



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 17 367 T2 2007.10.18

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 429 731 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 17 367.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US02/29679

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 775 863.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2003/024425

(86) PCT-Anmeldetag: 19.09.2002

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 27.03.2003

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 23.06.2004

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 03.01.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 18.10.2007

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 9/14 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

323459 P 19.09.2001 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Elan Pharma International Ltd., Shannon, IE

(72) Erfinder:

McGURK, L., Simon, King of Prussia, PA 19406, US; MERISKO-LIVERSIDGE, Elaine, West Chester, PA 19380, US; O'MAHONEY, Daniel, Blackrock, Co. Dublin, IE; WEIDERHOLD, Amy, Hatfield, PA 19440, US; RAOOF, Araz, 1950 Kraainem, BE

(74) Vertreter:

Dörries Frank-Molnia & Pohlman, 80333 München

(54) Bezeichnung: NANOPARTIKELZUSAMMENSETZUNGEN ENTHALTEND INSULIN

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 eingelebt, 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****Gebiet der Erfindung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft nanopartikuläre Zusammensetzungen, die Insulin umfassen, wobei an die Oberfläche der Insulinpartikel mindestens ein Oberflächenstabilisator adsorbiert ist.

**Hintergrund der Erfindung****A. Hintergrund hinsichtlich nanopartikulärer Zusammensetzungen**

**[0002]** Nanopartikuläre Zusammensetzungen, die erstmals im U.S.-Patent Nr. 5,145,684 ("das '684er Patent") beschrieben sind, sind Partikel, die aus einem schlecht löslichen Wirkstoff bestehen, auf dessen Oberfläche ein nicht quervernetzter Oberflächenstabilisator adsorbiert ist. Das '684er Patent beschreibt ferner Verfahren zur Herstellung solcher nanopartikulärer Zusammensetzungen. Nanopartikuläre Zusammensetzungen sind wünschenswert, weil bei einer Abnahme der Partikelgröße und einem daraus folgenden Anstieg der Oberfläche eine Zusammensetzung nach der Verabreichung rasch gelöst und adsorbiert wird. Das '684er Patent lehrt keine nanopartikulären Zusammensetzungen, die Peptide oder Insulin umfassen, oder schlägt diese vor.

**[0003]** Verfahren zur Herstellung von nanopartikulären Zusammensetzungen sind zum Beispiel beschrieben in den U.S.-Patenten Nr. 5,518,187 und 5,862,999, beide für "Method of Grinding Pharmaceutical Substances"; im U.S.-Patent Nr. 5,718,388 für "Continuous Method of Grinding Pharmaceutical Substances" und im U.S.-Patent Nr. 5,510,118 für "Process of Preparing Therapeutic Compositions Containing Nanoparticles".

**[0004]** Nanopartikuläre Zusammensetzungen sind zum Beispiel außerdem beschrieben in den U.S.-Patenten Nr. 5,298,262 für "Use of Ionic Cloud Point Modifiers to Prevent Particle Aggregation During Sterilization"; 5,302,401 für "Method to Reduce Particle Size Growth During Lyophilization"; 5,318,767 für "X-Ray Contrast Compositions Useful in Medical Imaging"; 5,326,552 für "Novel Formulation For Nanoparticulate X-Ray Blood Pool Contrast Agents Using High Molecular Weight Non-ionic Surfactants"; 5,328,404 für "Method of X-Ray Imaging Using Iodinated Aromatic Propanedioates"; 5,336,507 für "Use of Charged Phospholipids to Reduce Nanoparticle Aggregation"; 5,340,564 für "Formulations Comprising Olin 10-G to Prevent Particle Aggregation and Increase Stability"; 5,346,702 für "Use of Non-Ionic Cloud Point Modifiers to Minimize Nanoparticulate Aggregation During Sterilization"; 5,349,957 für "Preparation and Magnetic Properties of Very Small Magnetic-Dextran Particles"; 5,352,459 für "Use of Purified Surface Modifiers to Prevent Particle Aggregation During Sterilization"; 5,399,363 und 5,494,683, beide für "Surface Modified Anticancer Nanoparticles"; 5,401,492 für "Water Insoluble Non-Magnetic Manganese Particles as Magnetic Resonance Enhancement Agents"; 5,429,824 für "Use of Tyloxapol as a Nanoparticulate Stabilizer"; 5,447,710 für "Method for Making Nanoparticulate X-Ray Blood Pool Contrast Agents Using High Molecular Weight Non-ionic Surfactants"; 5,451,393 für "X-Ray Contrast Compositions Useful in Medical Imaging"; 5,466,440 für "Formulations of Oral Gastrointestinal Diagnostic X-Ray Contrast Agents in Combination with Pharmaceutically Acceptable Clays"; 5,470,583 für "Method of Preparing Nanoparticle Compositions containing Charged Phospholipids to Reduce Aggregation"; 5,472,653 für "Nanoparticulate Diagnostic Mixed Carbamic Anhydrides as X-Ray Contrast Agents for Blood Pool and Lymphatic System Imaging"; 5,500,204 für "Nanoparticulate Diagnostic Dimers as X-Ray Contrast Agents for Blood Pool and Lymphatic System Imaging"; 5,518,738 für "Nanoparticulate NSAID Formulations"; 5,521,218 für "Nanoparticulate Iododipamide Derivatives for Use as X-Ray Contrast Agents"; 5,525,328 für "Nanoparticulate Diagnostic Diatrizoxy Ester X-Ray Contrast Agents for Blood Pool and Lymphatic System Imaging"; 5,543,133 für "Process of Preparing X-Ray Contrast Compositions Containing Nanoparticles"; 5,552,160 für "Surface Modified NSAID Nanoparticles"; 5,560,931 für "Formulations of Compounds as Nanoparticulate Dispersions in Digestible Oils or Fatty Acids"; 5,565,188 für "Polyalkylene Block Copolymers as Surface Modifiers for Nanoparticles"; 5,569,448 für "Sulfated Non-ionic Block Copolymer Surfactant as Stabilizer Coatings for Nanoparticle Compositions"; 5,571,536 für "Formulations of Compounds as Nanoparticulate Dispersions in Digestible Oils or Fatty Acids"; 5,573,749 für "Nanoparticulate Diagnostic Mixed Carboxylic Anhydrides as X-Ray Contrast Agents for Blood Pool and Lymphatic System Imaging"; 5,573,750 für "Diagnostic Imaging X-Ray Contrast Agents"; 5,573,783 für "Redispersible Nanoparticulate Film Matrices With Protective Overcoats"; 5,580,579 für "Site-specific Adhesion Within the GI Tract Using Nanoparticles Stabilized by High Molecular Weight, Linear Polyethylene Oxide) Polymers"; 5,585,108 für "Formulations of Oral Gastrointestinal Therapeutic Agents in Combination with Pharmaceutically Acceptable Clays"; 5,587,143 für "Butylene Oxide-Ethylene Oxide Block Copolymers Surfactants as Stabilizer Coatings for Nanoparticulate Compositions"; 5,591,456 für "Milled Naproxen with Hydroxypropyl Cellulose as Dispersion Stabilizer"; 5,593,657 für "Novel Barium Salt Formulations Stabilized by Non-ionic and Anionic Stabilizers"; 5,622,938 für "Sugar Based Surf-

actant for Nanocrystals"; 5,628,981 für "Improved Formulations of Oral Gastrointestinal Diagnostic X-Ray Contrast Agents and Oral Gastrointestinal Therapeutic Agents"; 5,643,552 für "Nanoparticulate Diagnostic Mixed Carbonic Anhydrides as X-Ray Contrast Agents for Blood Pool and Lymphatic System Imaging"; 5,718,388 für "Continuous Method of Grinding Pharmaceutical Substances"; 5,718,919 für "Nanoparticles Containing the R(-) Enantiomer of Ibuprofen"; 5,747,001 für "Aerosols Containing Beclomethasone Nanoparticle Dispersions"; 5,834,025 für "Reduction of Intravenously Administered Nanoparticulate Formulation Induced Adverse Physiological Reactions"; 6,045,829 und WO 99/02665 "Nanocrystalline Formulations of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Protease Inhibitors Using Cellulosic Surface Stabilizers"; 6,068,858 für "Methods of Making Nanocrystalline Formulations of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Protease Inhibitors Using Cellulosic Surface Stabilizers"; 6,153,225 für "Injectable Formulations of Nanoparticulate Naproxen"; 6,165,506 für "New Solid Dose Form of Nanoparticulate Naproxen"; 6,221,400 für "Methods of Treating Mammals Using Nanocrystalline Formulations of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Protease Inhibitors"; 6,264,922 für "Nebulized Aerosols Containing Nanoparticle Dispersions"; 6,267,989 für "Methods for Preventing Crystal Growth and Particle Aggregation in Nanoparticle Compositions"; 6,270,806 für "Use of PEG-Derivatized Lipids as Surface Stabilizers for Nanoparticulate Compositions"; 6,316,029 für "Rapidly Disintegrating Solid Oral Dosage Form"; 6,375,986 für "Solid Dose Nanoparticulate Compositions Comprising a Synergistic Combination of a Polymeric Surface Stabilizer and Diethyl Sodium Sulfosuccinate"; 6,428,814 für "Bioadhesive Nanoparticulate Compositions Having Cationic Surface Stabilizers"; und 6,432,381 für "Methods for Targeting Drug Delivery to the Upper and/or Lower Gastrointestinal Tract", die hier sämtlich durch Bezugnahme aufgenommen sind. Zusätzlich beschreibt die U.S.-Patentanmeldung Nr. 20020012675 A1, veröffentlicht am 31. Januar 2002, für "Controlled Release Nanoparticulate Compositions" nanopartikuläre Zusammensetzungen.

**[0005]** Auf nanopartikuläre Peptide und Proteine wird Bezug genommen im U.S.-Patent Nr. 6,375,986 für "Solid Dose Nanoparticulate Compositions Comprising a Synergistic Combination of a Polymeric Surface Stabilizer and Diethyl Sodium Sulfosuccinate", U.S.-Patent Nr. 6,428,814 und WO 01/26635 für "Bioadhesive Nanoparticulate Compositions Having Cationic Surface Stabilizers", in der U.S.-Patentanmeldung Nr. 20020012675 A1 für "Controlled Release Nanoparticulate Compositions", WO 00/51572 für "Use of PEG-Derivatized Lipids as Surface Stabilizers for Nanoparticle Compositions", veröffentlicht am 8. September 2000, und WO 00/53164 für "Methods for Preventing Crystal Growth and Particle Aggregation in Nanoparticulate Compositions", veröffentlicht am 14. September 2000. Ferner offenbart WO 00/27363 nanopartikuläre Aerosolformulierungen sowie Verfahren zur Herstellung solcher Formulierungen, und EP 0 499 299 betrifft oberflächenmodifizierte Arzneistoff-Nanopartikel. Jedoch lehrt keine dieser Bezugsstellen, dass das Peptid oder Protein Insulin sein kann, oder schlägt dieses vor.

