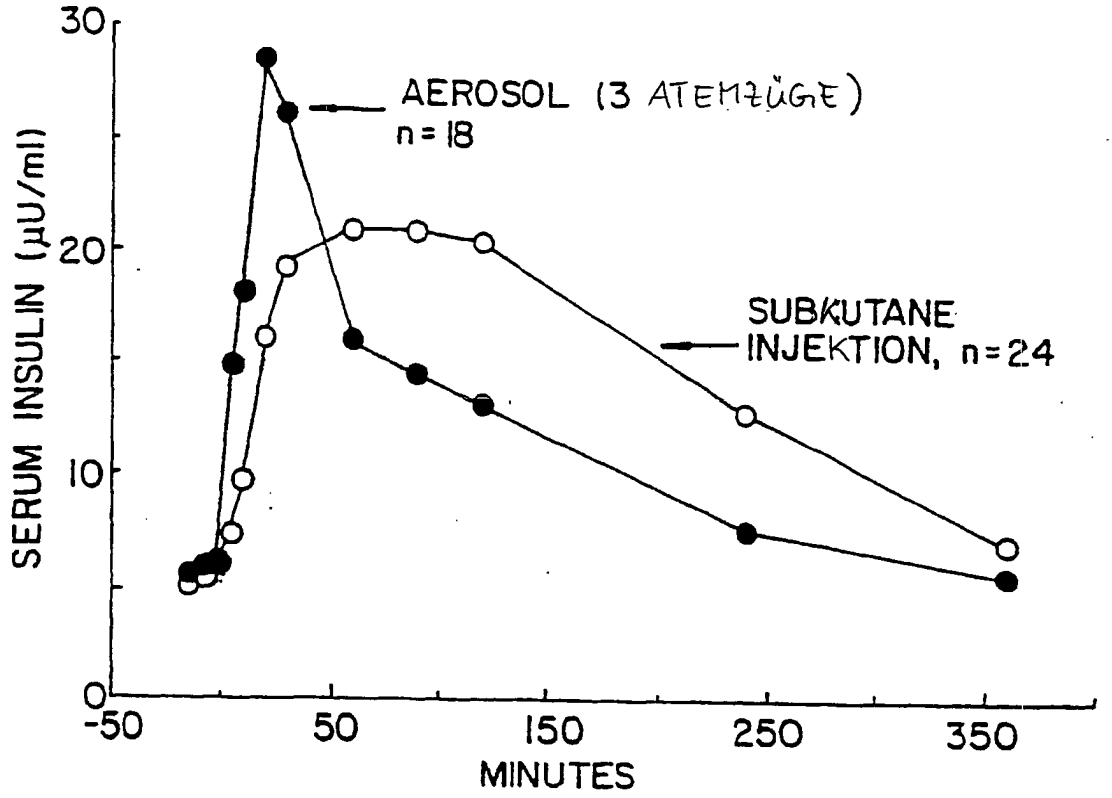

30
20
10
0
SERUM INSULIN (µU/ml)
AEROSOL (3 ATEMZÜGE)
n = 18
SUBKUTANE
INJEKTION, n=24
-50
50
150
250
350
MINUTES

FIG. 5A.

