



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 17 783 T2 2006.01.05**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 231 926 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 17 783.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE00/02245**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 980 185.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/036656**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.11.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **25.05.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.08.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.01.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.01.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/728 (2006.01)**

A61K 38/27 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 5/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9904121 15.11.1999 SE

(73) Patentinhaber:

Jederström, Gustaf, Stockholm, SE

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

Jederström, Gustaf, 113 40 Stockholm, SE

(54) Bezeichnung: **BIOMOLEKULARER KOMPLEX, GEBILDET AUS HYALURONSÄURE UND EINEM BIOMOLEKÜL,
HERSTELLUNGSVERFAHREN DAFÜR UND DEREN THERAPEUTISCHE VERWENDUNG**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen neuen biomolekularen Komplex, der durch hydrophobe Wechselwirkungen gebildet wird, auf ein Verfahren zur Herstellung des Komplexes und auf die Verwendung des Komplexes zur Herstellung von pharmakologisch aktiven Zusammensetzungen für die Behandlung verschiedener Krankheiten.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Viele wichtige Arzneimittel umfassen Proteine und Peptide oder bestehen aus Proteinen und Peptiden, z.B. Insulin und Hormone usw. Die weitergehenden Entwicklungen in der Proteinchemie machen es in hohem Maße wahrscheinlich, dass zahlreiche therapeutisch wirksame Proteine oder Peptide noch entdeckt oder synthetisiert werden. Proteine und Peptide werden jedoch im gastrointestinalen Trakt verdaut und sind somit für eine orale Verabreichung ungeeignet. Daher werden Protein- und Peptid-Arzneimittel derzeit parenteral, z.B. durch subkutane Injektion, verabreicht.

[0003] Verschiedene Formulierungen, einschließlich Liposomeneinkapselung, wurden als Abgabevehikel für Proteine vorgeschlagen. Zusätzlich zum Schutz der Protein-Arzneimittel vor Verdauung müssen ihre Resorption im Körper und der nachfolgende Transport zu den Zielorganen sichergestellt werden. Sie müssen auch in aktiver Form an die Zielorgane abgegeben werden. Die Umgebung im gastrointestinalen Trakt und die Funktionen des gastrointestinalen Trakts haben bisher die Erreichung dieser Ziele wirksam verhindert. Es ist z.B. bekannt, dass Proteine und Polypeptide nur absorbiert werden, nachdem sie verdaut und zu kurzen Peptiden oder Aminosäuren reduziert wurden.

[0004] Es kann der Schluss gezogen werden, dass die pharmazeutische Forschung heutzutage entschlossen ist, die Fähigkeit von Arzneimitteln, die biologischen Membranen zu durchdringen, zu verbessern. Ein Ansatz besteht darin, Biomoleküle in ein Trägersystem, z.B. bioadhäsive Gele, Liposome oder Mikroperlen, einzuschließen. Ein anderer Ansatz besteht darin, Peptide und verwandte biologische Moleküle durch organische Verbindungen zu ersetzen, die für eine orale Abgabe konzipiert sind und eine Molekülmasse von weniger als 500 Dalton haben. Diese Strukturen werden auf Aktivierung löslicher Rezeptoren, z.B. in Mikrotiterplatten mit 96 Sonden oder in einem sogar noch dichteren Format, durchgemustert. Eine sehr große Anzahl von Strukturen kann in einfacher Weise in kurzer Zeit beurteilt werden, wobei Techniken wie Hochleistungsscreening und kombinatorische Chemie angewendet werden. Allerdings wurde bisher nur eine sehr begrenzte Anzahl von potentiellen Arzneimittelkandidaten mit einer aktiven Struktur gefunden, obgleich die Forschung vor mehr als einem Jahrzehnt begonnen wurde.

[0005] Hyaluronsäure ist ein natürlich vorkommendes Glycosaminoglycan, das aus einem linearen Polymer aus Repetiereinheiten von Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin besteht. Das Molekulargewicht kann in Abhängigkeit von der Quelle über einen weiten Bereich variieren. Hyaluronsäure liegt in mehreren Tiergeweben vor und in einigen spezifischen Organen, z.B. Hahnenkämmen, kommt sie in Konzentrationen vor, die für eine Extraktion im kommerziellen Maßstab hoch genug sind. Solche Gewebe enthalten Hyaluronsäure mit einem weiten Bereich der Molekulargewichte und werden während einer komplexen Serie von Extraktions-, Reinigungs- und Sterilisationsschritten gereinigt. Dies führt zu einem Endprodukt, das ein hohes Molekulargewicht innerhalb eines beachtlich engen Molekulargewichtsbereichs hat. Hyaluronsäure ist nicht-toxisch, wird im Körper leicht abgebaut und ist somit für eine pharmakologische Verwendung geeignet.

[0006] Ein im Handel verfügbares Hyaluronsäureprodukt ist HEALON® (Kabi Pharmacia AB, Uppsala, Schweden), das ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 4.000.000 Dalton hat. Es gibt viele Literaturstellen, die sich auf die Verwendung von viskoelastischen HA-Produkten in der Ophthalmologie und auf die Herstellung solcher Produkte, einschließlich der Herstellung chemisch-modifizierter HA, beziehen.

STAND DER TECHNIK

[0007] In der WO 90/05522 wird Hyaluronsäure als ein Träger zur langsamen Freisetzung in einem subkutan injizierten Depot mit langsamer Freisetzung zusammen mit einem Bindungsprotein für z.B. GH oder IGF genannt. Die aktiven Substanzen sind durch kovalente Bindungen an die Hyaluronsäure gebunden.

[0008] Hyaluronsäure wurde auch eingesetzt, um die Adhäsion von Biomolekülen an biologischen Membranen zu verbessern und somit die Internalisierung von Biomolekülen zu verbessern. Allerdings ist die medizinische Hauptverwendung von Hyaluronsäure derzeit die Verabreichung von gereinigter Hyaluronsäure (tieri-

schen Ursprungs oder durch Verwendung von rekombinanten Zellen synthetisiert) direkt an Stellen, an denen entweder eine mechanische Funktionsbarriere erforderlich ist (Viskochirurgie, Viskoprotektion, Viskoseparation, z.B. in der Augenchirurgie) oder dysfunktionelles Gewebe mechanisch supplementiert werden kann (Viskosupplementierung, Viskoaugmentation, z.B. in der kosmetischen Chirurgie).

[0009] Es hat sich gezeigt, dass Chitosan, ein kationisches Polymer, als Abgabevehikel für DNA fungiert. In der WO 98/01160 wird ein teilchenförmiger Komplex aus Chitosan und Nukleinsäure vorgeschlagen, um als neuer, nicht-viraler Vektor zur Gentherapie zu wirken. Es wird erläutert, dass das Chitosan die Plasmid-DNA zu einem Nanopartikel von zwischen 10 nm und 1 µm komprimiert und dem komprimierten Material geeignete Oberflächencharakteristika verleiht, die zu einem guten Anhaften des Partikels an der Oberfläche der Zielzelle führen, gefolgt von einer Internalisierung und einer Expression des codierten Materials. Es wird nahegelegt, dass dieser Komplex die Expression von Nukleinsäuren in Epithelgeweben, z.B. dem GI-Trakt, der Vagina, dem Rektum, der Nasenhöhle, den Lungen und der Mundhöhle verstärkt. Die Offenbarung der WO 98/01160 ist bedeutenderweise auf Chitosan, ein Polyglucosamin, das aus Meeresevertebraten oder dem Exoskelett von Insekten extrahiert wird, beschränkt ist. Chitosan ist somit eine Substanz, die für den menschlichen Körper fremd ist und kann durch den menschlichen Körper mit Ausnahme der Möglichkeit eines bakteriellen Abbaus, der möglicherweise im Kolon erfolgt, nicht metabolisiert werden.

[0010] In einem anderen Dokument, WO 97/15330, wird Hyaluronsäure zur Verwendung als DNA-Träger zur Gentherapie vorgeschlagen, um eine abnormale Retinavaskularisierung zu behandeln. In dieser Offenbarung wird die Nukleinsäure nicht komprimiert und die Hyaluronsäure wird lediglich als Targeting-Agens verwendet, was auf ihrer Fähigkeit, an Zellmembranen zu binden, beruht.

[0011] In der WO 90/09780 wird vorgeschlagen, dass ein Gemisch aus Insulin und DEAE-Dextran oder Chitosan an die Schleimhautoberfläche eines Menschen, z.B. die Schleimhautoberfläche der Vagina, des Auges, des Kolons oder der Nasenhöhle, abgegeben wird.

AUFGABEN DER ERFINDUNG

[0012] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Herstellung von verfügbaren Biomolekülen, die zur effizienten Aufnahme im Körper eines Säugers geeignet sind und insbesondere nach oraler Verabreichung, und die nach oraler Verabreichung eine therapeutische Wirkung zeigen.

[0013] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Biomolekül verfügbar zu machen, das die Hirn-Blut-Schranke passiert.

[0014] Eine weitere Aufgabe besteht darin, eine Hormonformulierung zur oralen Verabreichung verfügbar zu machen, wobei die Formulierung in vivo nach oraler Verabreichung eine therapeutische Wirkung aufweist.

[0015] Noch eine andere Aufgabe besteht darin, eine Insulinformulierung für eine orale Verabreichung verfügbar zu machen, wobei die Formulierung nach oraler Verabreichung in vivo eine therapeutische Wirkung aufweist.

[0016] Noch eine andere Aufgabe besteht darin, eine Wachstumshormonformulierung für eine orale Verabreichung verfügbar zu machen, wobei die Formulierung nach oraler Verabreichung in vivo eine therapeutische Wirkung aufweist.

[0017] Noch eine andere Aufgabe besteht darin, eine Heparinformulierung für eine orale Verabreichung verfügbar zu machen, wobei die Formulierung nach oraler Verabreichung eine therapeutische Wirkung in vivo aufweist.

[0018] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Medikament zur oralen Abgabe therapeutisch aktiver Biomoleküle verfügbar zu machen, wodurch die Notwendigkeit zur parenteralen Verabreichung, z.B. durch Injektionen, entfällt.

[0019] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, neue biomolekulare Komplexe zur Verwendung in der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung verschiedener Krankheiten verfügbar zu machen, wobei ein therapeutisch aktives Biomolekül oral abgegeben wird.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0020] Die vorliegende Erfindung löst die obigen Probleme, indem sie einen neuen Komplex zwischen einem pharmakologisch aktiven Biomolekül und Hyaluronsäure, der hydrophobe Wechselwirkungen beinhaltet, verfügbar macht. Die vorliegende Erfindung stellt auch neue therapeutische Formulierungen und ihre Verwendung bei der Herstellung eines Medikaments für therapeutische Anwendungen bereit.

[0021] Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Komplex zwischen einem Biomolekül und Hyaluronsäure, dadurch gekennzeichnet, dass der Komplex durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Komponenten gebildet ist.

[0022] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Komplex zwischen einem Biomolekül und Hyaluronsäure dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül im wesentlichen hydrophob gemacht ist und in Hyaluronsäure eingeschlossen ist.

[0023] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Komplex dadurch gekennzeichnet, dass die Größe des Biomoleküls reduziert ist, vorzugsweise auf weniger als etwa 10 % seiner ursprünglichen Größe.

[0024] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Komplex dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül ein Peptid ist.

[0025] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Komplex dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül ein Protein ist.

[0026] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Komplex dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül ein Glycoprotein ist.

[0027] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Komplex dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül ein Polynukleotid ist.

[0028] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Komplex dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid unter den folgenden Substanz-Gruppen ausgewählt ist: Hormone, Neuropeptide, Signalpeptide, Peptidantibiotika, Peptidantigene, Antibiotika und natürlich vorkommende oder synthetische Aminosäurepolymere.

[0029] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Komplex dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid unter den folgenden Substanzen ausgewählt ist: Insulin, Wachstumshormon, humanes Wachstumshormon, Glucagon, Kortikotropin, Oxytocin, Bradykinin, Thyreotropin-Releasingfaktor und Thyreotropin, Enkephaline und Peptid-Antibiotika.

[0030] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Komplex dadurch gekennzeichnet, dass das Polynukleotid unter den folgenden ausgewählt ist: Plasmide, DNA, RNA, cDNA, mRNA, rekombinante DNA, rekombinante RNA und Kombinationen davon.

[0031] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Komplex dadurch gekennzeichnet, dass die Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von weniger als etwa 400 kDa, vorzugsweise im Intervall von 60 bis 360 kDa ist.

[0032] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Komplex dadurch gekennzeichnet, dass die Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa ist.

[0033] Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Medikament zur oralen Abgabe von Biomolekülen, dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül in den oben definierten Hyaluronsäure-Komplex eingearbeitet ist und dass der resultierende Komplex einem Patienten oral verabreicht wird.

[0034] Eine andere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Komplexes aus einem Biomolekül und Hyaluronsäure, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren die folgenden Stufen umfasst:

- a) Auflösen von Hyaluronsäure in einer Elektrolytlösung,
- b) Zugeben des Biomoleküls zu der gelösten Hyaluronsäure und
- c) Dialysieren der Lösung bei etwa neutralem pH.

[0035] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass die Säure in Stufe a) aus Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure und Essigsäure ausgewählt wird und der pH im Bereich von 1,0 bis 3,0 liegt.

[0036] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrolytlösung von Stufe a) Kationen, die unter NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} ausgewählt sind, und Anionen, wie z.B. Sulfat, Nitrat, Chlorid, Hydroxid und Acetat enthält.

[0037] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Verfahren dadurch charakterisiert, dass der pH in Stufe c) im Intervall von 5,5 bis 7,5, vorzugsweise im Intervall von 6,0 bis 7,0, liegt.

[0038] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass die Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von weniger als etwa 400 kDa, vorzugsweise im Intervall von 60 bis 360 kDa, ist.

[0039] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass die Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa ist.

[0040] Eine andere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Insulin für die Herstellung eines Komplexes mit Hyaluronsäure zur Verwendung als Medikament zur Behandlung von Diabetes.