**[0006]** Zusammensetzungen amorpher kleiner Partikel sind zum Beispiel beschrieben in den U.S.-Patenten Nr. 4,783,484 für "Particulate Composition and Use Thereof as Antimicrobial Agent"; 4,826,689 für "Method for Making Uniformly Sized Particles from Water-Insoluble Organic Compounds"; 4,997,454 für "Method for Making Uniformly-Sized Particles from Insoluble Compounds"; 5,741,522 für "Ultrasmall, Non-aggregated Porous Particles of Uniform Size for Entrapping Gas Bubbles Within and Methods"; und 5,776,496 für "Ultrasmall Porous Particles for Enhancing Ultrasound Back Scatter". Keine dieser Bezugsstellen betrifft eine nanopartikuläre Insulin-Zusammensetzung.

#### B. Hintergrund hinsichtlich der Zuführung von Peptiden und Proteinen

**[0007]** Die Zuführung von Peptiden und Proteinen war lange Zeit aufgrund von hoher Toxizität, schlechter biologischer Verfügbarkeit und des Abbaus des Peptids oder Proteins, wenn es zur Verabreichung oder Applikation formuliert wird, ein Problem. Zahlreiche Ansätze, um Peptid- und Protein zusammensetzungen zu formulieren, sind entwickelt worden. Das U.S.-Patent Nr. 5,889,110 offenbart z.B. Mikropartikel, die ein Salz umfassen, das aus einem Kation, welches aus einem Peptid mit einer oder mehreren basischen Gruppen stammt, und einem Anion, welches aus einem Polyester mit endständiger Carboxylgruppe stammt, gebildet wird. Die Zusammensetzung wird aus einem stöchiometrischen Äquivalent der endständigen Polyester carbonsäuregruppen im Verhältnis zu den basischen Peptidgruppen hergestellt, die durch ein kompliziertes und teures Verfahren erhältlich sind.

**[0008]** Solch ein Verfahren umfasst: (i) Lösen des basischen Peptids und des Polyesters mit endständigen Carboxylgruppen in einem ersten Lösungsmittel, in dem sowohl das Peptid als auch der Polyester löslich sind, um eine erste Lösung zu bilden; (ii) Einfrieren der ersten Lösung bei hoher Geschwindigkeit, um eine gefrorene Mischung zu bilden; (iii) Gefriertrocknen der gefrorenen Mischung, um das erste Lösungsmittel zu entfernen, so dass ein gefriergetrocknetes Produkt gebildet wird; (iv) Dispergieren des gefriergetrockneten Produkts in einem zweiten Lösungsmittel, das ein Lösungsmittel für den Polyester und ein Nicht-Lösungsmittel für das

Peptid ist, um eine zweite Lösung zu bilden, die das Peptid/Polyestersalz enthält; und (v) Entfernen des zweiten Lösungsmittels aus der zweiten Lösung durch Sprühtrocknen, Spritzerstarren, Verdampfung oder Phasentrennung-Koazervation, wodurch ein mikropartikuläres festes Produkt hergestellt wird.

**[0009]** U.S.-Patent Nr. 5,354,562 offenbart ein Verfahren zur Herstellung mikronisierter Polypeptid-Arzneistoffe in Pulverform, die zur Verabreichung als Aerosol oder zur Verwendung in injizierbaren Suspensionen geeignet sind, durch Lyophilisierung, gefolgt von Strahlmahlen. U.S.-Patent Nr. 6,051,694 offenbart ein Verfahren zur Größenverringerung von Proteinen, umfassend das In-Kontakt-Bringen des festen Proteins mit einer kritischen Flüssigkeit, in der das Protein im Wesentlichen unlöslich ist, gefolgt von Senken des Drucks der Mischung aus dem Protein und der kritischen Flüssigkeit.

**[0010]** Keines der Verfahren gemäß dem Stand der Technik liefert nanopartikuläre Insulinzusammensetzungen. Tatsächlich haben Versuche, Peptide, wie Insulin, zu mahlen, zu einer Konformationsänderung der Peptide geführt. Zum Beispiel offenbaren Leung et al., J. Pharm. Sci., 87:505-7 (1998), die Umwandlung der Kristallstruktur von Aspartamhemihydrat in ein anderes Polymorph nach dem Kugelmahlen des Peptids. Dies überrascht nicht, da Peptide und Proteine gegenüber Mahlbedingungen, z.B. Scherkräften, Druck und Temperatur, labil sein können.

**[0011]** Im Fachgebiet verbleibt ein Bedarf an nanopartikulären Insulinformulierungen, welche die Insulinabgabe in hohen Dosen mit gleich bleibender und wirksamer Aktivität und mit weiteren Vorteilen im Vergleich zu allen herkömmlichen Zubereitungen, die derzeit verfügbar sind, erleichtern. Erfindungsgemäß wird eine derartige Insulinzubereitung bereitgestellt.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0012]** Die vorliegende Erfindung betrifft die überraschende und unerwartete Entdeckung, dass stabile nanopartikuläre Zusammensetzungen von Insulin hergestellt werden können. Die nanopartikulären Zusammensetzungen, die Insulin und mindestens einen Oberflächenstabilisator, der an dessen Oberfläche adsorbiert ist, umfassen, sind im Vergleich zu Insulinzubereitungen des Standes der Technik dahingehend vorteilhaft, dass sie sowohl ein schnelles Einsetzen der Aktivität als auch eine länger andauernde Aktivität besitzen.

**[0013]** Die Erfindung betrifft außerdem Verfahren zur Herstellung nanopartikulärer Insulinzusammensetzungen sowie pharmazeutische Dosierungsformen, die diese enthalten. Das Verfahren zur Herstellung der Insulinzusammensetzungen umfasst das In-Kontakt-Bringen von Insulin, z.B. von unlöslichem Rinder-Insulin oder rekombinantem Insulin, mit mindestens einem Oberflächenstabilisator für eine Zeit und unter Bedingungen, die ausreichen, um eine stabile nanopartikuläre Zusammensetzung bereitzustellen. Die Partikelgröße des Insulins wird durch Mahlen oder Homogenisierung verringert. Der eine oder die mehreren Oberflächenstabilisator(en) kann/können mit dem Insulin entweder vor, während oder nach der Größenreduzierung in Kontakt gebracht werden.

**[0014]** Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Zubereitungen zur Verwendung bei der Behandlung von Zuständen, die eine Insulintherapie erforderlich machen.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

**[0015]** [Fig. 1](#): sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bei einer Vergrößerung von 5000 von Insulinpartikeln vor und nach dem Mahlen gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren;

**[0016]** [Fig. 2](#): zeigt die Ergebnisse eines reduzierenden SDS-PAGE-Gels von dem Überstand und dem Sediment einer nanopartikulären Insulinprobe in zwei Konzentrationen, um zu bestimmen, ob das Mahlen einen Verlust von Insulin verursacht hat;

**[0017]** [Fig. 3](#): zeigt die Ergebnisse eines reduzierenden SDS-PAGE-Gels von dem Sediment einer nanopartikulären Insulinprobe in zwei Konzentrationen, um zu bestimmen, ob das Mahlen einen Verlust von Insulin verursacht hat;

**[0018]** [Fig. 4](#): zeigt die pharmakokinetischen Parameter von Insulin, die sich aus der Injektion von nanopartikulären Insulinproben auf intramuskulärem, subkutanem und intraperitonealem Weg ergeben, im Vergleich zu einer Kontroll-Insulinlösung;

**[0019]** [Fig. 5](#): ist ein Balkendiagramm, das den AUC ( $\mu\text{U}/\text{ml} \cdot \text{Std.}$ ) von Insulin aus einer Injektion von nanopartikulären Insulinproben auf subkutanem, intramuskulärem und intraperitonealem Weg im Vergleich zu einer Kontroll-Insulinlösung veranschaulicht;

**[0020]** [Fig. 6](#): ist eine graphische Darstellung, welche die Blutinsulinkonzentration mit der Zeit nach einer Injektion von nanopartikulären Insulinproben auf subkutanem, intramuskulärem und intraperitonealem Weg im Vergleich zu einer Kontroll-Insulinlösung zeigt;

**[0021]** [Fig. 7](#): ist eine graphische Darstellung, welche die Blutglucosekonzentration mit der Zeit nach einer Injektion von nanopartikulären Insulinproben auf subkutanem, intramuskulärem und intraperitonealem Weg im Vergleich zu einer Kontroll-Insulinlösung zeigt; und

**[0022]** [Fig. 8](#): ist eine graphische Darstellung, welche die Änderung der Blutglucosekonzentration mit der Zeit nach einer Injektion von nanopartikulären Insulinproben auf subkutanem, intramuskulärem und intraperitonealem Weg im Vergleich zu einer Kontroll-Insulinlösung zeigt.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0023]** Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen von nanopartikulärem Insulin und Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung bei der Insulintherapie. Vor der vorliegenden Erfindung war bekannt, dass kristalline Arzneistoffe durch das im '684er Patent gelehrt Verfahren zu nanopartikulären Zusammensetzungen formuliert werden konnten. Wie vorstehend erläutert, wurden jedoch Formulierungen von nanopartikulärem Insulin, teilweise aufgrund der Schwierigkeit, die Konformationsstruktur des Insulins nach dem Mahlen auf eine Partikelgröße im Nanometerbereich beizubehalten, nicht in Erwägung gezogen. Dies ist signifikant, da eine Änderung in der Konformation des Insulins mit einem Verlust der Aktivität korrelieren kann.

**[0024]** Nanopartikuläres Insulin, das erfindungsgemäß hergestellt wird, umfasst mindestens einen Oberflächenstabilisator, der an den Insulinpartikeln adsorbiert ist. Der Oberflächenstabilisator wirkt als eine sterische Barriere für andere Insulinpartikel, wodurch er Agglomeration und Größenwachstum der Partikel verhindert. Dies führt zu einer stabilen nanopartikulären Zusammensetzung, in der die Partikelgröße der Zusammensetzung mit der Zeit über Solubilisation und Rekristallisation oder Agglomeration nicht wesentlich zunimmt. Einzeln adsorbierte Moleküle des Oberflächenstabilisators sind im Wesentlichen frei von intermolekularen Quervernetzungen.

**[0025]** Insulin ist ein Proteinhormon von 5,8 kD, das bei der Regulation des Brennstoffmetabolismus wichtig ist. Die Sekretion des Insulins durch die  $\beta$ -Zellen des Pankreas wird durch Glucose und das parasympathische Nervensystem stimuliert. Insulin fördert die Dephosphorylierung von ineinander umwandelbaren Schlüsselenzymen. Eine Folge ist, dass die Glykogensynthese sowohl im Muskel als auch in der Leber stimuliert und die Gluconeogenese durch die Leber unterdrückt werden. Insulin beschleunigt ferner die Glykolyse in der Leber, die ihrerseits die Synthese von Fettsäuren erhöht. Der Eintritt von Glukose in Muskel- und Fettzellen wird durch Insulin gefördert. Der Überfluss von Fettsäuren und Glucose im Fettgewebe führt zu einer Synthese und Speicherung von Triacylglycerinen. Die Wirkung von Insulin erstreckt sich auch auf den Aminosäure- und Proteinmetabolismus. Insulin fördert die Aufnahme von verzweigtketten Aminosäuren durch die Muskulatur, was einen Aufbau von Muskelprotein begünstigt. In der Summe hat Insulin eine allgemeine stimulierende Wirkung auf die Proteinsynthese.