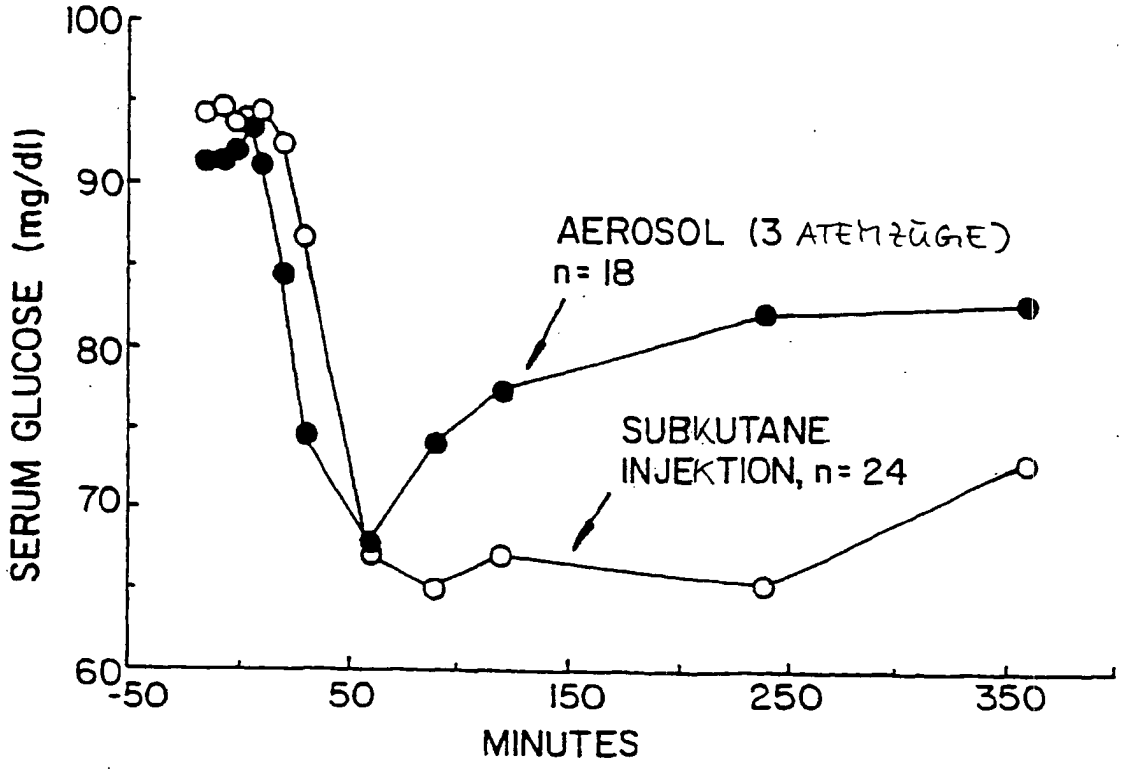

100
90
80
70
60
SERUM GLUCOSE (mg/dl)
AEROSOL (3 ATEMZÜGE)
n= 18
SUBKUTANE
INJEKTION, n= 24
-50
50
150
250
350
MINUTES

FIG. 5B.