[0041] Eine andere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Wachstumshormon zur Herstellung eines Komplexes mit Hyaluronsäure zur Verwendung als Medikament für die Behandlung von Wachstumshormon-Defizienzen.

[0042] Eine andere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Wachstumshormon für die Herstellung eines Komplexes mit Hyaluronsäure zur Verwendung als Medikament für die Prävention von Transplantatabstoßungen.

[0043] Eine andere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Heparin oder bioaktiven Derivaten davon für die Herstellung eines Komplexes mit Hyaluronsäure zur Verwendung als Medikament.

[0044] Erfindungsgemäß werden Peptide reversibel komprimiert, z.B. von einer Größe von 2,4 nm auf weniger als 0,3 nm, wodurch ihre Fähigkeit, biologische Membranen zu durchdringen, wie z.B. die Darmwand, verbessert wird. Ein Plasmid-DNA-Konstrukt wurde reversibel von 87 nm auf weniger als 10 nm komprimiert, wodurch die DNA-Struktur für einen freien Durchgang durch die Kernpore verbessert wurde. In ähnlicher Weise wurden erfindungsgemäße Komplexe mit Wachstumshormon, Insulin und Heparin produziert und getestet. Ein Weg zur Herstellung dieser neuen hydrophoben Komplexe sind pH-Änderungen, Eliminierung der molekularen Ladung und von molekularen Bindungen, Entfernung von Wasser und Ionen und eine abschließende Stabilisierung mit Hyaluronan.

[0045] Der vollständige biologische Effekt der komprimierten Peptide wurde in biologischen Assays und in vivo bewiesen. Die Größe und die dauerhaften hydrophoben Eigenschaften des Peptids, erhalten bei pH 6, legen eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit nahe. Die Komprimierung eines Plasmid-DNA-Komplexes von etwa 87 nm auf etwa 7,5 nm legt die Möglichkeit nahe, eine verbesserte Transfektionseffizienz zu erreichen.

[0046] Diese reversibel komprimierten Komplexe können auf neuen Wegen verabreicht werden und vermeiden daher die Notwendigkeit einer parenteralen Verabreichung. Die neuen Wege, die für diese Komplexe verfügbar gemacht wurden, umfassen eine orale, pulmonale, nasale und topische Verabreichung und einen intrazellulären Transport.

[0047] Die Vermeidung einer parenteralen Verabreichung wird eine Arzneimittelanwendung angenehmer machen, z.B. für ambulante Patienten, Patienten mit Selbstmedikation und speziell für Kinder und ältere Patienten.

ten. Ein Arzneimittel gemäß der Erfindung wird auch einfacher zu handhaben sein, was zu einer verbesserten Compliance führt.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0048] Die Erfindung wird in der folgenden Beschreibung, den folgenden Beispielen und den beigefügten Zeichnungen näher beschrieben; in den Zeichnungen zeigen:

[0049] [Fig. 1](#) den hydrodynamischen Radius in nm als Funktion der Hyaluronsäurekonzentration in µg/ml in verschiedenen Verdünnungen;

[0050] [Fig. 2](#) das kinetische Blutglucoseprofil bei 6 Ratten, die einen Insulin-Hy-Komplex (2,44 mg/ml, 9,5 E) durch subkutane Injektion erhalten;

[0051] [Fig. 3](#) das kinetische Blutglucoseprofil in 6 Ratten, die eine Insulinreferenz (4,56 mg/ml, 17,8 E) durch subkutane Injektion erhalten;

[0052] [Fig. 4](#) eine AFM (Atomic Force Microscopy)-Fotografie einer Probe des Insulin-Hy-Komplexes mit einer Konzentration von 134 E Insulin/ml, die deutlich sichtbare Punkte zeigt;

[0053] [Fig. 5](#) eine AFM-Fotografie einer Probe des Insulin-Hy-Komplexes mit einer Konzentration von 40,4 E Insulin/ml, die deutlich sichtbare Punkte zeigt;

[0054] [Fig. 6](#) die Blutglucosespiegel in 3 Ratten nach oraler Verabreichung eines Insulin-Hy-Komplexes (1 ml, 28 E/ml);

[0055] [Fig. 7](#) die Blutglucosespiegel in 3 Ratten nach oraler Verabreichung eines Insulin-Hy-Komplexes, wobei Ratte Nr. 1 und Nr. 2 eine Hungerdiät machten und Ratte Nr. 1 0,2 ml 134 E/ml oder 27 E erhielt, Ratte Nr. 2 1 ml 62 E erhielt und Ratte Nr. 3 normale Nahrung und 1 ml 62 E Insulin erhielt;

[0056] [Fig. 8](#) die Blutglucosespiegel in 2 Ratten nach subkutaner Verabreichung der Insulinreferenz (0,065 ml, 4 mg/ml, 6,8 E); und

[0057] [Fig. 9](#) die Gewichtszunahme in % bei Hx-Ratten, die den rhGH-Komplex erhalten, im Vergleich zu Ratten, die nicht mit rhGH behandelt wurden, und Placebo.

BESCHREIBUNG

[0058] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Bildung eines Komplexes zwischen Hyaluronsäure und einem Biomolekül, der hydrophobe Wechselwirkungen involviert, auf die orale Verabreichung dieser Biomoleküle und auf verschiedene Verfahren, die die Verabreichung dieser Biomoleküle beinhalten. Wenn die notwendigen hydrophoben Stellen zur Komplexbildung nicht verfügbar sind, wird das Biomolekül wenigstens teilweise durch ein Verfahren hydrophob gemacht, das hierin Komprimierung bzw. Kompression genannt wird. Die Erfindung stellt somit ein Verfahren zur Herstellung von komprimierten Biomolekülen und Komplexen gemäß der Erfindung bereit.

[0059] In der Beschreibung werden die folgenden Ausdrücke verwendet werden:

[0060] Der Ausdruck "Biomolekül" wird in der Beschreibung, den Beispielen und den Ansprüchen verwendet, um alle Moleküle, synthetische und natürliche, zu definieren, die in vivo eine Wirkung aufweisen. Beispiele für Biomoleküle umfassen Peptide, Proteine, Glycoproteine, Glycosaminoglucane und Zucker. Der Ausdruck "pharmakologisch aktive Substanz" wird als Synonym für den obigen Begriff verwendet.

[0061] Der Ausdruck "Peptid" umfasst Hormone, Neuropeptide, Signalpeptide, Peptidantibiotika, Peptidantigene und andere natürlich vorkommende oder synthetische Aminosäurepolymere.

[0062] Unter den natürlich vorkommenden, rekombinanten und synthetischen Peptiden, die zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind Hormone, wie z.B. Insulin, Wachstumshormon und humanes Wachstumshormon, Glucagon, Kortikotropin, Oxytocin, Bradykinin, Thyreotropin-Releasingfaktor und Thyreotropin, Enkephaline und Peptidantibiotika.

[0063] Der Ausdruck "Proteine" beinhaltet Enzyme, Transportproteine, Nährstoff- und Speicherproteine, kontraktile oder motile Proteine, Strukturproteine, Abwehrproteine, regulatorische Proteine und andere Proteine entsprechend einer Textbuchdefinition.

[0064] Unter natürlich vorkommenden, rekombinanten und synthetischen Proteinen, die zur Verwendung gemäß der Erfindung geeignet sind, sind Enzyme, z.B. Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen; Transportproteine, wie z.B. Metalloproteine, Hämoproteine, Phosphorproteine, Glycoproteine und Lipoproteine; Abwehrproteine, z.B. Proteine, die bei der Immunabwehr teilnehmen, beispielsweise Immunglobuline, Antikörper, Proteine, die bei der Gewebereparatur beteiligt sind, z.B. Fibrinogen, Thrombin usw.; regulatorische Proteine, wie z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, beispielsweise epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Nervenwachstumsfaktor (NGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), von Thrombozyten abgeleiteter Wachstumsfaktor ("platelet derived growth factor") (PDGF), Erythropoietin, Zytokine, Lymphokine, einschließlich Interleukine (IL-1, IL-2 usw.) und Interferone.

[0065] Der Ausdruck "hydrophobe Bindung" wird im vorliegenden Kontext verwendet, um Bindungen zu definieren, die im wesentlichen hydrophober Natur sind und durch Kräfte über weite Entfernungen, z.B. van der Waals-Kräfte, zwischen hydrophoben Teilen eines Biomoleküls und den hydrophoben Teilen eines Moleküls, das das Biomolekül umgibt, beeinflusst werden.

[0066] Die Ausdrücke "Kompression" bzw. "Komprimierung" und "komprimiert", wie in "komprimiertes Biomolekül", werden in diesem Text verwendet, um eine reversible Größenreduktion zu definieren, die an den Biomolekülen gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt wird.

[0067] Der Ausdruck "reversibel" bedeutet in diesem Kontext, dass das Biomolekül nach Kompression und Verabreichung an einen Säuger, insbesondere nach oraler Verabreichung an einen Säuger, seine biologische Wirkung in vivo beibehält oder wieder erlangt.

[0068] Mit "Hyaluronsäure" ist Hyaluronsäure sowohl in protonierter als auch in nichtprotonierter Form, ungeachtet ihrer Herkunft, gemeint. Die Erfindung umfasst somit die Verwendung von Hyaluronsäure sowohl tierischen als auch bakteriellen Ursprungs, z.B. Hyaluronsäure, die durch genetisch modifizierte Organismen produziert wird. Im allgemeinen umfasst die Erfindung die Verwendung aller Hyaluronsäurederivate, die die physiologischen Eigenschaften, die mit Hyaluronsäure in Verbindung stehen, nicht gefährden. Ferner umfasst die Erfindung die Verwendung von Derivaten und Komplexen, die im menschlichen Gastrointestinaltrakt in Hyaluronsäure umgewandelt werden können. Die Hyaluronsäuremoleküle liegen normalerweise in Form von Schleifen vor, allerdings hat der Erfinder der vorliegenden Erfindung überraschenderweise gefunden, dass sie in Gegenwart von Protonen, H^+ , begradigt werden können. Wenn demnach HCl zu einer Lösung von Hyaluronsäure eines vorbestimmten Molekulargewichts gegeben wird, werden die Moleküle gerade werden und positiv geladen werden.

[0069] Vorzugsweise wird Hyaluronan (Hy) mit einem Molekulargewicht im Bereich von 80 bis 360 kDa, bevorzugter Hy mit einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa, verwendet.

[0070] Eine optimale Kompression (= Kompressionsgröße) und optimale hydrophobe Eigenschaften von Plasmid (vorzugsweise kleiner als etwa 10 nm) und Peptiden (vorzugsweise weniger als etwa 0,3 nm) werden durch Eliminierung von Ladung und molekularen Bindungen durch Zusatz von HCl zu pH < 2 und unterschiedlichen Ionen gefunden. Diese Ionen sind Kationen: NH_4^+ , K^+ , Na^+ , und Anionen: Sulfate, Chlorid, Carbonate, Acetate.

[0071] Ein stabiler Komplex/ein stabiles Polymer wird durch Hy, das das Plasmid umgibt, bzw. die Peptide umgibt, gebildet, wenn Hy seine Struktur zurück zu einer gekräuselten Struktur, wenn der pH auf pH 6 geändert wird, verändert. Es ist dann möglich, die Lösungen auf die gewünschte Stärke zu verdünnen.

[0072] Der resultierende Polymerkomplex kann in Form eines Präzipitats, einer kolloidalen Lösung oder einer echten Lösung, vorzugsweise in Form einer kolloidalen Lösung, hergestellt werden. Der Komplex kann auch in Form eines lyophilisierten Pulvers hergestellt werden.

[0073] Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung des hydrophoben biomolekularen Komplexes. Das Verfahren umfasst die Schritte:

- a) Solubilisierung des Polymers und Solubilisierung der polaren Biostruktur durch Zusatz einer Säure;
- b) Zusammenbrechen der polaren Biostruktur durch Zusatz eines Elektrolyten, in dem die polare Biostruktur

über den Punkt des Zusammenbruchs der polaren Biostruktur gebracht wird, und Verändern der hydrodynamischen Radii zu einer komprimierten Mindestgröße; und

c) Dialysieren der biomolekularen Struktur, wobei ein komprimierter hydrophober Komplex mit versteckten polaren Gruppen und dem die Biostruktur umgebenden Polymer erhalten wird.

[0074] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Säure in Stufe a) Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Essigsäure und ist der pH kleiner als 3 und liegt vorzugsweise im Bereich von 1,0 bis 2,5.

[0075] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält der Elektrolyt in Stufe b) Kationen, wie z.B. NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , und Anionen, wie z.B. Sulfate, Chlorid und Acetate.

[0076] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der hydrophobe biomolekulare Komplex als Medikament verwendet.

[0077] Es ist überraschend, dass Hyaluronsäure in der Art, die in der vorliegenden Beschreibung und den Beispielen beschrieben wird, verwendet werden kann, da ein Problem, das mit Hyaluronsäure verbunden ist, seine extreme und unerwünschte Adsorption von Peptiden ist. Dies ist ein bei der Herstellung von Hyaluronsäure für medizinische Zwecke gut dokumentiertes Problem, da hier eine Peptidkontamination oder eine Oligonukleotidkontamination (z.B. DNA, RNA) das Produkt für eine Verwendung ungeeignet macht, da die verbleibenden Peptide für den Patienten pyrogen oder reizend sind.

[0078] Ein Problem, das für die Verabreichung von Insulin spezifisch ist, ist das sehr enge Dosisintervall, das von den Patienten toleriert wird. Es ist daher in hohem Maße überraschend, dass der Komplex aus Hyaluronsäure und Insulin gemäß der vorliegenden Erfindung bei niedrigen Dosen eine Wirkung ergibt und auch bei sehr hohen Dosen toleriert wird, wie es in den in vivo-Experimenten gezeigt wird.

[0079] Die erfindungsgemäßen Komplexe aus Biomolekülen und Hyaluronsäure sind auch für eine parenterale Verabreichung geeignet. Bei dieser Anwendung haben sie die Vorteile einer andauernden Wirkung und einer höheren Dositoleranz. Außerdem wird die Notwendigkeit einer chemischen Modifizierung der Substanzen – anders als bei Bildung des Komplexes mit Hyaluronsäure – vermieden.