**[0026]** Drei verschiedene Insulinzusammensetzungen sind verfügbar: löslich, unlöslich und eine Mischung davon. Der Unterschied zwischen diesen Zusammensetzungen besteht in der beobachteten biologischen Verfügbarkeit unter physiologischen Bedingungen. Unlösliches Insulin und eine Mischung von löslichem und unlöslichem Insulin weisen ein langsames Einsetzen der Aktivität, etwa zwei Stunden, jedoch eine längere anhaltende Dauer auf, die für bis zu etwa 24 Stunden bzw. 13–14 Stunden anhält. Lösliches Insulin weist ein rascheres Einsetzen der Aktivität, etwa 30 Minuten, jedoch bei einer Dauer der Aktivität von nur etwa sechs Stunden auf. Das erfindungsgemäße nanopartikuläre Insulin ist Insulinzusammensetzungen des Standes der Technik dahingehend überlegen, dass es ein schnelles Einsetzen der Aktivität zeigt, wie man es mit löslichem Insulin findet, und eine verlängerte Dauer der Aktivität aufweist, wie man sie mit unlöslichem und Mischungen von löslichem-unlöslichem Insulin findet.

**[0027]** Die Insulinzusammensetzung kann zum Beispiel für die Verabreichung über orale, pulmonale, nasale, parenterale, rektale, lokale, bukkale oder topische Verabreichung formuliert werden.

**[0028]** Die Insulinpartikel können die Form von kristallinen Partikeln, semikristallinen Partikeln, semiamorphen Partikeln, amorphen Partikeln oder einer Mischung davon haben.

**[0029]** Die Konzentration des Insulins in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen kann von etwa 99,5% bis etwa 0,001%, von etwa 95% bis etwa 0,1% oder von etwa 90% bis etwa 0,5% vom Gewicht, ausgehend vom gesamten kombinierten Trockengewicht des Insulins und mindestens eines Oberflächenstabilisators, nicht umfassend andere Hilfsstoffe, reichen.

#### A. Verwendbare Oberflächenstabilisatoren

**[0030]** Geeignete Oberflächenstabilisatoren, die zur Herstellung des erfindungsgemäßen nanopartikulären Insulins verwendet werden, werden vorzugsweise aus bekannten organischen oder anorganischen pharmazeutischen Hilfsstoffen ausgewählt. Zwei oder mehrere Oberflächenstabilisatoren können in Kombination verwendet werden. Zusätzlich zur Verhinderung von Agglomeration und Partikelgrößenwachstum, wie vorstehend beschrieben, schützen die Oberflächenstabilisatoren Insulin vor Abbau und möglicher Proteasespaltung.

**[0031]** Diese organischen und anorganischen pharmazeutischen Hilfsstoffe sind u.a. verschiedene Polymere, Oligomere mit niedrigem Molekulargewicht, natürliche Produkte und oberflächenaktive Mittel. Bevorzugte Oberflächenstabilisatoren umfassen nicht-ionische und ionische oberflächenaktive Mittel (z.B. kationische und anionische oberflächenaktive Mittel). Repräsentative Beispiele für Oberflächenstabilisatoren sind u.a. Cetylpyridiniumchlorid, Gelatine, Lecithin (Phosphatide), Dextran, Glycerin, Cholesterin, Tragant, Stearinsäure, ihre Salze und ihre Ester, Cetylmacrogol Emulsifying Wax, Sorbitanester, Polyoxyethylen-kylether, Polyoxyethylenricinusöl-Derivate, Polyoxyethylensorbitanfettsäureester, z.B. die kommerziell erhältlichen Tweens®, wie Tween 80® (ICI Specialty Chemicals); Polyethylenglykole, z. B. Carbowax 3350® und 1450®, und Carbopol 934® (Union Carbide), Dodecyltrimethylammoniumbromid, Polyoxyethylenstearate, kolloidales Siliciumdioxid, Natriumdodecylsulfat, Calciumcarboxymethylcellulose, Hydroxypropylcellulosen (z.B. HPC, HPC-SL und HPC-L), Hydroxypropylmethyl-cellulose (HPMC), Natriumcarboxymethylcellulose, Methylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropyl-methylcellulose-Phthalsäureester, nicht-kristalline Cellulose, Magnesiumaluminiumsilicat, Triethanolamin, Polyvinylalcohol (PVA), Polyvinylpyrrolidon (PVP), 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol-Polymer mit Ethylenoxid und Formaldehyd (auch als Tyloxapol bekannt), Poloxamere, z.B. Pluronic F68® und F108®, die Blockcopomere von Ethylenoxid und Propylenoxid sind; Poloxamine, z.B. Tetronic 908®, auch als Poloxamin 908® bekannt, das ein tetrafunktionales Blockcopolymer ist, das aus der sequenziellen Addition von Propylenoxid und Ethylenoxid an Ethylendiamin stammt, (BASF Corporation, Parsippany, N.J.); ein geladenes Phospholipid, wie Dimyristoyl-phosphatidylglycerin, Dioctylsulfosuccinat (DOSS); Tetronic 1508® (T-1508) (BASF Corporation), Dialkylester von Natriumsulfobernsteinsäure (z.B. Aerosol OT®, das ein Dioctylester der Natriumsulfobernsteinsäure ist (American Cyanamid)); Natriumlaurylsulfat (SLS), wie Duponol P® (DuPont); Triton X-200®, ein Alkylarylpolyethersulfonat (Rohm and Haas); Crodestas F-110®, das eine Mischung von Saccharose-stearat und Saccharosedistearat ist (Croda Inc.); p-Isononylphenoxy-poly-(glycidol), auch als Olin-10G® oder oberflächenaktives Mittel 10-G® bekannt (Olin Chemicals, Stamford, CT); Crodestas SL-40® (Croda, Inc.); Poly-(2-methacryloxyethyltrimethylammonium-bromid) (S1001); quartäres Poly(N-vinylpyrrolidon/2-dimethylaminoethylmethacrylat)dimethylsulfat (S1002); Poly-(2-methacryloxyamidopropyltrimethylammoniumchlo-rid) (S1004); Natriumdesoxycholsäure; mit Polyethylen-glykol (PEG) derivatisiertes Vitamin E, ein mit PEG derivatisiertes Phospholipid, mit PEG derivatisiertes Cholesterin, ein mit PEG derivatisiertes Cholesterinderivat, mit PEG derivatisiertes Vitamin A, Benzalkoniumchlorid (BKC), Centrimid (eine quartäre Ammoniumverbindung), Span® 20 (Sorbitanmonolaurat), Plasdone® 5630, (ein Random-Copolymer von Polyvinyl-pyrrolidon (PVP) und Vinylacetat in einem Verhältnis von 60:40), Hexyldecyltrimethylammoniumbromid (HDMAB), Triblockcopolymer der Struktur  $-(\text{-PEO}-)(\text{-PBO}-)(\text{-PEO}-)$  (als B20-5000 bekannt), Poly-(2-methacryloxy-ethyltrimethylammoniumbromid) (S1001), quartäres Poly-(N-vinylpyrrolidon/2-dimethylaminoethylmethacrylat)dimethylsulfat (S1002); Poly-(2-methylacryl-oxyamidopropyltrimethylammoniumchlorid) (S1004), Random-Copolymere von PVP und Vinylacetat, Lysozym und dergleichen.

**[0032]** Beispiele für geeignete kationische Oberflächenstabilisatoren sind u.a., sind aber nicht beschränkt auf Polymere, Biopolymere, Polysaccharide, Cellulosen, Alginat, Phospholipide, und nicht-polymere Verbindungen, wie zwitterionische Stabilisatoren, Poly-n-methylpyridinium, Anthryulpyridiniumchlorid, kationi-sche Phospholipide, Chitosan, Polylysin, Polyvinyl-imidazol, Polybren, Polymethylmethacrylattrimethyl-ammoniumbromid (PMMTMABr), Hexyldeyltrimethylammonium-bromid (HDMAB) und Polyvinylpyrrolidon-2-dimethylamino-ethylmethacrylatdimethylsulfat.

**[0033]** Andere geeignete kationische Stabilisatoren sind u.a., sind aber nicht beschränkt auf kationische Lipide, Sulfonium-, Phosphonium- und quartäre Ammo-niumverbindungen, wie Stearyltrimethylammoniumchlorid,

Benzyl-di-(2-chlorethyl)ethylammoniumbromid, Cocosnuss-trimethylammoniumchlorid oder -bromid, Cocosnussmethyl-dihydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid, Decyltri-ethylammoniumchlorid, Decyldimethylhydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid,  $C_{12-15}$ -Dimethylhydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid, Cocosnussdimethylhydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid, Myristyltrimethylammoniummethylsulfat, Lauryldimethylbenzylammoniumchlorid oder -bromid, Lauryldimethyl(ethenoxy)<sub>4</sub>-ammonium-chlorid oder -bromid, N-Alkyl-( $C_{12-18}$ )-dimethylbenzylammoniumchlorid, N-Alkyl-( $C_{14-18}$ )-dimethylbenzylammoniumchlorid, N-Tetradecylidimethylbenzylammoniumchlorid-monohydrat, Dimethyldidecylammoniumchlorid, N-Alkyl- und ( $C_{12-14}$ )-dimethyl-1-naphthylmethylammoniumchlorid, Trimethylammoniumhalogenid, Alkyltrimethylammoniumsalze und Dialkyldimethylammoniumsalze, Lauryltrimethylammoniumchlorid, ethoxyliertes Alkyamidoalkylalkylammoniumsalz und/oder ein ethoxyliertes Trialkylammoniumsalz, Dialkylbenzoldialkylammoniumchlorid, N-Didecyldimethylammoniumchlorid, N-Tetradecylidimethylbenzylammoniumchlorid-monohydrat, N-Alkyl-( $C_{12-14}$ )-dimethyl-1-naphthylmethylammoniumchlorid und Dodecyldimethylbenzylammoniumchlorid, Dialkylbenzolalkylammoniumchlorid, Lauryltrimethylammoniumchlorid, Alkylbenzylmethylammoniumchlorid, Alkylbenzyldimethylammonium-bromid,  $C_{12-}$ ,  $C_{15-}$ ,  $C_{17-}$  Trimethylammoniumbromide, Dodecylbenzyltriethylammoniumchlorid, Polydiallyldimethylammoniumchlorid (DADMAC), Dimethylammoniumchloride, Alkyldimethylammoniumhalogenide, Tricetyltrimethylammoniumchlorid, Decyltrimethylammoniumbromid, Dodecyltri-ethylammoniumbromid, Tetradecyltrimethylammoniumbromid, Methyltriocylammoniumchlorid (ALIQUAT 336<sup>TM</sup>), POLYQUAT 10<sup>TM</sup>, Tetrabutylammoniumbromid, Benzyltrimethylammonium-bromid, Cholinester (wie Cholinester von Fettsäuren), Benzalkoniumchlorid, Stearalkoniumchlorid-Verbindungen (wie Stearyltrimoniumchlorid und Distearyltrimoniumchlorid), Cetylpyridiniumbromid oder -chlorid, Halogenid-salze von quarternisierten Polyoxoethylalkylaminen, MIRAPOL<sup>TM</sup> und ALKAQUAT<sup>TM</sup> (Alkaril Chemical Company), Alkylpyridiniumsalze; Amine, wie Alkylamine, Dialkylamine, Alkanolamine, Polyethylenpolyamine, N,N-Dialkylaminoalkylacrylate und Vinylpyridin, Aminsalze, wie Laurylaminacetat, Stearylaminacetat, Alkylpyridini-umsalz und Alkylimidazoliumsalz, und Aminoxide; Imidazoliniumsalze; protonierte quartäre Acrylamide; methylierte quartäre Polymere, wie Poly[diallyldimethylammoniumchlorid] und Poly-[N-methylvinylpyridiniumchlorid]; und kationischer Guar-gummi.