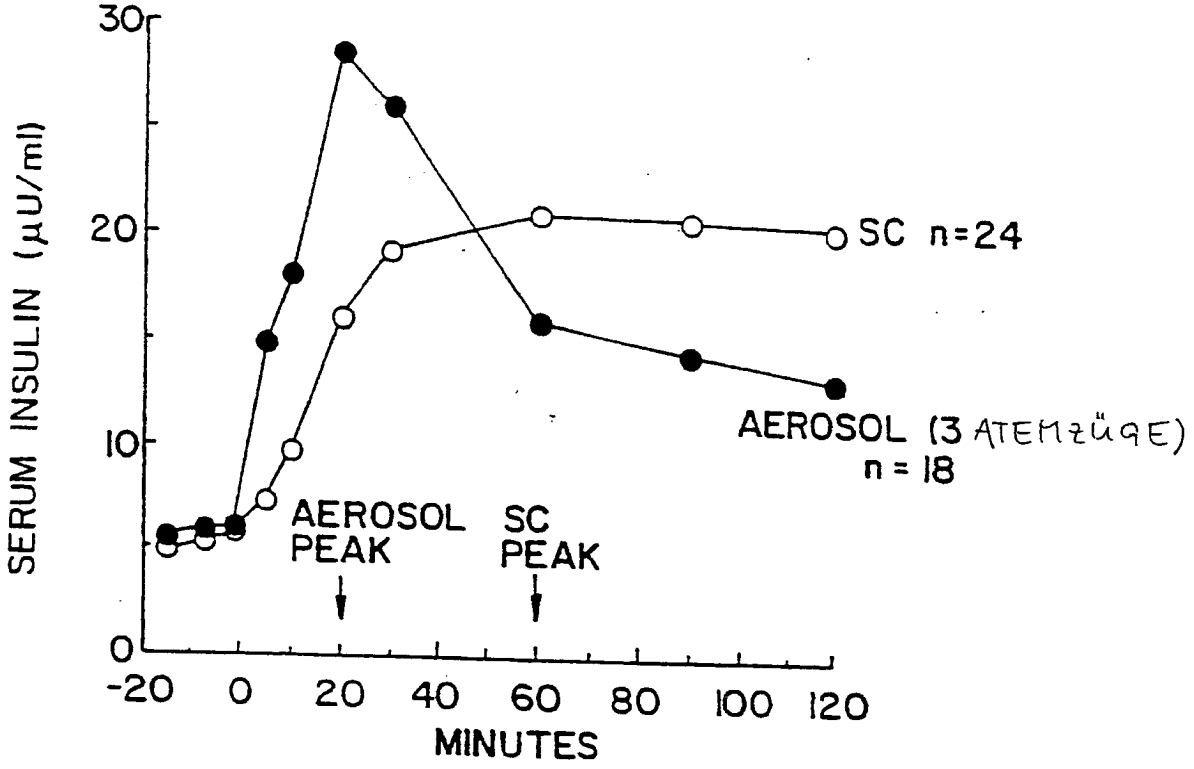

SERUM INSULIN (μU/ml)
30
20
10
0
-20
0
20
40
60
80
100
120
MINUTES
SC n=24
AEROSOL (3 ATEMZÜGE)
n = 18
AEROSOL PEAK
SC PEAK

FIG. 6A.

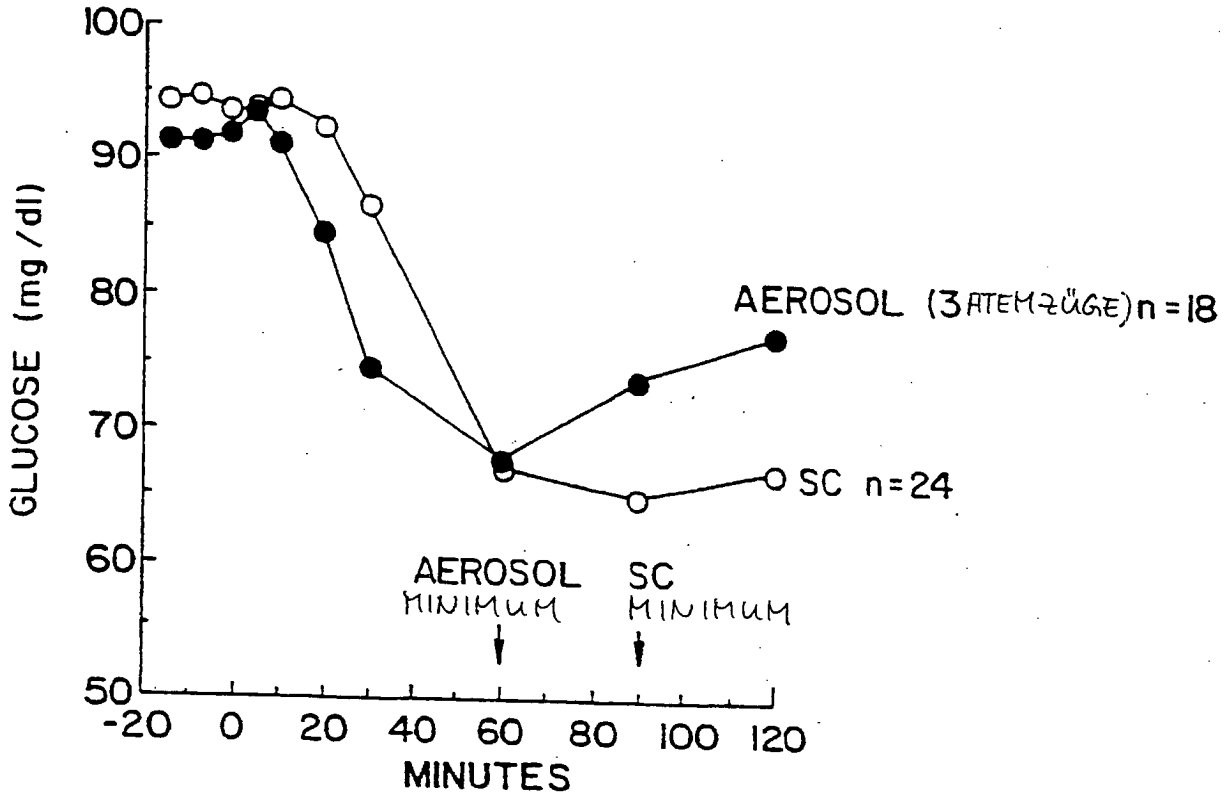

GLUCOSE (mg/dl)
100
90
80
70
60
50
-20
0
20
40
60
80
100
120
MINUTES
AEROSOL (3 ATEMZÜGE) n = 18
SC n=24
AEROSOL MINIMUM
SC MINIMUM

FIG. 6B.