[0080] Ein Komplex gemäß der Erfindung wird dem Patienten oral, in Form einer Suspension, einer Kapsel, einer Tablette, einer enterisch beschichteten Kapsel oder einer anderen oralen Abgabeform, die Vehikel und Adjuvanzen, welche üblicherweise für orale Präparationen verwendet werden, einschließen, verabreicht.

[0081] Ein Komplex gemäß der Erfindung wird dem Patienten transdermal in Form einer Suspension, eines Gels oder einer Paste oder einer anderen oralen Abgabeform, die Vehikel und Adjuvanzen enthält, die üblicherweise für transdermale Präparationen eingesetzt werden, verabreicht.

[0082] Ein erfindungsgemäßer Komplex wird dem Patienten nasal in Form eines Aerosols einer Flüssigkeit oder fester Partikel oder als andere nasale Abgabeform, die Vehikel und Adjuvanzen, die üblicherweise für nasale Präparationen verwendet werden, enthält, verabreicht. Ähnlich wie bei der nasalen Verabreichung kann der erfindungsgemäße Komplex oral durch Inhalation in Form eines Aerosols einer Flüssigkeit oder fester Partikel oder als andere Abgabeform, die Vehikel und Adjuvanzen, die üblicherweise für Präparationen verwendet werden, die zur Inhalation bestimmt sind, verabreicht werden.

[0083] Obgleich der erfindungsgemäße Komplex für eine orale Abgabe speziell geeignet ist, kann er auch subkutan oder intramuskulär verabreicht werden. Bei parenteraler Verabreichung wird der erfindungsgemäße Komplex eine bessere Bioverfügbarkeit aufweisen und kann als Präparation mit verlängerter Freisetzung fungieren.

[0084] Die Verwendung von Hyaluronsäure hat einen speziellen Vorteil, dass nämlich endogene Wege zur Metabolisierung der Hyaluronsäure leicht verfügbar sind. Da der menschliche Körper eine hohe Kapazität besitzt, große Mengen an Hyaluronsäure zu metabolisieren, belasten die kleinen Mengen, die gemäß der vorliegenden Erfindung therapeutisch angewendet werden, den systemischen Metabolismus nicht signifikant zusätzlich.

[0085] Der erfindungsgemäße Komplex und die erfindungsgemäßen Verfahren haben auch einen beachtli-

chen Vorteil dadurch, dass derzeit verfügbare Pharmazeutika, die für den menschlichen Gebrauch zugelassen sind, effizienter eingesetzt werden können und – im Fall einer oralen Verabreichung – über einen neuen Verabreichungsweg, der bisher für diese Pharmazeutika nicht zugänglich war, abgegeben werden können. Da sowohl Hyaluronsäure als auch die zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung vorgeschlagenen Pharmazeutika gründlich untersucht sind, können die Tests, die für die neuen Komplexe erforderlich sind, auf ein Minimum beschränkt werden.

[0086] Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht außerdem darin, dass die Herstellungskosten für die meisten dieser neuen Arzneimittel geringer sein werden als die Kosten für die Stammarzneimittel, da es weniger strenge Erfordernisse für die sterile Herstellung von oral verabreichten Arzneimitteln gibt.

BEISPIELE

BEISPIEL 1: Der Einfluss einer pH-Änderung auf den hydrodynamischen Radius

[0087] Es wurde eine wesentliche Pufferkapazität in einer wässrigen Hy-Lösung beobachtet, wenn verdünnte Säuren zugesetzt wurden. Lösungen starker Säuren sollten infolge des Zusammenbrechens der polymeren Hy-Struktur und auch im Hinblick auf einen Verlust der Acetylgruppe vermieden werden. Die Zeit für Untersuchungen von Hy mit verschiedenen Plasmid/Peptiden sollte daher auf etwa 30 min begrenzt werden.

[0088] Die Partikelgröße von Hy wurde bei pH-Änderungen studiert. Die dynamische Lichtstreuung, 500 mV, wurde für 3 Hy-Konzentrationen, 90, 30 und 10 µg/ml, bestimmt. Malvern, ZetaMaster S, Version PCS: V 1,26 wurde zur Bestimmung des pH und des ζ-Potentials verwendet.

[0089] Die resultierenden Relaxationszeitverteilungen sind bei allen Bedingungen im wesentlichen single-modal. Die Peak-Breite nimmt im allgemeinen mit steigender Konzentration ab, und zwar infolge eines größeren Signal-Rausch-Verhältnisses.

[0090] [Fig. 1](#) zeigt den hydrodynamischen Radius (R_n) in nm (0 – 300) als Funktion der Hy-Konzentration in µg/ml. Die berechneten hydrodynamischen Radii liegen für die unverdünnten Proben und die mit Wasser verdünnten Proben auf derselben Linie. Proben, die mit Säure verdünnt wurden, haben eine beträchtlich größere Partikelgröße. Die echten Partikelgrößen im Gegensatz zu den scheinbaren Werten, die durch Wechselwirkungen beeinflusst werden, sind bei begrenzten Konzentrationen 65 nm (Wasserlösungen) und 105 (säureverdünnt). Es ist erwähnenswert, dass die gestreuten Intensitäten für die unverdünnten Proben und die mit Wasser verdünnten Proben dieselben sind, der Wert für die mit Säure verdünnten aber der 2-Fache ist; z.B. 11 kHz für die mit Wasser verdünnten und 26 kHz für die mit Säure verdünnten Lösungen. Dies steht in Übereinstimmung mit einer Zunahme der Partikelabmessungen in mit Säure verdünnten Hy-Lösungen. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Hy-Struktur bei Zusatz einer starken Säure von einem gewundenen Zylinder in eine gerade Linie gedehnt wird.

[0091] Hy mit einem Molekulargewicht von 150 k Dalton wird positiv geladen (3,1 bis 16,9 mV), wenn der pH sich von pH 6,5 zu 1,5 ändert. Partikelgrößenmessungen durch dynamische Lichtstreuung, 500 mV, zeigen, dass die Hy-Struktur bei Zugabe einer starken Säure von einem gewundenen Zylinder zu einer geraden Linie gestreckt wird. Der pH wird von 6,5 auf 1,5 geändert und der hydrodynamische Radius wird fast verdoppelt oder von 65 zu 105 nm verändert.

BEISPIEL 2: Herstellung eines Komplexes von Insulin und Hyaluronan zur oralen und parenteralen Verabreichung

[0092] Das Ziel dieser Studie war es, zu beurteilen, ob der Insulinkomplex biologische Wirkung hatte, die Dauer einer solchen Wirkung zu beurteilen und die Dosis zu bestimmen, die erforderlich ist, um eine signifikante Abnahme beim Blutglucosespiegel zu erhalten.

[0093] Die verwendeten Substanzen waren:

- Humanes rekombinantes Insulin (Roche)-Lyophilisat, steril, spezifische Aktivität > 26 E/mg.
- Hyaluronan (Hy), Molekulargewicht 150.000 Dalton, hergestellt durch fraktionierte Hydrolyse. Das mittlere Molekulargewicht wurde durch Größenausschlusschromatographie (SEC) bestimmt.

[0094] Die folgenden Präparationen wurden zur parenteralen Verabreichung an Streptozotocin-Diabetes-Ratten verwendet:

- 1) Eine Placebo-Lösung, bestehend aus einer wässrigen isotonischen Natriumchlorid-Lösung (0,9 %)
- 2) Ein Komplex von Insulin-Hy (2,44 mg/ml), Dosis $3 \times 0,05$ ml oder 9,5 E/Ratte und Tag
- 3) Humanes Insulin, (rDNA), Dosis $3 \times 0,005$ ml oder 17,8 E proRatte und Tag
- 4) Humanes Insulin (rDNA) Ultartard, 100 IE/ml (3,5 mg/ml)) von Novo Nordisk, Dosis 100 µl Suspension oder 10 IE pro Ratte und Tag

[0095] Die Präparationen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt.

[0096] Hilfslösungen waren:

[0097] Aqua Sterilisata (Kabi Pharmacia AB Schweden); humane Albumin-Lösung, 200 mg/ml (Pharmacia & Upjohn); isotonische Natriumchloridlösung (0,9 % 1, pH 6,0, Kabi Pharmacia AB, Schweden); 1 M Natriumsulfat; 1 M und 6 M Salzsäure; 5 M Natriumhydroxid; isotonischer Tris-Puffer (10 mM pH 6,5, Natriumchlorid, 0,9 %) und hypotonischer Tris-Puffer (10 mM, pH 6,5).

[0098] Vor einer Verwendung wurden alle Lösungen durch ein 0,22 µm-Filter filtriert.

2.1. HERSTELLUNG EINES ERFINDUNGSGEMÄSSEN INSULIN-KOMPLEXES

[0099] Es wurden verschiedene molare Verhältnisse von Insulin:Hy in den folgenden Produktionsbeispielen verwendet: Ein molares Verhältnis von 12:1 für "Präparation I" und 15:1 für "Präparation II".

PRÄPARATION I

[0100] Eine definierte Insulinmenge (45 mg) wurde in eine sterilisierte Glasflasche gegeben. Hy (92 mg) wurde langsam in Natriumsulfat (6,5 ml, 1 M) in einem sterilen Glasbehälter gelöst. Das Mischen wurde unterbrochen, als die Lösung transparent wurde. Dann wurde 1 M Salzsäure zu dem Hy-Gemisch bis pH 1,5 bis 1,58 gegeben. Danach wurde das Insulin (45 mg) zu der Hy-Lösung gegeben und aufgelöst. Das Gemisch (pH 1,5) wurde leicht dispergiert und in Dialysebeutel transferiert.

PRÄPARATION II

[0101] Eine definierte Insulinmenge (45 mg) wurde in eine sterilisierte Glasflasche gegeben. Hy (78,9 mg) wurde langsam in Natriumsulfat (7,0 ml, 1 M) in einem sterilen Glasbehälter gelöst. Das Gemisch wurde transparent werden gelassen. Es wurde 1 M Salzsäure zugegeben, um einen pH von 1,6 zu erreichen. Dann wurde Insulin (45,1 mg) zusammen mit Salzsäure (0,2 ml, 1 M) und Natriumsulfat (0,8 ml, 1 M) unter geeignetem Auflösen des Insulins (pH 1,80) zu der Hy-Lösung gegeben. Das Gemisch wurde in Dialysebeutel transferiert.

2.2. HERSTELLUNG EINER INSULIN-REFERENZLÖSUNG

PRÄPARATION III

[0102] Insulin (40mg) wurde in einer isotonischen Natriumchloridlösung (8,0 ml) in einer sterilisierten Glasflasche gelöst. Der pH wurde auf 1,8 eingestellt. Die resultierende transparente Lösung wurde in Dialysebeutel verteilt.

2.3. DIALYSE-VERFAHREN FÜR EINEN ERFINDUNGSGEMÄSSEN INSULIN-HY-KOMPLEX

[0103] Für das Dialyseverfahren wurden sechs Dialysebeutel (Spectra Pore R MWCO 6-8000), jeweils mit einem Volumen von 4 ml, hergestellt. Die drei Präparationen (3×2) wurden in einen Becher, der eine Pufferlösung enthielt, gelegt. Das Dialyseverfahren wurde entsprechend Tabelle 1 unten durchgeführt.

[0104] Pufferlösungen: isotonischer Tris-Puffer (10 mM, pH 6,5, 0,9 % NaCl), im folgenden "isotonisch" genannt, und ein hypotonischer Tris-Puffer (10 mM, pH 6,5), im folgenden "hypotonisch" genannt, wurden jeweils zur Dialyse der Präparationen verwendet.

[0105] Das Dialysemedium wurde nach unterschiedlichen Zeitintervallen ausgetauscht. Der pH des Mediums außerhalb der Dialysebeutel wurde nach jedem Dialysezeitraum gemessen und die Präparationen wurden untersucht. Der pH überstieg zu keinem Zeitpunkt pH 6,5. Nach der Dialyse wurde der Inhalt der Dialysebeutel für jede Präparation gesammelt und in sterile Glasflaschen transferiert, die verschlossen wurden und bei +4°C

gelagert wurden. Diese Lösungen wurden als "Stammlösungen" der fertigen Insulin-Hy-Komplexe gemäß der Erfindung und "Insulin-Referenz" bezeichnet.

TABELLE 1. Dialyseplan für Insulin-Hy-Komplex

Lösungsänderung im Dialyseverfahren		
akkumulierte Dialysezeit (h)	Verhältnisanteil an zugesetztem Medium zur Dialyse	pH außerhalb der Dialyse-Schläuche
0	50 % isotonisch	6,5
	50 % hypotonisch	
15	100 % hypotonisch	3,79
16,5	50 % isotonisch	3,8
	50 % hypotonisch	
17	50 % isotonisch	6,0
	50 % hypotonisch	
18,5	50 % isotonisch	5,8
	50 % hypotonisch	
19,5	100 % isotonisch	5,7
46,5	100 % isotonisch	6,48
69,5	100 % isotonisch	6,5
88	100 % isotonisch	6,5
Ende	Ende	Ende

[0106] Die erste Stammlösung "Präparation I" hatte ein Volumen von 9,5 ml und einen pH von 6,4 und hatte das Aussehen einer transparenten Lösung/eines transparenten Gels mit einer gewissen Trübheit/einem gewissen Präzipitat. Die Aminosäureanalyse wurde durchgeführt und zeigt eine Konzentration von 5,16 mg/ml Insulin oder 134 E/ml. Präparation I wurde zur

- i) Rasterkraftmikroskopie ("Atomic Force Microscopy" = AFM) und
- ii) oralen Verabreichung an Ratten (Dosis 0,2 ml, 27 E)

verwendet.

[0107] Die zweite Stammlösung "Präparation II" hatte ein Volumen von 15,5 ml und einen pH von 6,4 und ein Aussehen einer transparenten Lösung mit einer gewissen Trübe/etwas Präzipitat. Es wurde eine Aminosäureanalyse durchgeführt und sie zeigte eine Konzentration von 2,44 mg/ml Insulin oder 63 E/ml. Präparation II wurde für:

- i) subkutane Injektionen in Ratten und
- ii) kinetische Studien bei 6 Ratten, subkutane Injektion,

verwendet.