**[0034]** Diese beispielhaften kationischen Oberflächenstabilisatoren und weitere verwendbare kationische Oberflächenstabilisatoren sind in J. Cross und E. Singer, Cationic Surfactants: Analytical and Biological Evaluation (Marcel Dekker, 1994); P. und D. Rubingh (Hrsg.), Cationic Surfactants: Physical Chemistry (Marcel Dekker, 1991) und J. Richmond, Cationic Surfactants: Organic Chemistry, (Marcel Dekker, 1990) beschrieben.

**[0035]** Besonders bevorzugte nicht-polymere primäre Stabilisatoren sind jede nicht-polymere Verbindung, wie Benzalkoniumchlorid, eine Carboniumverbindung, eine Phosphoniumverbindung, eine Oxoniumverbindung, eine Haloniumverbindung, eine kationische organometallische Verbindung, eine quartäre Phosphorverbindung, eine Pyridiniumverbindung, eine Aniliniumverbindung, eine Ammoniumverbindung, eine Hydroxylammoniumverbindung, eine primäre Ammoniumverbindung, eine sekundäre Ammoniumverbindung, eine tertiäre Ammoniumverbindung und quartäre Ammoniumverbindungen der Formel  $NR_1R_2R_3R_4^{(+)}$ . Für Verbindungen der Formel  $NR_1R_2R_3R_4^{(+)}$ :

- (i) sind keine von  $R_1-R_4$   $CH_3$ ;
- (ii) ist einer von  $R_1-R_4$   $CH_3$ ;
- (iii) sind drei von  $R_1-R_4$   $CH_3$ ;
- (iv) sind alle von  $R_1-R_4$   $CH_3$ ;
- (v) sind zwei von  $R_1-R_4$   $CH_3$ , einer von  $R_1-R_4$  ist  $C_6H_5CH_2$  und einer von  $R_1-R_4$  ist eine Alkylkette mit sieben Kohlenstoffatomen oder weniger;
- (vi) sind zwei von  $R_1-R_4$   $CH_3$ , einer von  $R_1-R_4$  ist  $C_6H_5CH_2$  und einer von  $R_1-R_4$  ist eine Alkylkette mit neunzehn Kohlenstoffatomen oder mehr;
- (vii) sind zwei von  $R_1-R_4$   $CH_3$  und einer von  $R_1-R_4$  ist die Gruppe  $C_6H_5(CH_2)_n$ , wobei  $n > 1$ ;
- (viii) sind zwei von  $R_1-R_4$   $CH_3$ , einer von  $R_1-R_4$  ist  $C_6H_5CH_2$  und einer von  $R_1-R_4$  umfasst mindestens ein Heteroatom;
- (ix) sind zwei von  $R_1-R_4$   $CH_3$ , einer von  $R_1-R_4$  ist  $C_6H_5CH_2$  und einer von  $R_1-R_4$  umfasst mindestens ein Halogen;
- (x) sind zwei von  $R_1-R_4$   $CH_3$ , einer von  $R_1-R_4$  ist  $C_6H_5CH_2$  und einer von  $R_1-R_4$  umfasst mindestens ein cyclisches Fragment;
- (xi) sind zwei von  $R_1-R_4$   $CH_3$  und einer von  $R_1-R_4$  ist ein Phenylring; oder
- (xii) sind zwei von  $R_1-R_4$   $CH_3$  und zwei von  $R_1-R_4$  sind rein aliphatische Fragmente.

**[0036]** Solche Verbindungen beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf Behenalkoniumchlorid, Benzethonium-chlorid, Cetylpyridiniumchlorid, Behentrimoniumchlorid, Lauralkoniumchlorid, Cetalkoniumchlorid, Cetrimoniumbromid, Cetrimoniumchlorid, Cetylaminhydrofluorid, Chlorallylmethenaminchlorid (Quaternium-15),

Distearyl-dimoniumchlorid (Quaternium-5), Dodecyldimethylethyl-benzylammoniumchlorid (Quaternium-14), Quaternium-22, Quaternium-26, Quaternium-18-hektorit, Dimethylaminoethylchloridhydrochlorid, Cysteinhydrochlorid, Dietha-nolammonium-POE(10)-oleyletherphosphat, Diethanolammo-nium-POE(3)-oleyletherphosphat, Talgalkoniumchlorid, Dimethyldioctadecylammoniumbentonit, Stearalkoniumchlo-rid, Domiphenbromid, Denatoniumbenzoat, Myristalkoniumchlorid, Laurtrimoniumchlorid, Ethylendiamindihydro-chlorid, Guanidinhydrochlorid, Pyridoxin-HCl, Iofet-aminhydrochlorid, Megluminhydrochlorid, Methylbenz-ethoniumchlorid, Myrtrimoniumbromid, Oleyltrimonium-chlorid, Polyquaternium-1, Procainhydrochlorid, Cocobetain, Stearalkoniumbentonit, Stearalkoniumhekto-nit, Stearyltrihydroxyethylpropylendiamindihydrofluo-rid, Talgtrimoniumchlorid und Hexadecyltrimethylammo-niumbromid.

**[0037]** Die meisten dieser Oberflächenstabilisatoren sind bekannte pharmazeutische Hilfsstoffe und sind im Detail in dem gemeinsam von der American Pharmaceutical Association und The Pharmaceutical Society of Great Britain (The Pharmaceutical Press, 2000) veröffentlichten Handbook of Pharmaceutical Excipients beschrieben. Die Oberflächenstabilisatoren sind kommerziell erhältlich und/oder können durch im Stand der Technik bekannte Verfahren, ausgehend von bekannten Materialien, hergestellt werden.

**[0038]** Die Konzentration des mindestens einen Oberflächenstabilisators kann von etwa 0,001 % bis etwa 99,5%, von etwa 0,1 % bis etwa 95% und von etwa 0,5% bis etwa 90% vom Gewicht reichen, ausgehend vom gesamten kombinierten Trockengewicht des Insulins und mindestens eines Oberflächenstabilisators, nicht umfassend andere Hilfsstoffe.

#### B. Partikelgröße der Insulinpartikel

**[0039]** Die erfindungsgemäßen Insulin-Nanopartikel haben vorzugsweise eine effektive durchschnittliche Partikelgröße von weniger als circa 5 Mikron, weniger als circa 4 Mikron, weniger als circa 3 Mikron, weniger als circa 2 Mikron, weniger als circa 1500 nm, weniger als circa 1 Mikron, weniger als circa 800 nm, weniger als circa 700 nm, weniger als circa 600 nm, weniger als circa 500 nm, weniger als circa 400 nm, weniger als circa 300 nm, weniger als circa 200 nm, weniger als circa 100 nm, weniger als circa 75 nm oder weniger als circa 50 nm, wie durch Lichtstreuungsverfahren oder andere im Stand der Technik anerkannte Verfahren gemessen. Mit "einer effektiven durchschnittlichen Partikelgröße von weniger als circa 5 Mikron" ist gemeint, dass mindestens etwa 50% der Insulinpartikel eine massegemittelte Partikelgröße von weniger als circa 5 Mikron besitzen, wenn diese durch Lichtstreuungs- oder andere herkömmliche Techniken gemessen wird. Zusätzlich haben bei anderen Ausführungsformen der Erfindung mindestens etwa 70%, etwa 90% oder etwa 95% der Insulinpartikel eine effektive durchschnittliche Partikelgröße von weniger als circa 5 Mikron, weniger als circa 4 Mikron, weniger als circa 3 Mikron, weniger als circa 2 Mikron, weniger als circa 1500 nm, weniger als circa 1 Mikron, weniger als circa 800 nm, weniger als circa 700 nm, weniger als circa 600 nm, weniger als circa 500 nm, weniger als circa 400 nm, weniger als circa 300 nm, weniger als circa 200 nm, weniger als circa 100 nm, weniger als circa 75 nm oder weniger als circa 50 nm.

#### C. Verfahren zur Herstellung nanopartikulärer Insulinzusammensetzungen

**[0040]** Zusammensetzungen mit einem nanopartikulären Wirkstoff können zum Beispiel unter Verwendung von Mahl- oder Homogenisiertechniken hergestellt werden. Beispielhafte Verfahren zur Herstellung nanopartikulärer Zusammensetzungen sind im U.S.-Patent Nr. 5,145,684 beschrieben. Verfahren zur Herstellung nanopartikulärer Zusammensetzungen sind ebenfalls beschrieben im U.S.-Patent Nr. 5,518,187 für "Method of Grinding Pharmaceutical Substances"; U.S.-Patent Nr. 5,718,388 für "Continuous Method of Grinding Pharmaceutical Substances"; U.S.-Patent Nr. 5,862,999 für "Method of Grinding Pharmaceutical Substances"; U.S.-Patent Nr. 5,543,133 für "Process of Preparing X-Ray Contrast Compositions Containing Nanoparticles"; U.S.-Patent Nr. 5,534,270 für "Method of Preparing Stable Drug Nanoparticles"; U.S.-Patent Nr. 5,510,118 für "Process of Preparing Therapeutic Compositions Containing Nanoparticles" und U.S.-Patent Nr. 5,470,583 für "Method of Preparing Nanoparticle Compositions Containing Charged Phospholipids to Reduce Aggregation".