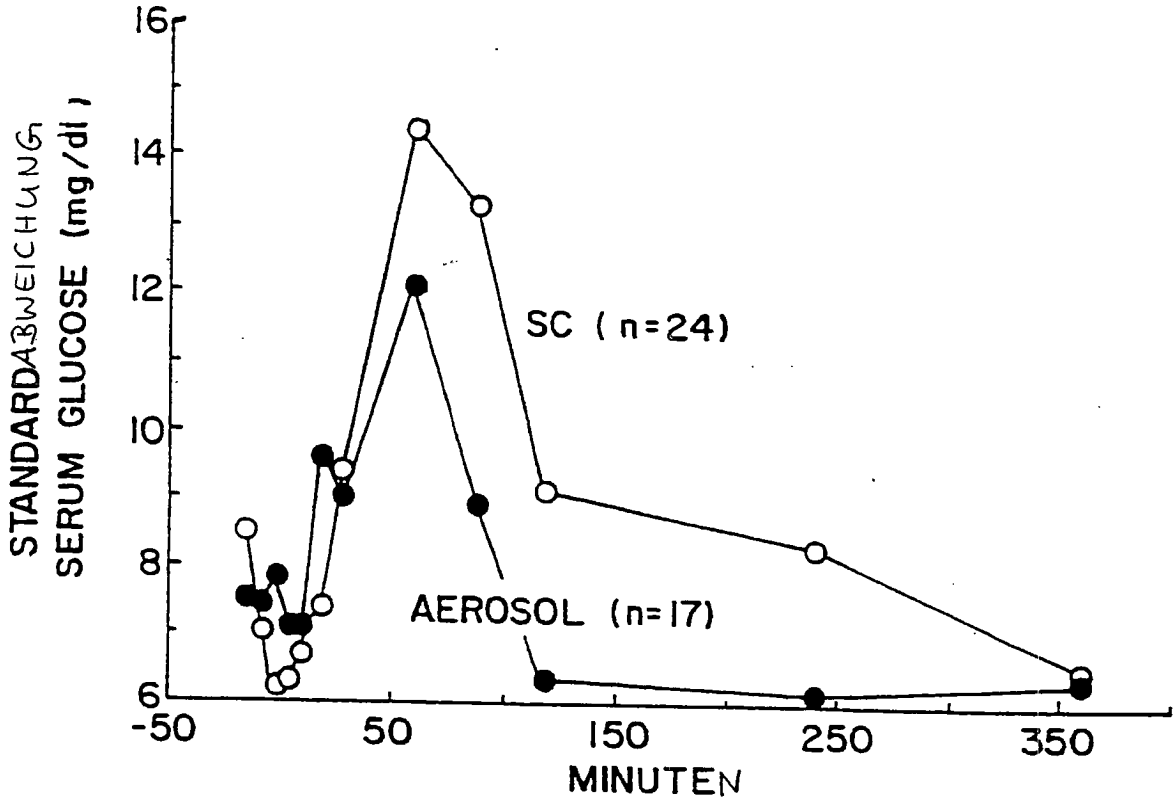

STANDARDABWEICHUNG
SERUM GLUCOSE (mg/dl)
16
14
12
10
8
6
SC (n=24)
AEROSOL (n=17)
-50
50
150
250
350
MINUTEN

FIG. 7A.