[0108] Die dritte Stammlösung "Präparation III" hatte ein Volumen von 8,2 ml und einen pH von 6,4 und hatte ein Aussehen einer transparenten Lösung. Es wurde eine Aminosäureanalyse durchgeführt und diese zeigte eine Konzentration von 4,57 mg/ml Insulin oder 118,9 E/ml.

[0109] Präparation III wurde als Insulin-Referenzlösung verwendet.

BEISPIEL 3: Subkutane Verabreichung eines Insulin-Hy-Komplexes, Präparation II Die Zusammensetzung des Insulin-Hy-Komplexes war:

Präparation II	6,080 ml
humanes Albumin	0,27 %
Konzentration	2,44 mg/ml Insulin oder 63 E/ml

[0110] Die Zusammensetzung der Insulin-Referenz war:

Präparation III	4,0 ml
humanes Albumin	0,27 %
Konzentration:	4,57 mg/ml Insulin oder 118,9 E/ml

[0111] Ultratard 100 IE/ml Novo Nordisk, Dosis 100 µl oder 10 E.

[0112] Als Placebo wurde eine physiologische Natriumchlorid-Lösung (0,9 % NaCl, pH 6,0, Kabi Pharmacia AB, Schweden) verwendet.

[0113] Vier Gruppen aus 6 Ratten erhielten subkutane Injektionen mit dem Insulin-Hy-Komplex (0,05 ml × 3), die Insulin-Referenz-Lösung (0,05 ml × 3), Ultratard 100 IE/ml, Dosis 100µl oder 10 IE, bzw. Placebo.

[0114] Die Blutglucosespiegel wurden für 9 Stunden verfolgt. Die Blutglucosewerte waren für Ultratard 7,58 mMol/l, für die Insulinreferenzlösung 8,52 mMol/l, für den Insulin-Hy-Komplex 9,78 mMol/ml und für Placebo 20,36 mMol/ml.

[0115] Das kinetische Verhalten wurde für den Insulin-Hy-Komplex, 2,44 mg/ml, gegeben 0,05 ml × 3, und für die Insulinreferenzlösung, 4,56 mg/ml, gegeben 0,05 ml × 3, untersucht.

[0116] Die Blutglucosespiegel wurden nach subkutanen Injektionen verfolgt. Siehe [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#).

[0117] Diese Studien legen eine volle biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Insulin-Hy-Komplexes nahe.

BEISPIEL 4: Charakterisierung des Polymer-Hy-Insulin-Komplexes durch AFM (Rasterkraftmikroskopie)

[0118] Verdünnte Lösungen der Insulinreferenz, Hyaluronan (Hy) 150.000 Dalton und des Insulin-Hy-Komplexes, wurden auf Glimmer-Chips gegeben und durch "Tapping-AFM" untersucht. Unter den angewendeten Bedingungen wurde festgestellt, dass weder die Insulinreferenz noch Hy selbst zu deutlichen Bildern führte. Proben des Insulin-Hy-Komplexes, die wie oben beschrieben hergestellt worden waren, lieferten allerdings bei einer Insulinkonzentration von 134 E/ml (siehe [Fig. 4](#)) und bei einer Insulinkonzentration von 40,4 E/ml (siehe [Fig. 5](#)) deutlich sichtbare Punkte. Dies zeigt an, dass die Komplexe vorliegen, isoliert und identifiziert werden können und dass der Komplex unter den angewendeten Lagerungsbedingungen stabil ist.

BEISPIEL 5: Orale Verabreichung des Insulin-Hy-Komplexes

[0119] Die Aufgaben dieser Studien waren es, den Dosislevel und die Konzentration des Insulin-Hy-Komplexes in Streptozotocin-diabetischen Ratten zu bestimmen, indem eine messbare Absorption von oral verabreichtem Insulin in Form des erfindungsgemäßen Insulin-Hy-Komplexes gefunden wird. Der Blutglucosespiegel wird beobachtet, um eine mögliche Wirkung des Komplexes zu detektieren. Die Sprague Dawley-Ratten wurden durch einen Schlauch in den Magen mit 1 ml der Proben gefüttert.

5.1. INSULIN-PRÄPARATION ZUR ORALEN VERABREICHUNG

[0120] Zur oralen Verabreichung an Streptozotocin-diabetischen Ratten (Streptozotocin i.v.; 40 mg/kg Körpergewicht Ratten) wurden die folgenden Präparationen hergestellt:

Insulin-Hy-Komplex: 0,4, 3,2 und 28 E/ml. Gegebene orale Dosis 1 ml – 0,4, 3,2, bzw. 28 E
Referenz-Insulin-Lösung zur subkutanen Injektion, rekombinantes humanes Insulin, 3,86 mg/ml oder 33,4 E/ml. Gegebene subkutane Dosis 65 µl – 6,5 E.

[0121] Die Insulin-Hy-Komplexe wurden im wesentlichen, wie es oben beschrieben wurde (Beispiel 2), her-

gestellt und aseptisch in Injektionsphiolen transferiert. Bei den oralen Präparationen wurde humanes Albumin, 0,27 %, weggelassen.

[0122] Die Lösungen von 0,4 und 3,2 E/ml Insulin-Hy-Komplexen waren transparent. Die 28 E/ml-Lösung war trüb. Der Gehalt der Lösungen wurde unter Verwendung der Aminosäureanalyse untersucht.

[0123] Die Gemische waren in den Phiolen bei 8°C vor der oralen Verabreichung enthalten. Die Stabilität der Lösungen bei 8°C wurde als mindestens 2 Monate festgestellt (keine physikalischen oder biologischen Veränderungen der Präparationen wurden beobachtet).

[0124] Der Insulin-Hy-Komplex wurde mit 0,4, 3,2 und 28 E/ml Streptozotocin-diabetischen Ratten oral verabreicht (Streptozotocin i.v.; 40 mg/kg Körpergewicht).

5.2 REFERENZPRÄPARATION

[0125] Rekombinantes humanes Insulin, 3,93 mg/ml oder 102 E/ml (gegebene Dosis 65 µl = 6,6 E), 3,0 ml, wurde aseptisch hergestellt. Der pH wurde auf 5 bis 6 eingestellt und die Lösung war transparent.

ZUSAMMENSETZUNG:

Rekombinantes humanes Insulin 11,8 mg
humanes Albumin 50 µl

steriles Wasser 1600 µl
physiologisches Natriumchlorid 1360 µl

5.3 DOSISLEVEL DER ORALEN VERABREICHUNG/RATTEN BEI NORMALER ERNÄHRUNG

[0126] Der Blutglucosespiegel in Ratten, denen die Insulinreferenz oral verabreicht wurde, änderte sich nicht signifikant. Bei einem Dosislevel von 28 E/l reagierte eine von drei Ratten mit einer Senkung des Blutglucosespiegels (siehe [Fig. 6](#)). Der Dosislevel für den oral verabreichten Insulinkomplex wurde mit 28 E geschätzt. Diese Dosis führte zu einer Verringerung des Glucosespiegels für mehr als 3 Stunden (die Messungen wurden nach 3 h beendet).

5.4 DOSISLEVEL BEI SUBKUTANEN VERABREICHUNGEN

[0127] Insulinreferenz (4,56 mg/ml, 0,05 ml × 3): 17,8 E führte zu einer Abnahme des Blutglucosespiegels von 20,3 mMol/l auf 8,5 mMol/l für mehr als 8 Stunden

Ultratard 100 IE/ml (3,5 mg/ml) humanes Insulin (rDNA), Novo Nordisk, Dosis 100 µl Suspension oder 10 E:10 E führten zu einer Senkung des Blutglucosespiegels von 20,3 mMol/l auf 7,6 mMol/l für mehr als 8 h.

[0128] Insulin-Hy-Komplex (2,44 mg/ml 0,05 × 3): 9,5 E führte zu einer Senkung des Blutglucosespiegels von 20,3 mMol/l auf 9,7 mMol/l für mehr als 8 h.

5.5 RATTEN MIT HUNGERDIÄT

[0129] Ratten wurden während einer Nacht fasten gelassen, aber mit Wasser versorgt. Am Morgen wurde der Blutglucosespiegel bestimmt. 3 Ratten wurden bezüglich der oralen Absorption untersucht. Zwei von ihnen waren auf Hungerdiät und wurden mit 26,8 E bzw. 62 U oral behandelt. Eine von ihnen, die nicht auf Diät war, wurde oral mit 62 E behandelt. Zwei Referenzratten erhielten subkutane Injektionen. Alle Ratten reagierten mit einer Senkung des Blutglucosespiegels, wie in den [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) gezeigt ist.

[0130] Die Differenzen zwischen den Resultaten können durch das Aktivitätsmuster der Ratten erläutert werden, wobei die Tatsache berücksichtigt wird, dass der Insulin-Hy-Komplex den Ratten am Morgen, als der Magen mit Nahrung gefüllt war, verabreicht wurde.

[0131] Sechs Streptozotocin-diabetischen Ratten wurde der Insulin-Hy-Komplex in einer Dosis von 28 E oder mehr oral verabreicht. Vier von ihnen reagierten mit einer Senkung des Blutglucosespiegels. Zwei von ihnen reagierten nicht. Dies legt nahe, dass ein zufriedenstellender Grad der oralen Insulinabsorption bei Verabreichung in komplexierter Form gemäß der Erfindung erreicht wurde. Die Variationen in den Resultaten legen auch nahe, dass verschiedene Parameter, die die Tests beeinflussen, z.B. Aktivitätsperiode der diabetischen Ratten, Nahrungsmittelinhalt in ihrem Gastrointestinaltrakt usw., standardisiert werden sollten. Die Studien und Resultate, die bei Ratten erhalten werden, sind allerdings in hohem Maße relevant und können auf Menschen

übertragen werden, die an Diabetes Typ I und Typ II leiden.

BEISPIEL 6: Herstellung des erfindungsgemäßen Heparin-Hy-Komplexes

[0132] Heparin (16,1 mg) mit einem Molekulargewicht von 7.500 Dalton (Sigma) wurde in einer sterilisierten Glasflasche verteilt. Hyaluronan (30,0 mg) wurde langsam in Natriumsulfat (1,2 ml, 1 M) in einem sterilisierten Glasbehälter aufgelöst und gerührt, bis es transparent war. Salzsäure (0,85 ml, 1 M) wurde bis zu einem pH von 1,48 zugesetzt. Das Heparin wurde dann zu der Hyaluronan-Lösung gegeben und aufgelöst. Das Gemisch wurde in Dialysebeutel transferiert.

6.1 DIALYSE-VERFAHREN FÜR DEN ERFINDUNGSGEMÄSSEN HEPARIN-HY-KOMPLEX

[0133] Zwei Dialysebeutel (Spectra Pore R MWCO 6-8000), jeder mit einem Volumen von 4 ml, wurden hergestellt. Die Präparationen (1×2) wurden in einen Becher, der eine Pufferlösung enthielt, gegeben. Das Dialyseverfahren wurde nach dem unten in Tabelle 2 angegebenen Plan durchgeführt.

[0134] Pufferlösung: Ein hypotonischer Tris-Puffer (10 mM, pH 7,5), "hypotonisch" bezeichnet, wurde verwendet, um die Präparationen zu dialysieren.

TABELLE 2: Dialyseplan für Heparin-Hy-Komplex

Lösungsänderung im Dialyseverfahren		
akkumulierte Dialysezeit (h)	Verhältnisanteil an zugesetztem Medium zur Dialyse	pH außerhalb der Dialyse-Schläuche
7	100 % hypotonisch	3,79
61	100 % hypotonisch	6,7
85	100 hypotonisch	6,7
88	100 % isotonisch	6,7
Ende	Ende	Ende

[0135] Das Dialysemedium wurde nach verschiedenen Zeitintervallen gewechselt. Der pH des Mediums außerhalb der Dialysebeutel wurde nach jedem Dialysezeitraum gemessen und die Präparationen wurden untersucht. Der pH überstieg zu keinem Zeitpunkt pH 6,5. Nach der Dialyse wurde der Inhalt der Dialysebeutel gesammelt und in eine sterile Glasflasche transferiert, die verschlossen wurde und bei 4°C gelagert wurde.

[0136] Der dialysierte Heparin-Hy-Komplex hatte ein Volumen von 1,05 ml und einen pH von 7,2 und hatte das Aussehen einer transparenten Lösung. Die Präparation wurde zur Partikelgrößenbestimmung in einem Malvern ZetaSO-Gerät, Version PCS v1.29.1 verwendet. Die Größe pro Volumen wurde mit 1272 nm für diese Präparation bestimmt.

[0137] Das obige Beispiel zeigt die Anwendbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens auch auf Heparin.

BEISPIEL 7: Plasmid-Hy-Komplex

[0138] Dieses Beispiel erläutert den Mechanismus von Hy beim Erhalt einer dauerhaften kompakten Plasmid-DNA-Struktur. Die Genexpression des Plasmids ist für Chloramphenicol Acetyl Transferase, CAT, codiert. Lösung 1: Plasmid pRc/CMV-CAT, doppelsträngige, Ringschlussstruktur ~6400 Basenpaare, Molekulargewicht 4.250.000 Dalton, 200 µl, wurden in der Konzentration von 130 µg/ml verwendet.

Lösung 2: 10,4 mg Hy, Molekulargewicht 150.000 Dalton, wurden in 100 ml Wasser in einer Konzentration von 104 µg/ml gelöst.

Lösung 3: 2 M NaCl

Lösung 3.1: 0,15 M NaCl wurde verwendet

Lösung 4: 1 M NaOH

Lösung 5: 1 M HCl

[0139] Die angestrebte Endlösung; 500 µl wurden formuliert, so dass sie enthielten:

				<u>Konz.</u>	
		<u>500 µl in µg/l</u>		(µg/µl)	
pRc/CMV-	200 µl	0,13 µg/µl	26 µg	52	(0,052)
CAT					
Hy 150' Da	50 µl	0,1 µg/µl	5 µg	10	(0,010)
Σ 250 µl					

[0140] 250 µl werden unter einer pH-Verschiebung von pH 7,4/2,4 auf 500 µl verdünnt und durch 2 M NaCl präzipitiert.