**[0041]** Die erfindungsgemäße optimale effektive durchschnittliche Partikelgröße kann durch Kontrollieren des Verfahrens der Partikelgrößenver-ringerung erhalten werden, beispielsweise durch Kontrolle der Mahlzeit und der Menge des zugesetzten Oberflächenstabilisators. Das Partikelgrößenwachstum und die Partikelaggregation können zudem durch Mahlen und/oder Lagern der Zusammensetzung unter tieferen Temperaturen minimiert werden.

**[0042]** Die nanopartikulären Insulindispersionen, die zum Beispiel durch Mahlen oder Homogenisieren hergestellt werden, können in festen, halbfesten oder flüssigen Dosierungsformulierungen verwendet werden, wie

in Formulierungen mit kontrollierter Freisetzung, schnell schmelzenden festen Dosierungsformulierungen, Aero-solformulierungen, lyophilisierten Formulierungen, Tabletten, festen Lutschtabletten, Kapseln, Pulvern, Flüssigkeiten zur Injektion usw.

1. Mahlen zum Erhalten nanopartikulärer

Insulinzusammensetzungen

**[0043]** Das Mahlen von Insulin, um eine nanopartikuläre Zusammensetzung zu erhalten, umfasst das Dispergieren von Insulinpartikeln in einem flüssigen Dispersionsmedium, in dem das Insulin schlecht löslich ist, gefolgt von der Anwendung mechanischer Mittel in Gegenwart von Mahlmedien, um die Partikelgröße des Insulins auf die erwünschte effektive durchschnittliche Partikelgröße zu verringern. Das Dispersionsmedium kann zum Beispiel Wasser, Distelöl, Ethanol, t-Butanol, Glycerin, Polyethylenglykol (PEG), Hexan oder Glykol sein.

**[0044]** Die Größe der Insulinpartikel kann in Gegenwart von mindestens einem Oberflächenstabilisator verringert werden. Alternativ können die Insulinpartikel nach dem Verreiben mit einem oder mehreren Oberflächenstabilisatoren in Kontakt gebracht werden. Es wird jedoch bevorzugt, das Insulin in dem flüssigen Dispersionsmedium in Gegenwart von mindestens einem Oberflächenstabilisator als Hilfe zur Benetzung der Insulinpartikel zu dispergieren. Andere Verbindungen, wie ein Verdünnungsmittel, können während des Größenverringerungsverfahrens zu der Insulin/Oberflächenstabilisator-Zusammensetzung hinzugefügt werden. Die Dispersionen können im Durchlauf oder chargenweise hergestellt werden.

2. Homogenisierung zum Erhalten nanopartikulärer

Insulinzusammensetzungen

**[0045]** Beispielhafte Homogenisierungsverfahren zur Herstellung von Zusammensetzungen mit einem nanopartikulären Wirkstoff sind im U.S.-Patent Nr. 5,510,118, für "Process of Preparing Therapeutic Compositions Containing Nanoparticles" beschrieben.

**[0046]** Ein derartiges Verfahren umfasst das Dispergieren von Insulinpartikeln in einem flüssigen Dispersionsmedium, gefolgt von Unterwerfen der Dispersion einer Homogenisierung, um die Partikelgröße des Insulins auf die erwünschte effektive durchschnittliche Partikelgröße zu verringern. Die Größe der Insulinpartikel kann in Anwesenheit von mindestens einem Oberflächenstabilisator verringert werden. Alternativ können die Insulinpartikel mit einem oder mehreren Oberflächenstabilisatoren entweder vor oder nach der Verringerung der Partikelgröße in Kontakt gebracht werden. Es ist jedoch bevorzugt, das Insulin in dem flüssigen Dispersionsmedium in Gegenwart von mindestens einem Oberflächenstabilisator als Hilfe zur Benetzung der Insulinpartikel zu dispergieren. Andere Verbindungen, wie ein Verdünnungsmittel, können vor, während oder nach dem Größenverringerungsverfahren zu der Insulin/Oberflächenstabilisator-Zusammensetzung hinzugefügt werden. Die Dispersionen können im Durchlauf oder chargenweise hergestellt werden.

D. Hilfsstoffe

**[0047]** Erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen umfassen nanopartikuläre Insulinzusammensetzungen, die zusammen mit einem oder mehreren nicht-toxischen physiologisch annehmbaren Trägern, Hilfsstoffen oder Vehikeln formuliert werden, die zusammengefasst als Träger bezeichnet werden. Solche Träger können physiologisch annehmbare sterile wässrige oder nicht-wässrige Lösungen, Dispersionen, Suspensionen oder Emulsionen und sterile Pulver zum Wiederauflösen in solche Zubereitungen umfassen. Beispiele für geeignete wässrige und nicht-wässrige Träger, Verdünnungsmittel, Lösungsmittel oder Vehikel sind u.a. Wasser, Ethanol, Polyole (Propylenglykol, Polyethylenglykol, Glycerin und dergleichen), geeignete Mischungen davon, Pflanzenöle (wie Olivenöl) und injizierbare organische Ester, wie Ethyloleat. Ein geeignetes Fließvermögen kann zum Beispiel durch Verwendung eines Überzugs, wie Lecithin, durch die Aufrechterhaltung der erforderlichen Partikelgröße im Fall von Dispersionen und durch die Verwendung von oberflächenaktiven Mitteln beibehalten werden.

**[0048]** Die nanopartikulären Zusammensetzungen können auch Hilfsstoffe enthalten, wie Konservierungs-, Benetzungsmittel, Emulgatoren und Dispergiermittel. Die Verhinderung des Wachstums von Mikroorganismen kann durch verschiedene antibakterielle und fungizide Mittel sichergestellt werden, wie Kaliumsorbat, Methylparaben, Propylparaben, Benzoesäure und ihre Salze, andere Ester der Parahydroxybenzoësäure, wie Butylparaben, Alkohole, wie Ethyl- oder Benzylalkohol, phenolische Verbindungen, wie Phenol, oder quartäre Ver-

bindungen, wie Benzalkoniumchlorid, Parabene, Chlorbutanol, Phenol, Sorbinsäure und dergleichen. Es kann auch wünschenswert sein, isotonische Mittel, wie Zucker, Natriumchlorid und dergleichen, hinzuzufügen. Eine verlängerte Absorption der injizierbaren pharmazeutischen Form kann durch Verwendung von Mitteln herbeigeführt werden, welche die Absorption verzögern, wie Aluminiummonostearat und Gelatine.

**[0049]** Bei einer Ausführungsform der Erfindung sind die erfindungsgemäßen nanopartikulären Zusammensetzungen zur parenteralen Verabreichung an Menschen und Tiere auf bekannten Wegen der parenteralen Verabreichung, d.h. intravenös, intramuskulär, subkutan oder intraperitoneal, vorgesehen. Andere Dosierungsformen, wie Aerosole, Tabletten usw., können ebenfalls verwendet werden.

**[0050]** Die tatsächlichen Dosierungsspiegel der erfindungsgemäßen nanopartikulären Insulinzusammensetzungen sind als standardisierte Insulineinheiten angegeben, wie im Fall herkömmlicher Insulinzubereitungen, und die verabreichte Dosierung hängt von anerkannten Faktoren ab, wie der Zeit der Verabreichung und dem Körpergewicht, dem allgemeinen Gesundheitszustand, Alter, Geschlecht und der Ernährung des Patienten.

**[0051]** Die folgenden Beispiele werden gegeben, um die vorliegende Erfindung zu veranschaulichen. Es sollte jedoch selbstverständlich sein, dass die Erfindung nicht auf die spezifischen Bedingungen oder Details, die in diesen Beispielen beschrieben sind, beschränkt ist.

#### Beispiel 1

**[0052]** Der Zweck dieses Beispiels war es, nanopartikuläre Insulinformulierungen unter Verwendung von Niedrigenergiemahltechniken herzustellen.

**[0053]** Insulin und ein oder mehrere Oberflächenstabilisatoren wurden in den in Tabelle 1 dargestellten Mengen mit Wasser gemischt, um eine Vor-Mahl-Aufschlämmung zu bilden. Diese Aufschlämmung wurde dann in einen verschließbaren Behälter gegeben und für 1 bis 4 Tage bei einer voreingestellten Rotationsgeschwindigkeit (üblicherweise 100–200 U/min) an einer Walzenmühle unter Verwendung von Zirkoniumoxidschleifmitteln mit hohem Abrieb (Tosoh Corporation, Tokio, Japan) mit einem Durchmesser von 0,8 mm rotiert. Diese Niedrigenergiemahltechnik beruht auf Gravitationsmahl-mechanismen zur Verringerung der Partikelgröße und folglich auf der Verwendung schwerer Keramikmedien.

**[0054]** Die Partikelgrößenverteilungen der erhaltenen Insulinzusammensetzungen wurden unter Verwendung eines Horiba LA-910 Lichtstreuungs-Partikelgrößenanalysegeräts (Horiba Instruments, Irvine, CA) bestimmt. Die in Tabelle 1 gezeigten Ergebnisse wurden 24 Stunden nach dem Mahlen bestimmt. Es sollte beachtet werden, dass die Insulinkonzentration in diesem Beispiel 5% betrug, dass sie aber auch z.B. 1%, 2%, 3% oder 10% oder mehr betragen haben könnte.

**[0055]** Die verwendeten Oberflächenstabilisatoren sind u.a.: (1) Poly-(2-methacryloxyethyltrimethylammonium-bromid) (S1001); (2) quartäres Poly-(N-vinylpyrrolidon-/2-dimethylaminoethylmethacrylat)dimethylsulfat (S1002); (3) Poly-(2-methylacryloxyamidopropyltrime-thylammoniumchlorid) (S1004); (4) Pluronic® F68; (5) Hydroxypropylcellulose (HPC); (6) Natriumdesoxychol-säure; (7) mit Polyethylenglykol (PEG) derivatisiertes Vitamin E und (8) Tween® 80.

**TABELLE 1**

**Mit der Niedrigenergiekugelmühle gemahlene nanopartikuläre  
Insulinformulierungen  
(Partikelgröße 24 Stunden nach Mahlen)**

Bsp. Nr.	% Arzneistoff	% Stabilisator	Mittlere Partikelgröße 24 Stunden nach Mahlen (nm)	Partikelgröße von 90% 24 Stunden nach Mahlen (nm)
1	5,0% Insulin	0,0	4198 (1344 nach 1 min. Ultraschall)	7092 (3104 nach 1 min. Ultraschall)
2	5,0% Insulin	1% F68 0,1% Natrium-desoxy-cholsäure	165 (144 nach 1 min. Ultraschall)	266 (193 nach 1 min. Ultraschall)
3	5,0% Insulin	1% PVP k17 0,1% Natrium-desoxy-cholsäure	199 (163 nach 1 min. Ultraschall)	279 (219 nach 1 min. Ultraschall)
4	5,0% Insulin	1% PVP k29-32 0,1% Natrium-desoxy-cholsäure	243 (171 nach 1 min. Ultraschall)	364 (250 nach 1 min. Ultraschall)
5	5,0% Insulin	1% S1004	252	362
6	5,0% Insulin	1% S1001	282 (258 nach 1 min. Ultraschall)	401 (380 nach 1 min. Ultraschall)

**[0056]** Die in Tabelle 2 angegebenen Messungen wurden eine Woche nach Mahlen durchgeführt, um die Stabilität für eine repräsentative Gruppe der in Tabelle 1 gezeigten nanopartikulären Zusammensetzungen zu bestimmen. In bestimmten Fällen war die Partikelgröße der Zusammensetzung nach einer Woche kleiner als 24 Stunden nach dem Mahlen. Obwohl man sich nicht an eine Theorie binden möchte, wird angenommen, dass der Stabilisator und das Arzneistoffpartikel eine thermodynamische Entspannungszeit durchlaufen können.