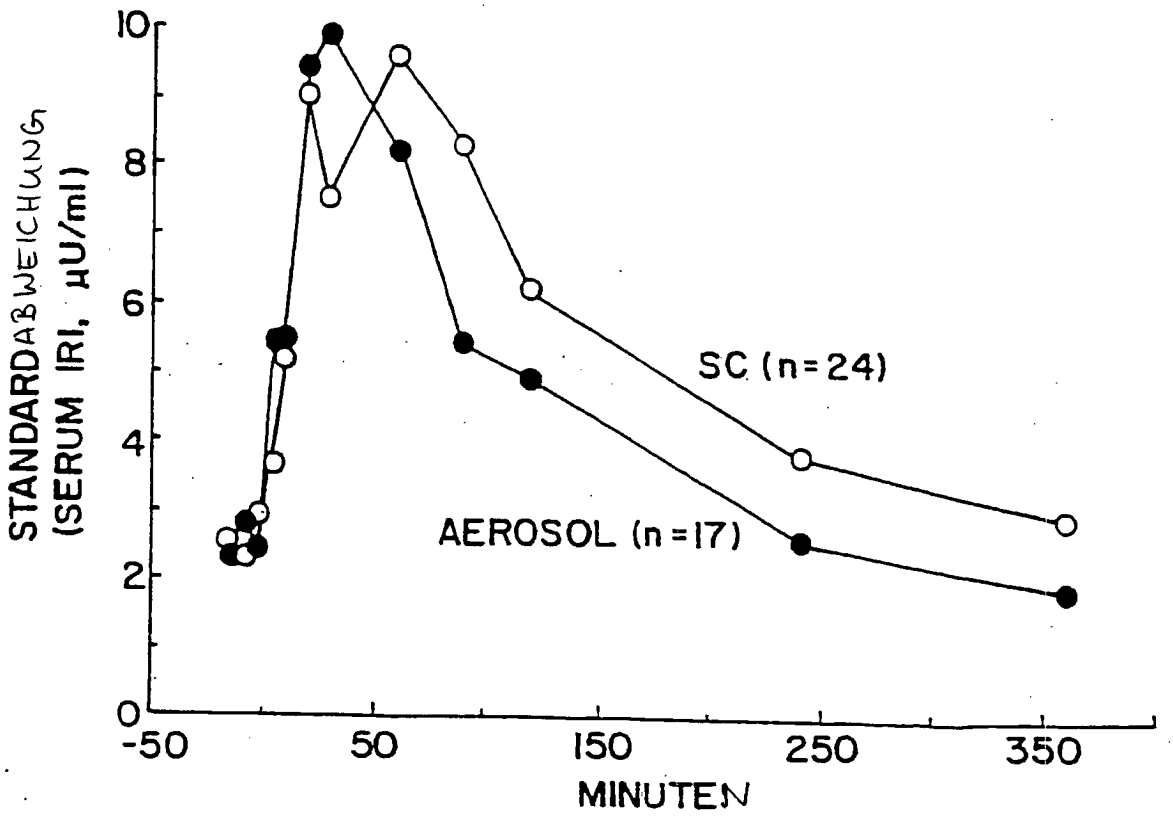

STANDARDABWEICHUNG
(SERUM IRI, µU/ml)
10
8
6
4
2
0
SC (n=24)
AEROSOL (n=17)
-50
50
150
250
350
MINUTEN

FIG. 7B.