DIALYSEVERFAHREN

[0141] Verwendet wurde ein Dialyseschlauch, Spectra/Pore Membrane MWCO 6-9.000 Record Nr. 132645.

[0142] Der Schlauch wurde in destilliertem Wasser für 1 h erweicht. Der Schlauch wurde dann geschnitten, und an einem Rand des Schlauchs wurde eine Dialyseklemme angepasst. Es wurden 500 µl in den Beutel gefüllt. Das Füllen erfolgte mit einer sterilen Mikropipette. Der andere Rand des Schlauchs wurde mit einer Dialyseklemme versehen und der resultierende Beutel wurde für 30 h dialysiert. Dann wurde die Integrität der Membran kontrolliert. Die dialysierte Lösung wurde mit einer sterilen Mikropipette abgesaugt und das Volumen wurde bestimmt (µl).

HERSTELLUNGSSCHRITTE

[0143] 200 µl der Plasmidlösung 1 (0,13 µg/ul), 26 µg, wurden bei 24°C aufgetaut. Es wurde positiv geladenes Hy hergestellt. Der pH von Lösung 2 wurde untersucht und mit pH 8,33 bestimmt. Der pH-Wert der Hy-Lösungen wurde untersucht, um ein positives ζ-Potential der Hy-Struktur zu erhalten; siehe Tabelle 3.

TABELLE 3: Azidifizierung von Hy

Lösung 2	1 M HCl	Hy in	HCl	pH _{Prim}	pH _{5min}	pH _{30 min}	pH _{tim}
in µl	in µl	µg/ml	in M				
2000	500	83,2	0,2	0,76	NB	0,68	0,81
2000	1000	69,3	0,33	5,19	2,28	2,93	2,9
2000	1500	59,4	0,42	0,37	NB	0,36	0,47
2000	2000	52	0,5	0,32	NB	0,26	0,39

* der pH-Wert weicht von den erwarteten Werten ab und wurde daher kontrolliert.

TABELLE 4: Kontrolle von abweichendem pH

Lösung 2 in µl	1 M HCl in µl	Hy in µg/ml	HCl in M	pH _{Prim}
2000	1000	69,3	0,33	0,85
1000	50	99,0	0,047	1,18
1000	25	101,4	0,024	1,69

[0144] In Beispiel 1 wurde festgestellt, dass sich das ζ-Potential von einer negativ in eine positiv geladene Struktur ändert (ζ-Potential von -69,3 auf +8,9 — +16,9 mV). Die Resultate waren nicht konsistent, d.h., wenn die Azidität zu einem niedrigeren pH < 1,75 geht, gibt das gemessene ζ-Potential eine erhöhte negativ geladene

ne Struktur von Hy (-4,4, -5,1, -17,9) an), siehe Tabelle 5.

TABELLE 5: Positive Ladung der Hy-Struktur

Lösung 2 in µl	1 M HCl in µl	Hy in µg/ml	HCl in M	pH	Zeta MasterS Version	
					KCPs	ζ-Potential in mV
2000	100	99	0,0476	1,3	2301	-8,5
4000	100	101	0,0244	1,75	2241	-4,4
2000	200	94,5	0,0909	1,08	2088	-5,1
2000	1000	69,3	0,33	0,53	1900	-17,5

[0145] Hy, das in stark sauren Lösungen vorliegt, sollte wegen des Zusammenbruchs der Hy-Struktur und eines Verlustes der Acetylgruppen vermieden werden. Die Zeit zur Bildung eines Komplexes zwischen Hy und unterschiedlichem Plasmid in stark saurer Lösung sollte daher auf etwa 30 min begrenzt sein.

LÖSUNG ZUR BILDUNG EINES KOMPLEXES:

[0146] Hy-Lösung, pH 1,75, wurde in den Studien zur Bildung eines Komplexes mit dem Plasmid verwendet. Die Proben wurden innerhalb von 30 min gegen 0,15 M NaCl dialysiert, um den pH zu erhöhen.

[0147] In dieser Studie wurden 101 µg/ml Hy, pH 1,75, zur Herstellung des komprimierten Komplexes ausgewählt, obgleich das gemessene ζ-Potential negativ war. In einer Lösung von 94,5 µg/ml Hy, pH 1,08, waren einige gemessene Werte positiv, allerdings wurden die Werte von 101 µg/ml Hy, pH 1,75, noch beigesteuert.

[0148] 101 µg/ml Hy, pH 1,75 ($0,11 \times 101,4 = 11,1$ µg Hy) oder 110 µl Hy 11,1 µg Hy wurden mit Lösung 1, Plasmid-Lösung (pRc/CMV-CAT, 0,13 µg/µl) oder 200 µl pRc/CMV-CAT vermischt, innerhalb von 30 min wurden 26,0 µg Plasmid zugesetzt.

[0149] Lösung 3, 2 M NaCl, 50 µl, Zugabe von destilliertem Wasser, 150 µl
End-Lösung Σ 510 µl

[0150] Die End-Lösung, 510 µl, wurde für 1 Stunde bei 25°C inkubiert und dann gegen Lösung 3.1, 0,15 M NaCl, dialysiert. Das Dialyseverfahren und die Membran wurden zweimal täglich, um 9 p.m. und 4 a.m., untersucht.

[0151] Tag 1 (6 h); Tag 2 (24 h); Tag 3 (24 h); Tag 4 (24 h); Tag 5 (13 h), Σ 91 h.

[0152] Der Hy-Plasmid-Komplex wurde so formuliert, dass er enthielt (510 µl):

pRc/CMV-CAT	26 µg/50,98 µg/ml/12,0 nM
Hy (150.000 Dalton)	11,1 µg/21,76 µg/ml/14,5 nM

PHYSIKALISCH-CHEMISCHE BEURTEILUNG

Lösung 1, Plasmid pRc/CMV in 0,15 M NaCl (1+1) 130/2 µg/ml 30,57/2 pM)

Lösung 2, Hy 150.000 Dalton 104 µg/ml(69,3 pM) in destilliertem Wasser

[0153] Die fertige Lösung des Komplexes – (pRc/CMV-CAT+Hy) 50,98+21,76 µg/ml in 0,15 m NaCl

[0154] Diese wurden durch dynamische Lichtstreuung, Malvern Instruments England Zeta Master Version PCS: v. 1,26 untersucht. Das untersuchte Volumen war \cong 500 µl.

TABELLE 6: Volumendurchmesser (Durchmesser in nm) des Hy-Plasmid-Komplexes im Vergleich zu dem Plasmid pRc/CMV und Hy 150.000 Dalton

Verwendete Lösung	Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	nM	Volumen- durchmesser in nm
Hy (150.000 Dalton) in Wasser	104	69,3	16,4 ¹⁾
pRc/CMV-CAT in 0,15 M NaCl (1+1)	65	15,25	87,1 $X_{n=6}$
Komplex-(pRc/CMV-CAT-Hy) 0,15 M NaCl	in $50,98 \pm 21,76$	12,0+145	7,5 $X_{n=6}$

¹⁾ 16.4 zu geringe Intensität des Lasers für eine Messung.

[0155] Das Plasmid pRc/CMV-CAT wurde von 87,1 nm auf 7,5 nm komprimiert.

[0156] Die Verfahren involvieren Azidifizierung, Bildung eines Komplexes, Salz- und Dialysebehandlung bei einem Molverhältnis von Plasmid/Hy 150.000 Dalton von 0,83–0,85:1.

[0157] Die dynamische Lichtstreuung identifiziert den Durchmesser des Komplexes pRc/CMV-CAT-Hy (7,5 nm).

[0158] Positive Ladung der Hy-Struktur ($\text{Hy}_{\text{pH } 8,8}$ ζ -Potential – 51 bis –69 mV \rightarrow $\text{Hy}_{\text{pH } 1,75}$ $1,6 \pm 2,3$ mV, pH-Verschiebung (pH < 2 \rightarrow pH 6) und Änderung der Ionenkonzentration von 2 M NaCl in 0,75 M bildet den Komplex.

[0159] Es wird gezeigt, dass der komprimierte Zustand des Komplexes stabil ist, wenn die Bestimmungen nach 3-monatiger Lagerung bei 5–8°C durchgeführt wurden.

BEISPIEL 8: Herstellung des erfindungsgemäßen Plasmid-Hy-Komplexes

[0160] Ein Plasmid-Hy-Komplex wurde zur Verwendung bei Transfektionsstudien in Zellen und für eine physikalisch chemische Charakterisierung nach drei (3) Monaten Lagerung hergestellt.

[0161] Die Herstellung erfolgt mit einem neu hergestellten Plasmid (Konz. 0,67 $\mu\text{g/ml}$) bei den folgenden Änderungen: ein neues Molverhältnis Plasmid/Hy von 0,1128 (Molverhältnis Plasmid / Hy von 0,085), Chargengröße 1020 μl (520 μl), pH 1,65 und 1,8 (pH 1,75 und 1,08).

[0162] Die Komplexbildung basiert auf einer positiven Ladung der Hyaluronan (Hy)-Struktur ($\text{HY}_{\text{Dest. W. } \zeta}$ –61,5 \pm 8,5 mV/Hy $\zeta_{\text{pH } 1,65}$ –2,4 \pm 2,2 mV, $\text{HY}_{\text{Dest. W. } \zeta}$ –61,5 \pm 8,5 mV/Hy $\zeta_{\text{pH } 1,80}$ –4,0mV \pm 1,9 mV). Der Komplex wird durch eine pH-Verschiebung (pH \leq 2 / \cong 6) und eine Ionenkonzentrationsänderung (NaCl 2 M / 0,075 M) gebildet. Der Plasmid-Hy-Komplex wird nach 3-monatiger Lagerung bei 5–8°C bestimmt und durch eine Plasmidkompression des Plasmids von 356 (98,9–507) nm bei einer pH-Verschiebung 1,65 \geq 6,0 nach 84,41 nm bei pH-Verschiebung 1,80 \geq 6,0 nach 69,0 nm, identifiziert durch dynamische Lichtstreuung (siehe Tabelle 7), charakterisiert.

TABELLE 7: Lösungen des Plasmid-Hy-Komplexes, hergestellt für Transfektionsstudien und Partikelgrößenbestimmung derselben

Komplex/ Plasmid/ Hy	Plasmid-Komplex, gebildet durch pH-Verschiebung $1,65 \geq 6,0$ $Hy_{\zeta pH 1,65} -2,4 \pm 2,2$ mV		Plasmid-Komplex, gebildet durch pH-Verschiebung $1,8 \geq 6,0$ $Hy_{\zeta pH 1,80} -4,0$ mV $\pm 1,9$ mV		reines Plasmid bei pH 6,0 bei			Hy 104 $\mu\text{g/ml}$ in dest. Wasser $\zeta -61,5 \pm 8,5$ mV	
	1020 μl in μg	in $\mu\text{g/ml}$	in nM	1020 μl in μg	in $\mu\text{g/ml}$	in nM	1020 μl in μg	in $\mu\text{g/ml}$	in nM
pRc/CMV- CAT+	72 +	70,58 +	16,6 +	72 +	70,58 +	16,6 +	--	--	--
Hy	22,52	22,08	147,2	22,66	22,2	148,1	--	105	700
pRc/CMV- CAT	--	--	--	--	--	--	72	70,6	16,6
NaCl	$2,23 \cdot 10^3$	$4,38 \cdot 10^3$	$75 \cdot 10^6$	$2,23 \cdot 10^3$	$4,38 \cdot 10^3$	$75 \cdot 10^6$	$2,23 \cdot 10^3$	$4,38 \cdot 10^3$	$75 \cdot 10^6$
Partikel- größen- Volumen- durchmesser in mm	84,41			69,0			98,9-507		$98,9 \pm 43,1$

[0163] Es wurde kein optimales Molverhältnis für die Plasmidkompression gefunden.

[0164] Nach 3-monatiger Lagerung bei 5 bis 8°C resultierte das Molverhältnis Plasmid/Hy 0,1128 in einer Kompression von 98,9–507 nm zu 69,0 bei pH 1,8 und zu 84,41 nm bei pH 1,65. Für ein Molverhältnis Plasmid / Hy 0,085 wurde das Plasmid von 87 nm auf 7,5 nm bei pH 1,75 komprimiert. Es gab allerdings Hinweise, dass das neue Plasmid unrein war, was erklärt, dass eine Größenverteilung mit einem Peak bei 98,9 und einem Peak bei 507 nm festgestellt wurde.

BEISPIEL 9: Herstellung des erfindungsgemäßen rhGH-Hy-Komplexes

[0165] Dieses Beispiel erläutert die Kompression von rhGH. Durch Änderung des pHs zu einer stark sauren Lösung (pH 1,5) wird Hy geladen von einem gewundenen Zylinder zu einer geraden Linie gedehnt. Bei diesem pH ist rhGH leicht löslich. Die Größe der rhGH-Partikel wird durch die Geschwindigkeit der pH-Veränderung und der Änderung der Ionenkonzentration von 2 M zu 0,15 M NaCl gedämpft. Das verwendete pH-Intervall ist 7 – 1,5 – 5,0 (pI) bei einem konstanten Verhältnis von rhGH:Hy. Hy stabilisiert die Dispersion bei der Änderung ihrer Struktur zu der gewundenen Struktur bei etwa pH 6–7.

[0166] Die Präparationen wurden mit HI-HPLC analysiert. Die Partikelgröße des komprimierten und des nicht-komprimierten rhGH wurde nach 30 Tagen Lagerung bei 5 bis 8°C durch Lichtstreuung, Z-Master, bestimmt. Der Durchmesser der gemessenen Partikel wird als Mittelwert von 6 Messungen angegeben.

[0167] 20,78 mg Hy mit einer Molmasse von 150 KDa wurden in 900 µl destilliertem Wasser gelöst und für mehr als 1 Stunde reagieren gelassen. Der pH der Hy-Lösung von 9,2 wurde mit 50 µl Wasser und 50 µl 1 M HCl auf pH 1,51 eingestellt.