**[0057]** Eine andere Theorie ist, dass es in Verbindung mit Entspannung oder unabhängig davon zu Wechselwirkungen zwischen dem Insulinpartikel und dem Stabilisator kommt. Zudem kann ein Phänomen an der Oberfläche des Insulinpartikels auftreten, das ähnlich der Verwendung kationischer Stabilisatoren zum Komplexieren und Kondensieren von DNA in Lösung ist, d.h. die Stabilisatorwechselwirkung kann eine leichte Kondensation an der Oberfläche des Insulinpartikels verursachen, wodurch sich die beobachtete Verringerung der Partikelgröße ergibt.

**TABELLE 2**

**Mit der Niedrigenergiekugelmühle gemahlene nanopartikuläre  
Insulinformulierungen  
(Partikelgröße 24 Stunden und 1 Woche nach Mahlen)**

Bsp. Nr.	% Arz-nei-stoff	% Stabili-sator	Mittlere Partikel-größe 24 Stunden nach Mahlen (nm)	Partikel-größe von 90% 24 Stunden nach Mahlen (nm)	Mittlere Partikel-größe 1 Woche nach Mahlen (nm)	Partikelgröße von 90% 1 Woche nach Mahlen (nm)
4	5,0% Insulin	1% PVP k29-32 0,1% Natrium-desoxy-cholsäure	243 (171 nach 1 min. Ultra-schall)	364 (250 nach 1 min. Ultra-schall)	212 (165 nach 1 min. Ultra-schall)	301 (222 nach 1 min Ultra-schall)
5	5,0% Insulin	1% S1004	252	362	263	364
6	5,0% Insulin	1% S1001	282 (258 nach 1 min. Ultra-schall)	401 (380 nach 1 min. Ultra-schall)	303 (266 nach 1 min. Ultra-schall)	450 (384 nach 1 min Ultra-schall)
7	5,0% Insulin	1% S1001	521	1004	498	905

## Beispiel 2

**[0058]** Der Zweck dieses Beispiels war es, nanopartikuläre Insulinformulierungen unter Verwendung von Hochenergiemahlbedingungen herzustellen.

**[0059]** Proben von Insulin wurden unter Verwendung einer Hochenergiereibmittelmühle, NanoMill™ (Elan Drug Delivery, King of Prussia, PA), hergestellt. Eine Hochenergiemühle ist derart konstruiert, dass eine wesentlich höhere Rotationsgeschwindigkeit (100–600 U/min, üblicherweise 5000 U/min) auf die partikulären Dispersionen ausgeübt wird, als sie bei Niedrigenergiemahlverfahren verwendet wird. Die erhöhte Rotationsgeschwindigkeit führt zu sehr starken Scherbedingungen in der Mahlkammer. Es ist diese Scherkraft, welche die Verringerung der Partikelgröße verursacht.

**[0060]** Die Medien, die bei dieser Mahltechnologie verwendet werden, sind viel leichtere, hoch-quervernetzte Polystyrolmedien. Zur Herstellung der in Tabelle 3 beschriebenen nanopartikulären Insulinzusammensetzungen wurden 500-µm-Medien verwendet. Andere Mediengrößen, die verwendet werden können, reichen von 50 µm bis 500 µm. Die Proben wurden von etwa 30 Minuten bis zu etwa 3 Stunden gemahlen. Die Partikelgrößenverteilungen wurden unter Verwendung eines Horiba LA-910 Lichtstreuungs-Partikelgrößenanalysegeräts (Horiba Instruments, Irvine, CA) bestimmt. Die Partikelgröße wurde für alle drei Zusammensetzungen nach

dem Mahlen, für Probe 2 24 Stunden nach dem Mahlen und für die Proben 1 und 2 1 Woche nach dem Mahlen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt.

TABELLE 3								
HOCHENERGIEGEMAHLENE NANOPARTIKULÄRE INSULINFORMULIERUNGEN								
Bsp Nr.	% Insu- lin	% Sta- bili- sator	Mitt- lere Parti- kel- größe (nm)	Par- tikel- größe von (nm) 90% bei Ernte	Mittlere Parti- kel- größe (nm) 24 Stunden bei Ernte	Parti- kel- größe (nm) 24 Stunden nach Mahlen	Mittlere Parti- kel- größe (nm) 1 Woche nach Mahlen	Partikel- größe von 90% 1 Woche nach Mahlen
1	4,0%	1%	255 S1001	378 234			297 247	436 372
2	2,5%	1%	282 S1004	381 239	284 341	382 275	232 370	329 207

**[0061]** Diese Ergebnisse zeigen die Fähigkeit, unter Verwendung von Hochenergiemahltechniken nanopartikuläre Insulinzusammensetzungen herzustellen, welche die Stabilität beibehalten und sich vielleicht nach Lagerung sogar noch verbessern. Noch wichtiger ist, dass die Ergebnisse zeigen, dass nach Lagerung wenig oder keine Agglomeration beobachtet wird. So zeigen die Daten die Fähigkeit, gleichmäßig nanopartikuläre Insulinformulierungen herzustellen, welche ihre Integrität nach der Lagerung beibehalten.

#### Beispiel 3

**[0062]** Der Zweck dieses Beispiels ist es, erfindungsgemäß hergestelltes nanopartikuläres Insulin zu untersuchen und die Stabilität der Zusammensetzungen über einen längeren Lagerungszeitraum zu testen.

**[0063]** Es wurde nanopartikuläres Insulin gemäß dem Verfahren von Beispiel 2 hergestellt. Das Mahlen erfolgte so lange, bis gefunden wurde, dass die Insulinpartikel eine mittlere Partikelgröße von 100 nm besaßen, wobei 90% der Partikel kleiner als 145 nm waren.

**[0064]** [Fig. 1](#) zeigt SEM-Aufnahmen von Insulinpartikeln vor und nach dem Mahlen, die eindeutig die Wirkung des Mahlens und, noch wichtiger, die Fähigkeit der Oberflächenstabilisatoren zeigen, die Agglomeration der Insulinpartikel zu verhindern. Die Analyse einer Probe dieses Materials, die sechs Monate bei 5°C gelagert worden war, zeigte, dass 90% der Insulinpartikel kleiner als 145 nm waren.

#### Beispiel 4

**[0065]** Der Zweck dieses Beispiels war es, den Insulingehalt einer nanopartikulären Zusammensetzung nach dem Mahlen zu bestimmen und zu ermitteln, ob das Mahlverfahren zu einem Verlust von Insulin führt.

**[0066]** Nanopartikuläres Insulin wurde gemäß dem Verfahren von Beispiel 1 aus einer Aufschlämmung von 2% Insulin mit 1 % Pluronic® F68 und 0,1 % Natriumdesoxycholsäure als Oberflächenstabilisatoren hergestellt.

**[0067]** Aliquote des nanopartikulären Insulins wurden für 15 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde isoliert und das Sediment in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Sedimente und die Überstandsfraktionen nach der Zentrifugation wurden einer Analyse auf einem SDS-PAGE-Gel unterzogen. Rohinsulin in PBS, das zusätzlich 0,1 M HCl für die Stabilität enthielt, (SIGMA I-5500) diente als Kontrolle.

**[0068]** Die bei der Analyse verwendeten reduzierenden Gele wurden als 16%ige Acrylamidgele hergestellt und umfassten 5,33 ml Acrylamidlösung, 2,02 ml destilliertes Wasser, 2,50 ml 1,5 M TRIS-Puffer bei pH 8,8, 100 µm 10% SDS, 50 µm 10% Ammoniumpersulfat sowie 5 µm TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin). Reduzierende Gele eignen sich zum Sichtbarmachen von Insulinbanden, die als Dimer, Tetramer usw. erscheinen, und zur Identifikation von abgebauten Insulinfragmenten.

**[0069]** Die Zusammensetzung des Laufpuffers und der Auftragspuffer waren wie folgt:

5x Elektrodenpuffer	Probenauftragspuffer
(1X = 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3)	(reduzierender SDS Puffer: 62,5 mM Tris HCl (pH 6,8), 20% Glycerin, 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol)
Tris-Base 37,5 g	Destilliertes Wasser 3,0 ml
Glycin 180,0 g	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 1,0 ml
SDS 12,5 g	Glycerin 1,6 ml
Destilliertes Wasser 2,5 l	10% SDS 1,6 ml
Vor Gebrauch 200 ml der 5X-Stammlösung mit 800 ml destilliertem Wasser verdünnen.	β-Mercaptoethanol 0,4 ml 0,5% (w/v) Bromphenolblau 0,4 ml (in Wasser)

**[0070]** Die Proben und der Überstand wurden mit Probenpuffer 1:10 bzw. 1:50 verdünnt und dann vor dem Laden auf das Gel für 5 min auf 95°C erhitzt. Das aufgetragene Überstandvolumen war die Menge, die benötigt würde, um die erforderliche Probenmenge aufzutragen, wenn das Insulin in Suspension verblieben wäre.

**[0071]** Es wurden zwei reduzierende Gele hergestellt, und die Proben wurden auf die Gele aufgetragen, so dass die Sediment- und Überstandsfraktionen von jeder Probe nebeneinander beobachtet werden konnten. Die Ergebnisse sind in [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) gezeigt.

**[0072]** Das in [Fig. 2](#) gezeigte reduzierende Gel wurde mit Folgendem beladen:

Spur 1: Rohinsulinprobe  
Spur 2: Probenüberstand 1:50 Verdünnung;  
Spur 3: Probenüberstand 1:10 Verdünnung;  
Spur 4: Sedimentprobe 1:50 Verdünnung;  
Spur 5: Sedimentprobe 1:10 Verdünnung und  
Spur 6: Hochmolekulargewichtsmarker.

**[0073]** Das in [Fig. 3](#) gezeigte reduzierende Gel wurde mit Folgendem beladen:

Spur 1: Hochmolekulargewichtsmarker;  
Spur 2: Sedimentprobe 1:10 Verdünnung;  
Spur 3: Sedimentprobe 1:50 Verdünnung;  
Spur 4: Rohinsulinprobe und  
Spur 5: Rohinsulinprobe.