FIG-8A

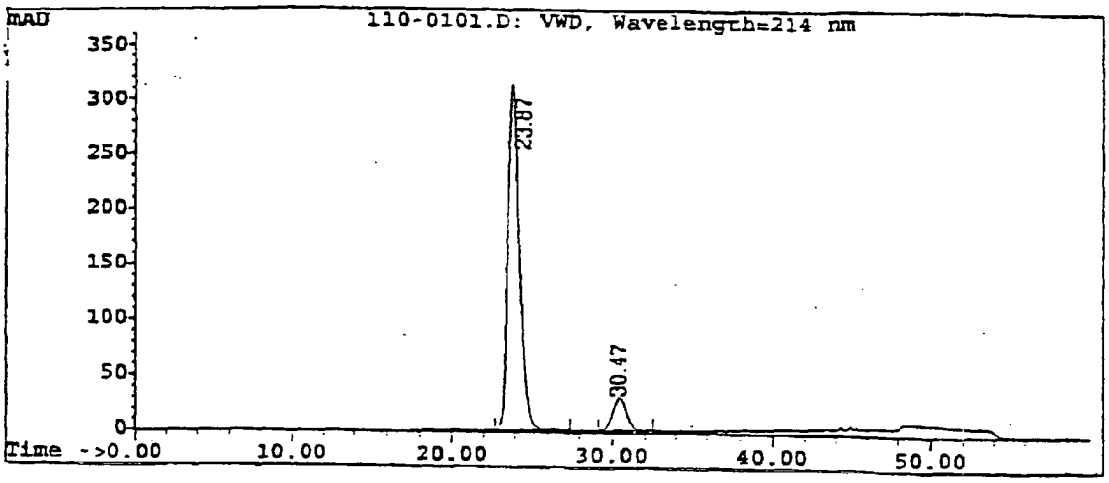


FIG-8B

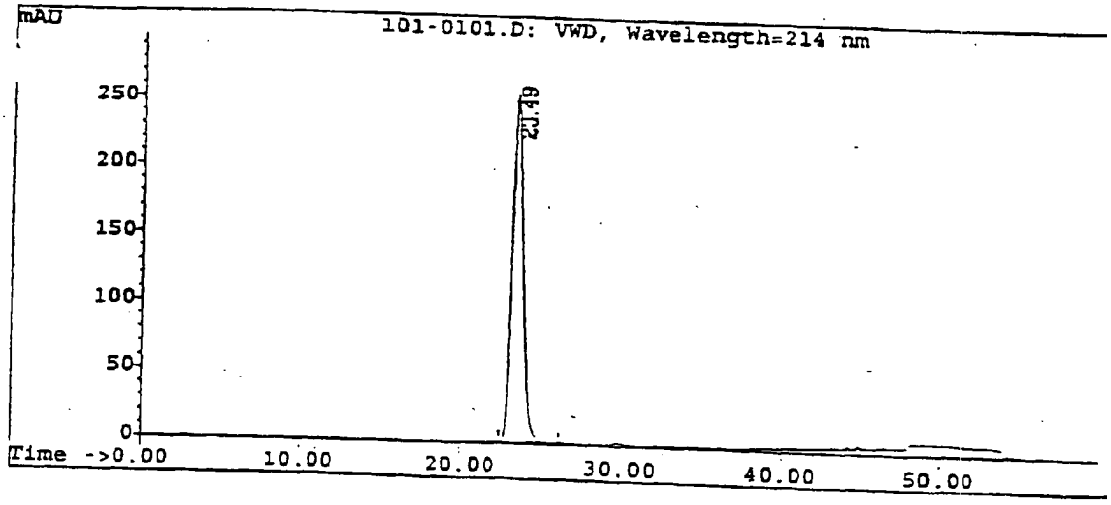
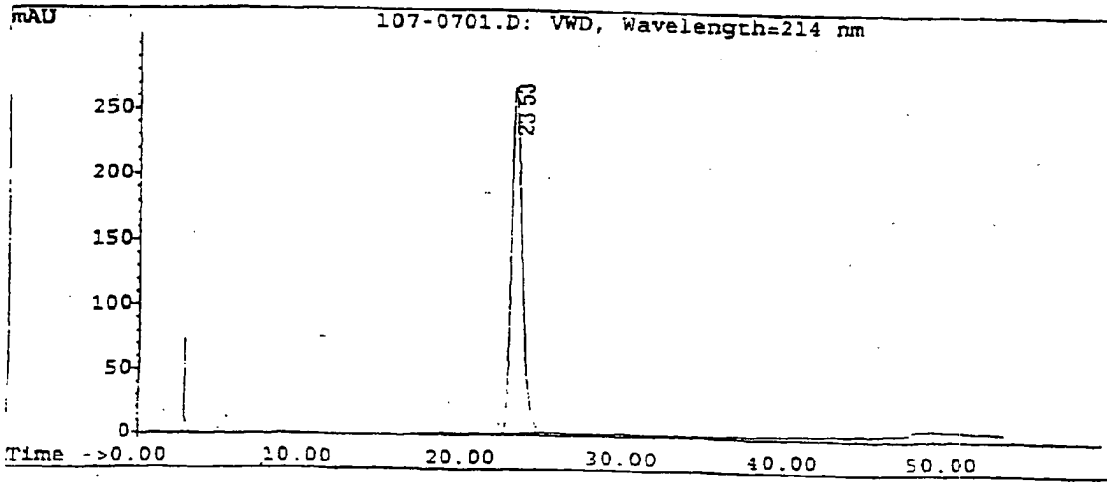