[0168] 30,65 mg lyophilisiertes rhGH wurden in der Hy-Lösung gelöst. Das Molverhältnis rhGH:Hy ist 10:1. 1 M HCl wurde in Portionen von 10 µl zugesetzt, um eine klare Lösung zu erhalten und den pH in der Lösung von 1,7 auf 1,48 zu ändern, wobei die Lösung bei diesem pH klar war. Das Endvolumen war 1000 µl. Die Lösungen wurden in 2 Teile aufgeteilt und in 2 Beutel transferiert, die als Dialyseschlauch MWCO 6–8000, Spectra Pore R. erweicht in Tris-Puffer, 10 mM, pH 7,8, für 24 h präpariert worden waren.

9.1 NICHT KOMPRIMIERTES rhGH

[0169] 30,7 mg rhGH wurden in 990 µl destilliertem Wasser, pH 7,4, gelöst, das Endvolumen der Lösung, pH 7,0, wurde auf 1000 µl eingestellt. Die Lösung wurde in 2 Teile aufgeteilt und in 2 Beutel (Beutel 1, Beutel 2), die in Tris-Puffer, 10 mM, pH 7,8, für 24 Stunden erweicht, transferiert wurden.

9.2 DIALYSEVERFAHREN

[0170] Die Schläuche wurden in Tris-Puffer, 10 mM, pH 7,9, dialysiert. Die Lösung mit einem Volumen von 600 ml wurde dreimal gewechselt. Siehe Tabelle 8.

TABELLE 8: Dialyseverfahren MWCO 6-8000, Spectra Pore R

Experi- ment #	pH der Dialyse- Lösung	komprimiertes rhGH				nicht-komprimiertes rhGH			
		4 ₁ (Beutel 1)		4 ₁ (Beutel 2)		4 ₁ (Beutel 1)		4 ₁ (Beutel 2)	
		pH	Okular/ Volumen in µl	pH	Okular/ Volumen in µl	pH	Okular/ Volumen in µl	pH	Okular/ Volumen in µl
0	7,9	1,5	klar/ 500	1,5	klar/ 500	1,5	klar/ 500	1,5	klar/ 500
1	7,4	N.B.	Präzipitat	N.B.	Präzipitat	N.B.	klar	N.B.	klar
19	7,4	N.B.	Kuchen in Lö- sung	N.B.	Partikel in Lösung	N.B.	klar	N.B.	klar
42	7,8	7,4	Kuchen in Lö- sung 300	7,4	Partikel in Lö- sung 750	7,6	klar/ 200	7,6	klar/ 200

[0171] Das oben hergestellte komprimierte rhGH und das nicht-komprimierte rhGH wurden für einen analytischen Assay verwendet (in situ bestimmte biologische Aktivität und zur Partikelgrößenbestimmung). Die zur Partikelgrößenbestimmung des komprimierten rhGH verwendeten Konzentrationen waren 7,6 mg/ml und 9,3 mg/ml und für nicht-komprimiertes rhGH war die Konzentration 15 mg/ml. Die Messungen, Mittelwerte aus 6 Messungen, erfolgten bei 25°C.

[0172] HI-HPLC des komprimierten und des nicht-komprimierten rhGH. Der HI-HPLC-Assay wird üblicherweise verwendet, um die biologische Aktivität von rhGH zu bestimmen.

TABELLE 9: Analyse von rhGH

Präparation	komprimiertes rhGH		nicht-komprimiertes rhGH
	4 ₁ Beutel 1	4 ₁ Beutel 2	4 (Beutel 1 + 2)
Experiment #			
Quantitativer Assay, mg/ml	7,6	9,3	15,2
Monomer in %	97,3	93,8	98,3
LMWG, %	0,8	0,7	0,7
geschnittene Formen in %	1,9	5,5	0,9
Retentionszeit, min	gut	gut	Gut
pH im Dialyseschlauch	7,4	7,4	7,6
Aussehen im Dialyse- schlauch	Kuchen	Partikel	Klar

[0173] Die Werte, die für komprimiertes rhGH, 4₁ Beutel 1 und 4₁ Beutel 2, Tabelle 9, erhalten wurden, liegen innerhalb der Grenzen für eine bestätigte (gute) biologische Aktivität. Die Werte liegen auch in derselben Größenordnung wie für das unbehandelte Peptid, nicht-komprimiertes rhGH. Dies legt nahe, dass das Verfahren zum Komprimieren von rhGH die biologische Aktivität von rhGH nicht ändert, wie es durch das HI-HPLC-Ver-

fahren bestimmt wird.

[0174] Partikelgrößenbestimmung von komprimiertem und nicht-komprimiertem rhGH wurde durch Lichtstreuung, Z-Master, durchgeführt.

TABELLE 10: Partikelgrößenbestimmung

Präparation	Partikelgröße von komprimiertem rhGH, verdünnt 1:10, Volumendurchmesser in nm		Partikelgröße von nicht-komprimiertem rhGH, verdünnt 1:10, Volumendurchmesser in nm
	4 ₁ Beutel 1	4 ₁ Beutel 2	4 Beutel 1+2
Experiment #			
kolloidale Lösung	23,1	23,3	75
Kuchen im Gleichgewicht mit gelöstem Stoff	N/A	114	N/A

[0175] Die Werte, die für den Volumendurchmesser für nicht-komprimiertes rhGH und komprimiertes rhGH erhalten werden, zeigen, dass der Durchmesser für komprimiertes rhGH von 75 nm in 23 nm geändert wird und dass ein Kuchen oder Partikel erhalten wird/werden. Dies legt nahe, dass das Verfahren zum Komprimieren von rhGH die Partikelgröße von rhGH deutlich reduziert.

BEISPIEL 10: Biologische Aktivität des rhGH-Hy-Komplexes und von nicht-behandeltem rhGH

[0176] 14,9 mg Hy mit einer molaren Masse von 150 KDa wurden in 1200 µl 1 M Na₂SO₄ gelöst und für mehr als 1 Stunde umsetzen gelassen.

[0177] Der pH der Hy-Lösung, pH 7,6, wurde mit 100 µl Wasser und 330 µl 1 M HCl auf pH 1,51 unter Erhalt einer klaren Lösung eingestellt. HCl wurde langsam zugegeben und beim Passieren von pH 3,8 wurde ein Präzipitat beobachtet.

[0178] 22 mg lyophilisiertes rhGH wurden in der Hy-Lösung aufgelöst. Das Molverhältnis rhGH:Hy ist 10:1. 1 M HCl wurde in Portionen unter Erhalt einer klaren Lösung zugegeben. Der Ausgangs-pH war 2,77. 40 µl 1 M HCl wurden zugesetzt, um den pH in der Lösung von 2,77 auf 1,52 zu ändern.

[0179] Die Lösung war nicht vollständig klar. Beim Transferieren in den Dialysebeutel wurde ein Verlust der Lösung erhalten. Das Endvolumen war 1240 µl. Die Lösungen wurden in zwei Teile aufgeteilt und in zwei Beutel transferiert, welche als Dialyseschlauch aus MWCO 6-8000, Spectra Pore R., erweicht in 10 mM Tris-Puffer, pH 7,8, präpariert worden waren.

10.1 NICHT-KOMPRIMIERTES rhGH

[0180] 22 mg rhGH wurden in 990 µl destilliertem Wasser, pH 7,4, gelöst. Das Endvolumen der Lösung wurde auf 1240 µl eingestellt. Die Lösung wurde in 2 Teile aufgeteilt und in 2 Beutel (Beutel 1, Beutel 2), die in Tris-Puffer, 10 mM, pH 7,8, erweicht worden waren, transferiert.

10.2 DIALYSEVERFAHREN

[0181] Die Schläuche wurden in Tris-Puffer, 10 mM, pH 7,9, dialysiert. Die Lösung, Volumen 600 ml, wurde dreimal ausgetauscht. Siehe Tabelle 11.

TABELLE 11. Dialyseverfahren MWCO 6-8000, Spectra Pore R

Experi- ment #	pH der Dialyse- Lösung	komprimiertes rhGH				nicht-komprimiertes rhGH			
		5 ₁ (Beutel 1)		5 ₁ (Beutel 2)		5 (Beutel 1)		5 (Beutel 2)	
		pH	Okular/ Volumen in µl	pH	Okular/ Volumen in µl	pH	Okular/ Volumen in µl	pH	Okular/ Volumen in µl
0	7,9	1,5	klar/ 620	1,5	klar / 620	1,5	klar / 620	1,5	klar/ 620
19	7,4	N.B.	Präzipitat	N.B.	Präzipitat	N.B.	klar	N.B.	klar
24	7,5	N.B.	trüb	N.B.	Präzipitat	N.B.	klar	N.B.	klar
42	7,6	7,3	fast klar/ 420	7,3	fast klar/ 1100	7,6	klar / 550	7,4	klar / 450

[0182] Das oben hergestellte komprimierte rhGH und nicht-komprimierte rhGH werden für einen biologischen Assay (in situ bestimmte biologische Aktivität), in vivo-biologische Aktivität und zur Partikelgrößenbestimmung verwendet. Die zur Partikelgrößenbestimmung eingesetzten Konzentrationen für komprimiertes rhGH waren 5,3 mg und 1,5 mg und für nicht-komprimiertes rhGH war die Konzentration 5–10 mg. Die Größe wird als Mittelwert von 10 Messungen angegeben und die Größenbestimmung erfolgte bei 18, 25 und 30°C.

10.3 ANALYSE von rhGH

[0183] Die HI-HPLC-Analyse von komprimiertem und nicht-komprimiertem rhGH wurde durchgeführt. Der HI-HPLC-Assay wird üblicherweise verwendet, um die biologische Aktivität von rhGH zu bestimmen.

TABELLE 12: Analyse von rhGH

Präparation	komprimiertes rhGH			nicht-komprimiertes rhGH	
	4 ₁ (Beutel 1)	4 ₁ (Beutel 2)	5 ₁ (Beutel 1 + 2)	4 (Beutel 1+2)	5 (Beutel 1+2)
Quantitativer Assay, mg/ml	7,6	9,3	5,3	15,2	14,2
Monomer, %	97,3	93,8	100	98,3	98
LMWG, %	0,8	0,7	<0,3	0,7	0,6
geschnittene Formen, %	1,9	5,5	<0,2	0,9	0,2
Retentionszeit, min	akzeptiert	akzeptiert	akzeptiert	akzeptiert	akzeptiert
pH im Dialyse- schlauch	7,4	7,4	7,3	7,6	7,4
Aussehen im Dialy- seschlauch	Kuchen	Partikel	fast klar	klar	Klar
Volumen der klaren Lösung in µl	300	750	1520	400	1000

[0184] Die Werte, die für komprimiertes rhGH, 4₁ (Beutel 1), 4₁ (Beutel 2) und 5₁ (Beutel 1+2), Tabelle 12, erhalten wurden, liegen innerhalb von Grenzen für eine akzeptierte biologische Aktivität. Die Werte sind auch in derselben Größenordnung wie für das unbehandelte Peptid, nicht-komprimiertes rhGH (4 und 5, Beutel 1 und 2); dies legt nahe, dass das Verfahren zum Komprimieren von rhGH die biologische Aktivität von rhGH, wie sie durch das HI-HPLC-Verfahren bestimmt wird, nicht verändert.

[0185] Der hydrodynamische Radius und das Molekulargewicht von nativem rhGH und dem rhGH-Hy-Komplex wurde mit DynaPro 801 bestimmt; siehe Tabelle 13.

TABELLE 13: Eigenschaften von komprimiertem rhGH

kompakte rhGH-Struktur				
Analysierte Konzentration in mg/ml	1,5		5,3	
Temperatur bei Größenmessungen °C	18	25	25	30
Molare Masse der Polymeren in kDa	165	142	716	1125
Hydrodynamische Radii der Polymere in nm	5,3	4,9	9,4	11,4
Anzahl der komprimierten Einheiten rhGH in den Polymeren	7	6	32	50
Geschätzte hydrodynamische Radii einer komprimierten rhGH-Einheit im Polymer in nm	0,70	0,77	0,22	0,29

[0186] Der Radius von komprimiertem rhGH ist kleiner als von nicht-komprimiertem rhGH. Das heißt, es wird geschätzt, dass bei einer Konzentration von 5,3 mg/ml eine komprimierte Einheit von rhGH einen hydrodynamischen Radius von 0,22–0,29 nm und bei 1,5 mg/ml von 0,70–0,77 nm hat. Es wird geschätzt, dass nicht komprimiertes rhGH bei einer Konzentration von 14,5 mg/ml einen hydrodynamischen Radius von 2,4 nm hat. Es wurde festgestellt, dass die Zahl der Einheiten an komprimiertem rhGH, die in einem Polymer enthalten ist, von der Konzentration der Lösung abhängt. Bei Verdünnung wurden keine Agglomerate der Polymeren gefunden.

10.4 Biologische Aktivität

[0187] Die biologische Aktivität von komprimiertem rhGH und nicht komprimiertem rhGH wurde nach parenteraler Injektion in Ratten mit herausgeschnittener Hypophyse (Hx) beurteilt. Die Dosisantwort 0,04 IE/ml und 0,16 IE/ml komprimierten rhGH und nicht-komprimiertem rhGH wurde in Gruppen von 10 Hx-Ratten beurteilt. Eine Gruppe wurde mit einer Placebolösung (Rinderalbumin, 12,5 ml (200 mg/ml) wurde mit isotonischer NaCl auf 1000 ml verdünnt. Diese Lösung, die 1,25% Albumin enthielt, wurde als Placebo verwendet und auch um die Lösungen von komprimiertem rhGH und nicht-komprimiertem rhGH auf Dosen für Tierversuche zu verdünnen, verwendet) behandelt.

[0188] Lösungen aus den Dialyseschläuchen, die komprimiertes rhGH, 5,3 mg/ml, und nicht-komprimiertes rhGH, 14,2 mg/ml, enthielten, wurden aseptisch mit destilliertem Wasser verdünnt und analysiert; komprimiertes rhGH, 0,23 mg/ml oder 0,69 IE/ml, und nicht-komprimiertes rhGH 0,48 mg/ml oder 1,45 IE/ml.