**[0074]** Die in [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) gezeigten Gele zeigen, dass die Sedimentfraktion der gemahlenen Insulinformulierung das gesamte Insulin enthält. Die Spuren, in denen Überstand aufgetragen wurde, scheinen frei von

Insulin zu sein. Dies deutet darauf hin, dass das gesamte Insulin in der nanopartikulären Insulinzusammensetzung innerhalb der nanopartikulären Zusammensetzung gefangen oder damit verbunden ist, wobei wenig oder kein Insulin frei in Lösung auftritt. Somit liegt im Wesentlichen 100%iges Einfangen oder Verbinden des Insulins innerhalb der nanopartikulären Zusammensetzung vor.

#### Beispiel 5

**[0075]** Der Zweck dieses Beispiels war es, die Wirksamkeit der parenteral verabreichten nanopartikulären Insulinzusammensetzungen zu testen und die Wirksamkeit der Formulierungen mit herkömmlichen Rohinsulinzusammensetzungen zu vergleichen.

**[0076]** Alle Tiere (Wistar-Ratten) wurden gewogen, und man ließ sie für vor Beginn der Studie 4 Stunden hungrig. Die Ratten (250–300 g) wurden mittels intramuskulärer (IM) Verabreichung einer Lösung von Ketamin (22,5 mg/Tier) und Acepromazin (0,75 mg/kg) eine Stunde vor Verabreichung der Testlösungen anästhetisiert. Die Probe des nanopartikulären Insulins, die gemäß dem Verfahren von Beispiel 1 aus einer Aufschämmung von 2% Insulin mit 1 % Pluronic® F68 und 0,1 % Natriumdesoxycholsäure als Oberflächenstabilisatoren hergestellt worden war, wurde als Lösung in PBS (phosphatgepufferter Kochsalzlösung) pH 7,4 formuliert. Gruppen von 6 Tieren erhielten in einer randomisierten Nicht-Überkreuzstudie mittels subkutaner, intramuskulärer oder intraperitonealer Injektion eine Menge der Lösung, die ausreichte, um eine IU Insulin bereitzustellen. Die Blutglucosewerte für die Ratten wurden unter Verwendung eines Accutren®-alpha-Glucometers (Boehringer Mannheim) anhand systemischer Blutproben gemessen, die aus der Schwanzarterie entnommen wurden. Eine Grundlinien-Blutprobe wurde entnommen, und Proben wurden in Zeitabständen bis zu vier Stunden nach der Injektion entnommen. Die Anästhesie wurde während der gesamten Studie aufrechterhalten. Eine nicht-formulierte Insulinlösung wurde als Referenz verwendet.

**[0077]** Das verwendete Rattenmodell ist ein hyperglykämisches Modell. Die pharmakokinetischen Parameter des Tests sind in [Fig. 4](#) gegeben. Aus den Ergebnissen in [Fig. 4](#) ist ersichtlich, dass die erfindungsgemäßen Insulinzusammensetzungen biologisch aktiv und mindestens annähernd gleich zur Referenz-Insulinlösung sind. [Fig. 5](#) zeigt den AUC ( $\mu\text{U}/\text{ml} \cdot \text{Std.}$ ) für die Probe bei den drei Arten der parenteralen Verabreichung im Vergleich zur Referenz-Insulinlösung. Die in [Fig. 5](#) gezeigte Analyse zeigt ebenfalls die Gleichwertigkeit der Testzubereitung mit der Referenz-Insulinlösung.

**[0078]** Die [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) sind dahingehend zusammengehörige Konzentration-Zeit-Profile, dass [Fig. 6](#) die mittlere Glucosekonzentration darstellt, während [Fig. 7](#) die mittlere Insulinkonzentration veranschaulicht. Wie vorstehend beschrieben, stellen beide die über subkutane, intramuskuläre und intraperitoneale Injektion verabreichte Testprobe im Vergleich zu einer Referenz-Insulinzubereitung dar. Wenn eine Insulin-zubereitung biologisch aktiv ist, wird erwartet, dass ein Absinken der Blutglucosespiegel mit einem Anstieg in den Blutinsulinspiegeln zusammenfällt. Die Profile in [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) zeigen deutlich, dass die erfindungsgemäßen nanopartikulären Insulinformulierungen biologisch aktiv sind.

**[0079]** Insgesamt zeigen die in den Figuren dargestellten Ergebnisse, dass die erfindungsgemäßen nanopartikulären Insulinzusammensetzungen eine ausgezeichnete biologische Aktivität nach parenteraler Verabreichung zeigen, die mindestens äquivalent zu der getesteten Referenz-Insulinlösung ist. Aus der in [Fig. 8](#) dargestellten graphischen Darstellung der Änderung des Blutglucosespiegels ist ersichtlich, dass die erfindungsgemäße nanopartikuläre Zubereitung verglichen mit der Referenz-Insulinlösung hinsichtlich der Beibehaltung einer Absenkung des Blutglucosespiegels über die Testdauer vorteilhaft ist. Ein besonderer Vorteil lässt sich aus dem Vergleich über die intraperitoneale Verabreichung ersehen.

#### Patentansprüche

1. Eine nanopartikuläre Zusammensetzung umfassend Insulinpartikel und mindestens einen nicht-quervernetzten Oberflächenstabilisator, der an ihrer Oberfläche adsorbiert ist, wobei die Insulinpartikel eine effektive durchschnittliche Partikelgröße von weniger als circa 5 Mikron haben.
2. Die Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei die effektive durchschnittliche Partikelgröße der Insulinpartikel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus weniger als circa 4 Mikron, weniger als circa 3 Mikron, weniger als circa 2 Mikron, weniger als circa 1500 nm, weniger als circa 1 Mikron, weniger als circa 800 nm, weniger als circa 700 nm, weniger als circa 600 nm, weniger als circa 500 nm, weniger als circa 400 nm, weniger als circa 300 nm, weniger als circa 200 nm, weniger als circa 100 nm, weniger als circa 75 nm und weniger als circa 50 nm.

3. Die Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die Konzentration des Insulins und/oder des mindestens einen Oberflächenstabilisators ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus von etwa 99,5% bis etwa 0,001%, von etwa 95% bis etwa 0,1% und von etwa 90% bis etwa 0,5% vom Gewicht, ausgehend vom gesamten kombinierten Trockengewicht der Insulinpartikel und des mindestens einen Oberflächenstabilisators, nicht umfassend andere Hilfsstoffe.

4. Die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Zusammensetzung weiterhin einen oder mehrere pharmazeutisch zulässige Hilfsstoffe, Träger, oder eine Kombination davon umfasst.

5. Die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Zusammensetzung zur Verabreichung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus oraler, pulmonaler, nasaler, parenteraler, rektaler, lokaler, bukkaler und topischer Verabreichungen, formuliert ist.

6. Die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Insulin in einer Form ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus kristallinen Partikeln, semi-kristallinen Partikeln, semi-amorphen Partikeln, amorphen Partikeln, und einer Mischung davon, vorliegt.

7. Die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, weiterhin umfassend mindestens zwei Oberflächenstabilisatoren.

8. Die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der mindestens eine Oberflächenstabilisator ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem nichtionischen Oberflächenstabilisator, einem anionischen Oberflächenstabilisator, einem kationischen Oberflächenstabilisator und einem ionischen Oberflächenstabilisator.

9. Die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der mindestens eine Oberflächenstabilisator ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Cetylpyridiniumchlorid, Gelatine, Casein, Phosphatide, Dextran, Glycerin, Akaziengummi, Cholesterin, Tragant, Stearinsäure, Stearinsäureester und Salze, Calciumstearat, Glycerinmonostearate, Cetylstearylalkohol, Cetylmacrogol Emulsifying Wax, Sorbitanester, Polyoxyethylenalkylether, Polyoxyethylenricinusöl-Derivate, Polyoxyethylensorbitanfettsäureester, Polyethylenglykol, Dodecytrimethylammoniumbromid, Polyoxyethylenstearate, kolloidales Siliciumdioxid, Phosphate, Natriumdodecylsulfat, Calciumcarboxymethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose, Methylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose-Phthalsäureester, nicht-kristalline Cellulose, Magnesiumaluminiumsilicat, Triethanolamin, Polyvinylalcohol, Polyvinylpyrrolidon, 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol-Polymer mit Ethylenoxid und Formaldehyd, Poloxamer, Poloxamine, ein geladenes Phospholipid, Dimyristoylphosphatidylglycerin, Diocylsulfosuccinat, Dialkylester der Natriumsulfobornsteinsäure, Natriumlaurylsulfat, Alkylarylpolyethersulfonate, Mischungen von Saccharosestearat und Saccharosedistearat, Triblockcopolymeren der Struktur: -(PEO)--(PBO)-(PEO)-, p-Isononylphenoxypoly-(glycidol), Decanoyl-N-methylglucamid; n-Decyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, n-Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid, n-Dodecyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, Heptanoyl-N-methylglucamid, n-Heptyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, n-Heptyl- $\beta$ -D-thioglucosid, n-Hexyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, Nonanoyl-N-methylglucamid, n-Nonyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, Octanoyl-N-methylglucamid, n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, Octyl- $\beta$ -D-thioglucopyranosid, Lysozym, ein PEG derivatisiertes Phospholipid, PEG derivatisiertes Cholesterin, ein PEG derivatisiertes Cholesterinderivat, PEG derivatisiertes Vitamin A, PEG derivatisiertes Vitamin E, und Random-Copolymere von Vinylacetat, Vinylpyrrolidon, kationische Lipide, Benzalkoniumchlorid, Sulfoniumverbindungen, Phosphoniumverbindungen, quartäre Ammoniumverbindungen, Benzylid(2-chlorethyl)ethylammoniumbromid, Cocosnustrimethylammoniumchlorid, Cocosnustrimethylammoniumbromid, Cocosnussmethyldihydroxyethylammoniumchlorid, Cocosnussmethyldihydroxyethylammoniumbromid, Decyltriethylammoniumchlorid, Decyldimethylhydroxyethylammoniumchlorid, Decyldimethylhydroxyethylammoniumchloridbromid, C<sub>12-15</sub>-Dimethylhydroxyethylammoniumchlorid, C<sub>12-15</sub>-Dimethylhydroxyethylammoniumchloridbromid, Cocosnussdimethylhydroxyethylammoniumchlorid, Cocosnussdimethylhydroxyethylammoniumbromid, Myristyltrimethylammoniummethylsulfat, Lauryldimethylbenzylammoniumchlorid, Lauryldimethylbenzylammoniumbromid, Lauryldimethyl(ethenoxy)<sub>4</sub>-ammoniumchlorid, Lauryldimethyl(ethenoxy)<sub>4</sub>-ammoniumbromid, N-Alkyl-(C<sub>12-18</sub>)-dimethylbenzylammoniumchlorid, N-Alkyl-(C<sub>14-18</sub>)-dimethylbenzylammoniumchlorid, N-Tetradecylidimethylbenzylammoniumchloridmonohydrat, Dimethyldodecylammoniumchlorid, N-Alkyl- und (C<sub>12-14</sub>)-dimethyl-1-naphthylmethylammoniumchlorid, Trimethylammoniumhalid, Alkyltrimethylammoniumsalze, Dialkyl-dimethylammoniumsalze, Lauryltrimethylammoniumchlorid, ethoxyliertes Alkyamidoalkyldialkylammoniumsalz, ein ethoxyliertes Trialkylammoniumsalz, Dialkylbenzoldialkylammoniumchlorid, N-Didecyldimethylammoniumchlorid, N-Tetradecylidimethylbenzylammoniumchlorid-monohydrat, N-Alkyl-(C<sub>12-14</sub>)-dimethyl-1-naphthylmethylammoniumchlorid, Dodecyldimethylbenzylammoniumchlorid, Dialkylbenzolalkylammo-