FIG-8C



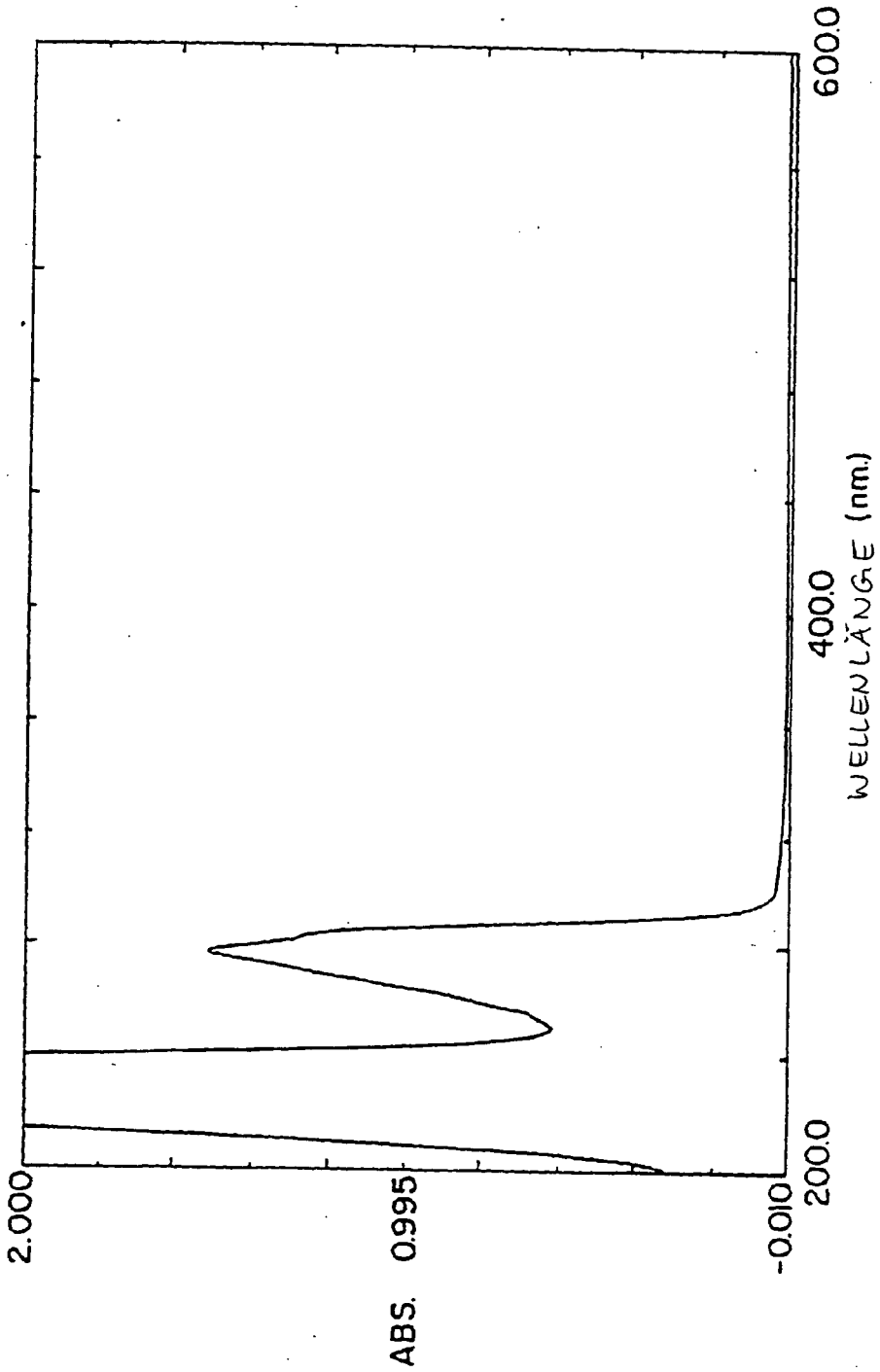


FIG. 9.