[0189] Injektionslösungen von komprimiertem und nicht-komprimiertem rhGH wurden durch Verdünnung mit dem Verdünnungsmittel 1,25% Albuminlösung zu der gewünschten Stärke, niedrige Dosis 0,04 IE/ml und hohe Dosis 0,16 IE/ml, hergestellt. Das Verdünnungsmittel 1,25% Albuminlösung wurde als Placebo verwendet.

[0190] [Fig. 9](#) veranschaulicht die Gewichtszunahme in Prozent verabreichte Dosis (Behandlung mit rhGH in IE/kg Körpergewicht für verschiedene Dosen). Die Dosisantwort für komprimiertes und nicht-komprimiertes rhGH in Prozent Gewichtszunahme nach subkutaner Injektion ist für Hx-Ratten in Tabelle 14 gezeigt.

TABELLE 14. Gewichtszunahme in %, angegeben als Mittelwert von 10 Hx-Ratten ($X_{n=10in}$ %)

Preparation	Komprimiertes rhGH		Nicht-komprimiertes rhGH		Placebo
Dosis in IE/kg Körpergewicht	0,32	1,22	0,32	1,24	0
% Gewichtszunahme	8	10	8	12	-2

[0191] Eine Dosisantwort in % Gewichtszunahme wird für komprimiertes und nicht-komprimiertes rhGH in [Fig. 9](#) und Tabelle 14 bewiesen. Für komprimiertes rhGH wurde eine 8%ige Gewichtszunahme für die 0,32 IE/kg-Dosis und eine 10 %ige Gewichtszunahme für die 1,22 IE/kg-Dosis aufgezeichnet. Für nicht-komprimiertes rhGH wurde eine 8%ige Gewichtszunahme für 0,32 IE/kg und eine 12 %-ige Gewichtszunahme für 1,24 IE/kg aufgezeichnet. Für Placebo wurde keine Gewichtszunahme erhalten.

[0192] Die Dosisantwort, die für komprimiertes rhGH in Hx-Ratten erhalten wurde, legt nahe, dass nach Komprimierung der rhGH-Struktur eine vollständige biologische Wirkung erhalten werden kann.

Patentansprüche

1. Komplex zwischen einem Biomolekül und Hyaluronsäure, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Biomolekül reversibel auf weniger als etwa 10% seiner ursprünglichen Größe komprimiert ist und dass der Komplex durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Komponenten in einer Säureelektrolytlösung gebildet wird.

2. Komplex nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von weniger als etwa 400 kDa, vorzugsweise im Intervall von 60 bis 360 kDa, ist.

3. Komplex nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa ist.

4. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül ein Peptid ist.

5. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül ein Protein ist.

6. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül ein Glycoprotein ist.

7. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül ein Polynucleotid ist.

8. Komplex nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid unter den folgenden Substanzgruppen ausgewählt ist: Hormone, Neuropeptide, Signalpeptide, Peptidantibiotika, Peptidantigene, Antikörper und natürlich vorkommende oder synthetische Aminosäurepolymere.

9. Komplex nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid unter den folgenden Substanzen ausgewählt ist: Insulin, Wachstumshormon, humanes Wachstumshormon, Glucagon, Corticotropin, Oxytocin, Bradykinin, Thyreotropinreleasing-Faktor und Thyreotropin, Enkephaline und Peptidantibiotika.

10. Komplex nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Polynucleotid unter den folgenden ausgewählt ist: Plasmide, DNA, RNA, cDNA, mRNA, rekombinante DNA, rekombinante RNA und Kombinationen davon.

11. Verfahren zur Herstellung eines Komplexes aus einem Biomolekül und Hyaluronsäure, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren die folgenden Stufen umfasst:

- a) Lösen von Hyaluronsäure in einer Lösung, die eine Säure und eine Elektrolytlösung enthält,
- b) Auflösen des Biomoleküls in der Lösung mit gelöster Hyaluronsäure und Säure und
- c) Dialysieren der in b) gebildeten Lösung bei etwa neutralem pH.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Säure in Stufe a) und b) unter Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure und Essigsäure ausgewählt ist und der pH im Bereich von 1,0 bis 3,0 liegt.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrolytlösung von Stufe a) Kationen, die unter NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} ausgewählt sind, und Anionen wie zum Beispiel Sulfat, Nitrat, Chlorid, Hydroxid und Acetat enthält.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der pH in Stufe c) im Intervall von 5,5 bis 7,5 liegt.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Hyaluronsäure Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von weniger als etwa 400 kDa, vorzugsweise im Intervall von 60 bis 360 kDa, ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Hyaluronsäure Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa ist.

17. Verwendung von Insulin zur Herstellung eines Komplexes aus reversibel komprimiertem Insulin und Hyaluronsäure, wobei das Insulin auf weniger als etwa 10% seiner ursprünglichen Größe reversibel komprimiert ist, zur Verwendung als Medikament zur Behandlung von Diabetes.

18. Verwendung von Insulin zur Herstellung eines Komplexes aus reversibel komprimiertem Insulin und Hyaluronsäure, wobei das Insulin reversibel auf weniger als etwa 10% seiner ursprünglichen Größe komprimiert ist, zur Verwendung als oral verabreichtes Medikament zur Behandlung von Diabetes.

19. Verwendung von Insulin zur Herstellung eines Komplexes aus reversibel komprimiertem Insulin und Hyaluronsäure, wobei das Insulin auf weniger als etwa 10% seiner ursprünglichen Größe reversibel komprimiert ist, zur Verwendung als parenteral verabreichtes Medikament zur Behandlung von Diabetes.

20. Verwendung von Wachstumshormon zur Herstellung eines Komplexes aus reversibel komprimiertem Wachstumshormon und Hyaluronsäure, wobei das Wachstumshormon auf weniger als etwa 10% seiner ursprünglichen Größe reversibel komprimiert ist, zur Verwendung als Medikament für die Behandlung von Wachstumshormondefizienzen.

21. Verwendung von Wachstumshormon für die Herstellung eines Komplexes aus reversibel komprimiertem Wachstumshormon und Hyaluronsäure, wobei das Wachstumshormon reversibel auf weniger als etwa 10% seiner ursprünglichen Größe komprimiert ist, zur Verwendung als Medikament zur Prävention von Transplantatabstoßungen.

22. Verwendung von Heparin oder bioaktiven Derivaten davon zur Herstellung eines Komplexes aus reversibel komprimiertem Heparin oder Derivaten davon und Hyaluronsäure, wobei das Heparin oder bioaktive Derivate davon reversibel auf weniger als etwa 10% seiner ursprünglichen Größe/ihrer ursprünglichen Größe komprimiert ist/sind, zur Verwendung als Medikament.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1 Hydrodynamischer Radius

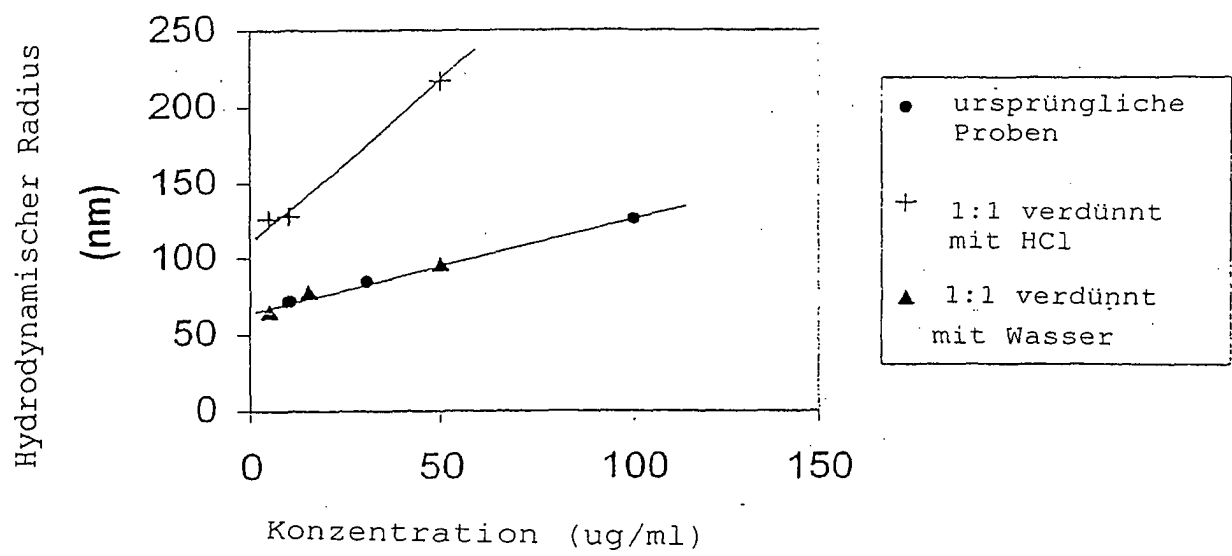


Fig. 2 Insulin-Hy-Komplex

(s.c. 2,44 mg/ml, Dosis 9,5 E, 0,050 ml x 3)

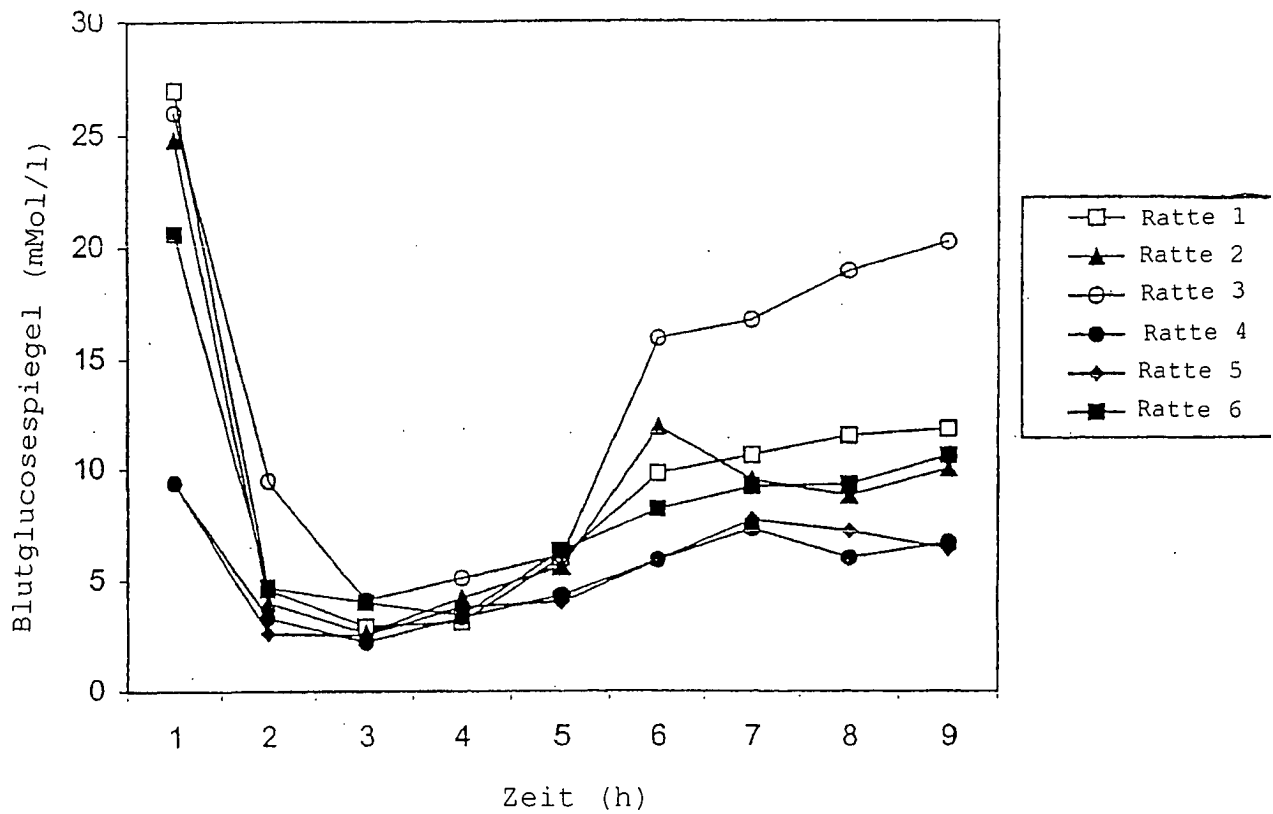
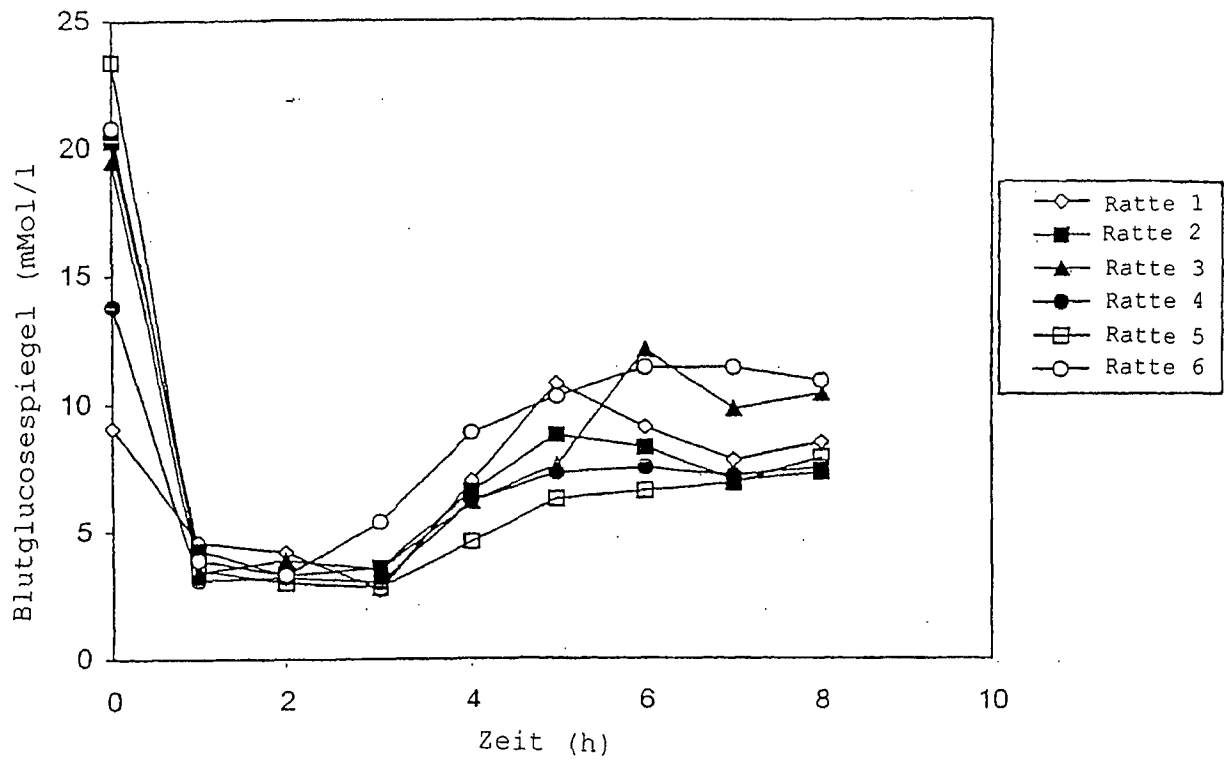


Fig. 3 Insulinreferenz
 (s.c. 4,56 mg/ml, Dosis 17,8 E 3 x 50 µl)



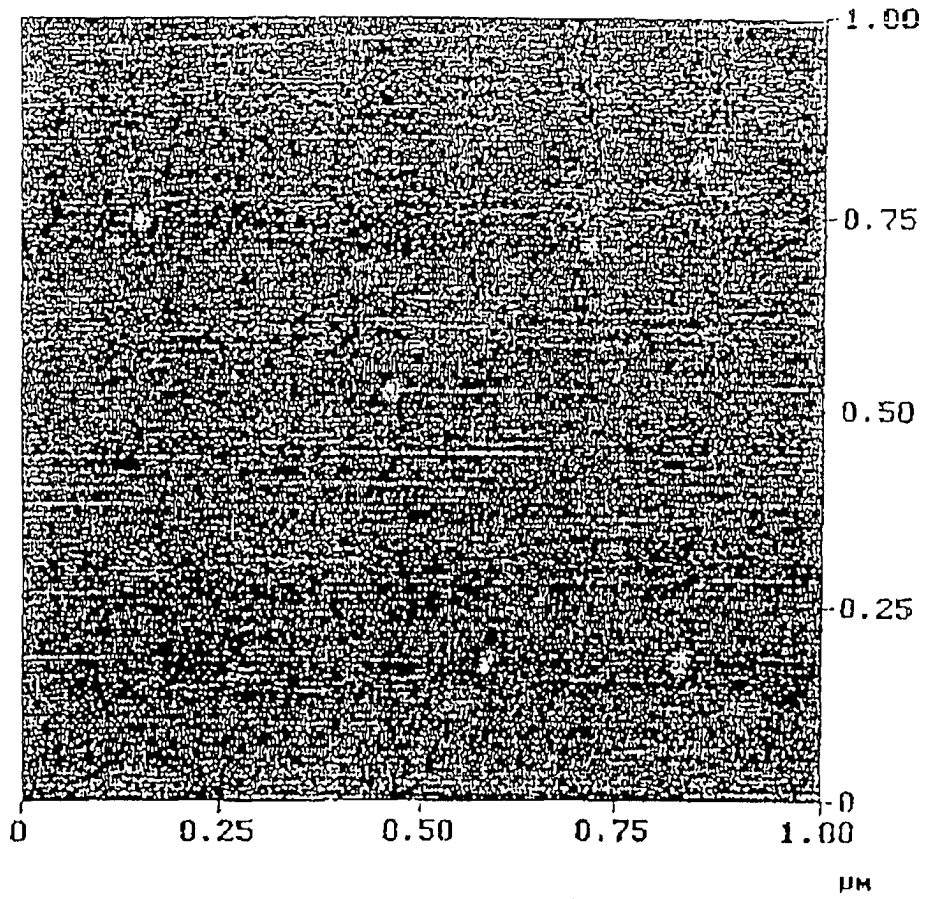


Fig. 4

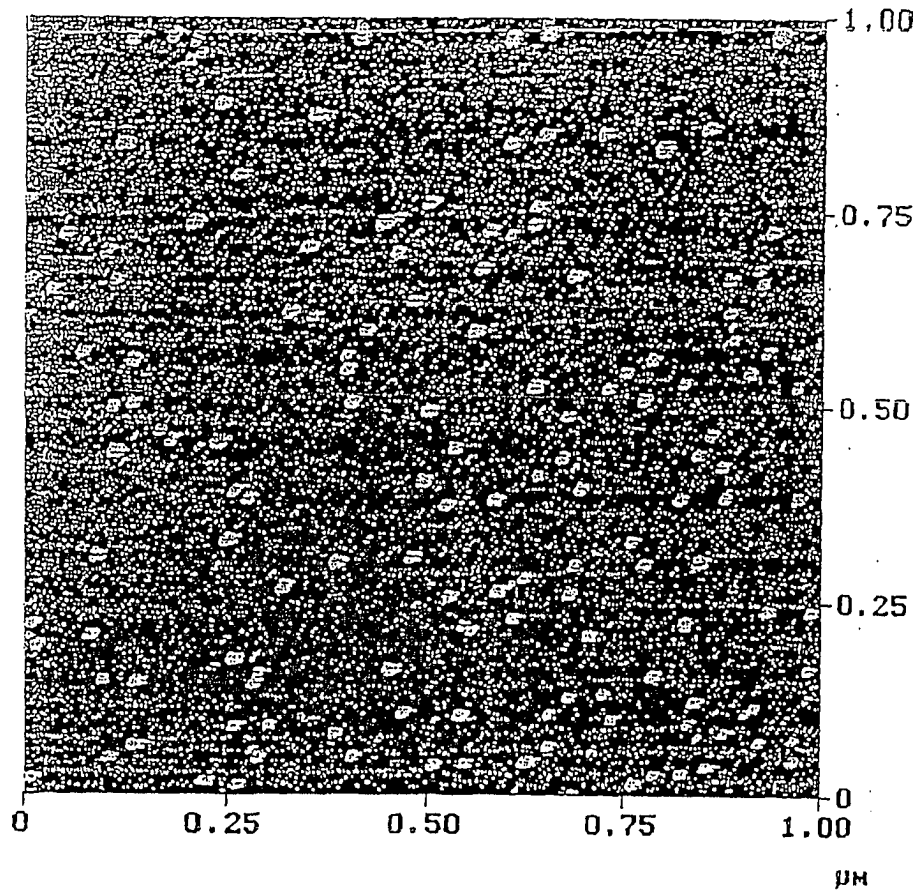


Fig. 5

Fig. 6 Orale Verabreichung von komprimiertem Insulin
(1 ml, 28 E/ml)

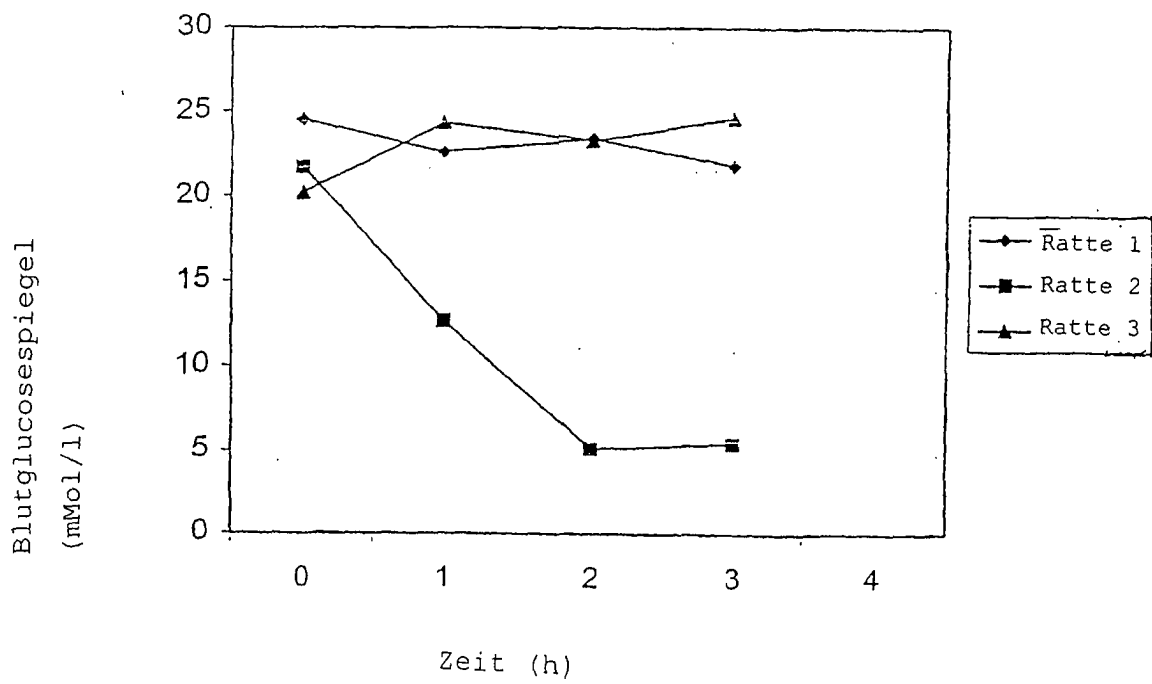


Fig. 7 Orale Verabreichung des Insulin-Hy-Komplexes

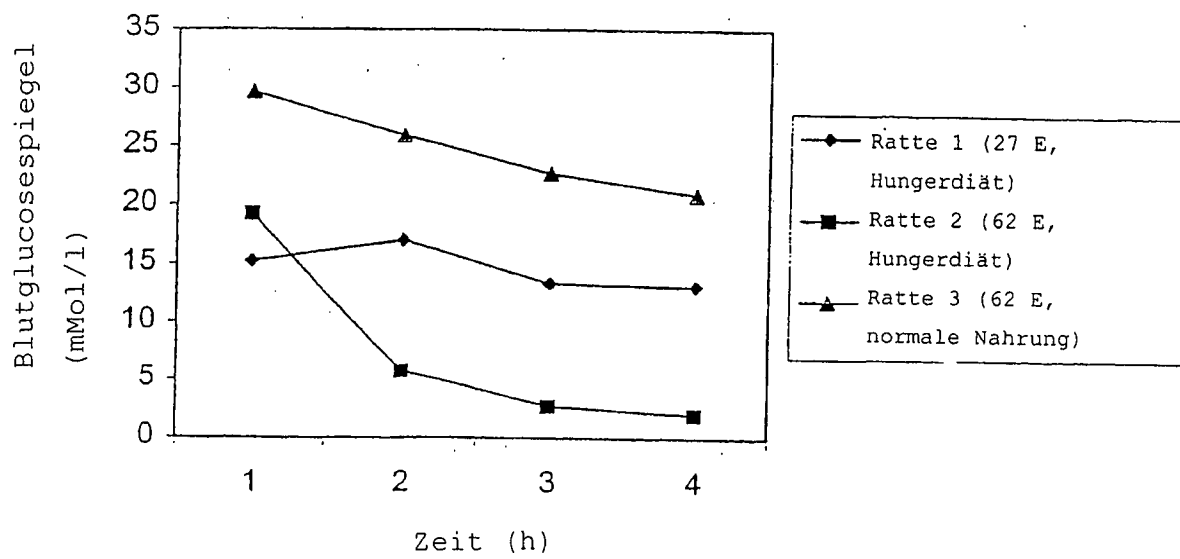


Fig. 8 Subkutane Verabreichung von Insulinreferenz
(0,065 ml, 6,8 E/ml)

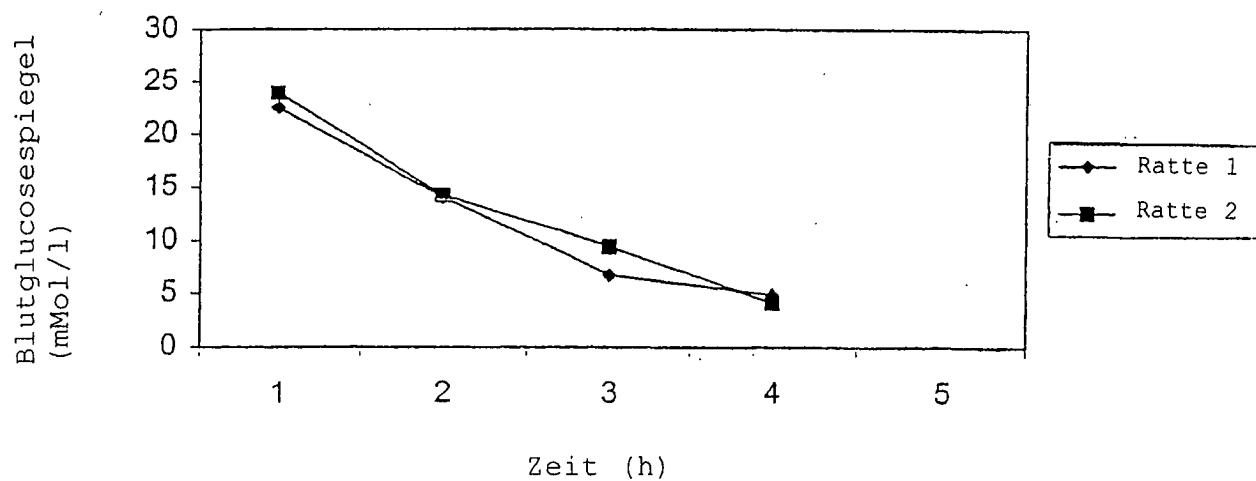


Fig. 9 Gewichtszunahme bei Hx-Ratten