numchlorid, Lauryltrimethylammoniumchlorid, Alkylbenzylmethyldimethylammoniumbromid, C<sub>12</sub>-Trimethylammoniumbromide, C<sub>15</sub>-Trimethylammoniumbromide, C<sub>17</sub>-Trimethylammoniumbromide, Dodecylbenzyltriethylammoniumchlorid, Polydiallyldimethylammoniumchlorid (DADMAC), Dimethylammoniumchloride, Alkyldimethylammoniumhalogenide, Tricetyltrimethylammoniumchlorid, Decyltrimethylammoniumbromid, Dodecyltriethylammoniumbromid, Tetradecyltrimethylammoniumbromid, Methyltriocetylammoniumchlorid, POLYQUAT 10<sup>TM</sup>, Tetrabutylammoniumbromid, Benzyltrimethylammoniumbromid, Cholinester, Benzalkoniumchlorid, Stearalkoniumchlorid- Verbindungen, Cetylpyridiniumbromid, Cetylpyridiniumchlorid, Halogenidsalz von quaternisierten Polyoxyethylalkylaminen, MIRAPOL<sup>TM</sup>, ALKAQUAT<sup>TM</sup>, Alkylpyridiniumsalze; Amine, Aminsalze, Aminoxide, Imidazoliniumsalze, protonierte quartäre Acrylamide, methylierte quartäre Polymere, kationischer Guar, Polymethylmethacrylat-trimethylammoniumbromid, Polyvinylpyrrolidon-2-dimethylaminoethylmethacrylatdimethylsulfat, Hexadecyltrimethylammoniumbromid, Poly-(2-methacryloxyethyltrimethylammoniumbromid) (S1001), quartäres Poly(N-vinylpyrrolidon/2-dimethylaminoethylmethacrylat)-di-methylsulfat (S1002), und Poly-(2-methylacryloxyamidopropyltrimethylammoniumchlorid) (S1004).

10. Die Zusammensetzung gemäß Anspruch 8, wobei der kationische Oberflächenstabilisator ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Polymer, einem Biopolymer, einem Polysaccharid, einer Cellulose, einem Alginat, einer nicht-polymeren Verbindung, und einem Phospholipid.

11. Die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Verwendung in der Therapie.

12. Eine Dosierungsform umfassend die nanopartikuläre Insulinzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Dosierungsform eine feste, halbfeste oder flüssige Dosierungsformulierung ist.

13. Eine Dosierungsform umfassend die nanopartikuläre Insulinzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Dosierungsform ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Formulierungen für die kontrollierte Freisetzung, schnell schmelzenden festen Dosierungsformulierungen, Aerosolformulierungen, lyophilisierten Formulierungen, Tabletten, festen Lutschtabletten, Kapseln, Pulvern und Flüssigkeiten zur Injektion.

14. Eine pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen Verabreichung umfassend die nanopartikuläre Insulinzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 oder die Dosierungsform der Ansprüche 12 oder 13 und einen geeigneten, pharmazeutisch zulässigen Hilfsstoff.

15. Ein Verfahren zur Herstellung der nanopartikulären Insulinzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 umfassend das In-Kontakt-Bringen der Insulinpartikel mit mindestens einem Oberflächenstabilisator für eine Zeit und unter Bedingungen die ausreichend sind, um eine nanopartikuläre Insulinzusammensetzung mit einer effektiven durchschnittlichen Partikelgröße von weniger als circa 5 Mikron bereitzustellen.

16. Das Verfahren gemäß Anspruch 15, wobei das genannte In-Kontakt-Bringen das Mahlen umfasst.

17. Das Verfahren gemäß Anspruch 15, wobei das genannte In-Kontakt-Bringen die Homogenisierung umfasst.

18. Das Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei das genannte Mahlen das Hochenergiemahlen und das Nassmahlen umfasst.

19. Verwendung einer nanopartikulären Insulinformulierung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Insulintherapie.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

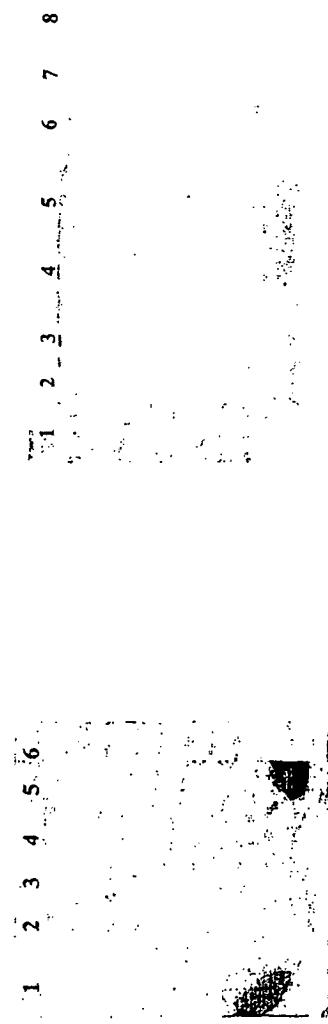
FIGUR 1

SEM-Bilder (Vergrößerungx5000)

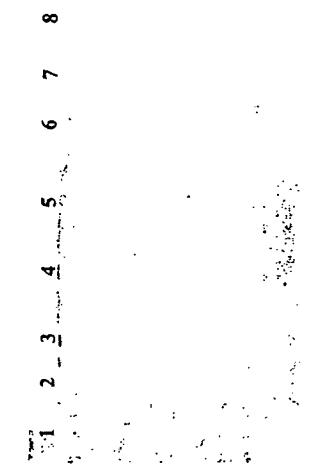


nach Mahlen  
vor Mahlen

Figur 2



Figur 3



Reduzierendes Gel 1

Spur 1: Rohinsulin  
Spur 2: Nano-Insulin-Überstand 1:50  
Spur3: Nano-Insulin-Überstand 1:10  
Spur4: Nano-Insulin-Probe 1:50  
Spur5: Nano-Insulin-Probe 1:10  
Spur6: Hochmolekulargewichtsmarker

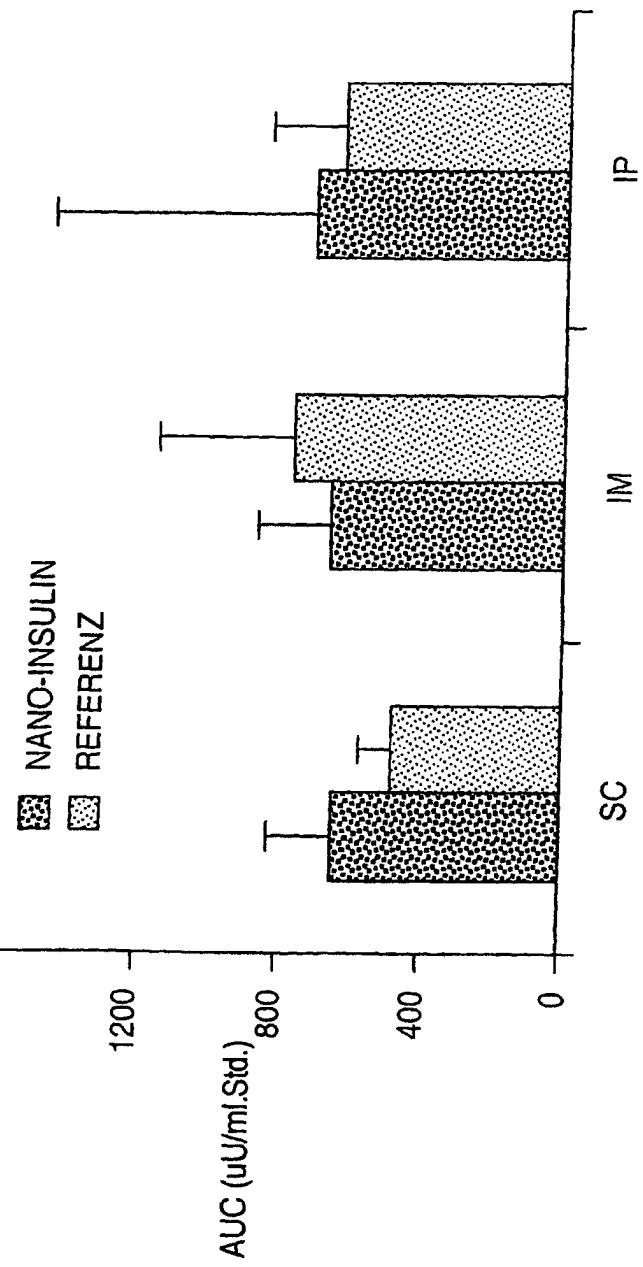
Reduzierendes Gel 2

Spur 1: Hochmolekulargewichtsmarker  
Spur2: Nano-Insulin-Sediment 1:10  
Spur 3: Nano-Insulin-Sediment 1:50  
Spur 4: Rohinsulin-Probe  
Spur5: Rohinsulin -Probe  
Spur 6: leer  
Spur 7: leer  
Spur 8: leer

**FIG. 4**  
PHARMAKOKINETISCHE PARAMETER VON NANO-INSULIN

INJEKTIONSWEG	NANO-INSULIN	INSULINLÖSUNG
INTRAMUSKULÄR		
• AUC (uU/ml.Std.)	660 +/- 217	763 +/- 383
• Cmax (uU/ml)	569 +/- 136	664 +/- 175
• Tmax (Std.)	0,4 +/- 0,1	0,8 +/- 0,6
SUBKUTAN		
• AUC (uU/ml.Std.)	645 +/- 191	487 +/- 89
• Cmax (uU/ml)	453 +/- 129	417 +/- 79
• Tmax (Std.)	0,5 +/- 0,2	0,3 +/- 0,1
INTRAPERITONEAL		
• AUC (uU/ml.Std.)	720 +/- 745	639 +/- 216
• Cmax (uU/ml)	655 +/- 799	390 +/- 113
• Tmax (Std.)	1,5 +/- 1,4	0,6 +/- 0,1

**FIG. 5**  
VERGLEICH DER AUC VON NANO-INSULIN  
VS. INSULINLÖSUNG (REFERENZ)



**FIG. 6**

INSULINSPIEGEL IM BLUT NACH VERABREICHUNG VON  
NANO-INSULIN (■) VS. INSULIN LÖSUNG (◆)

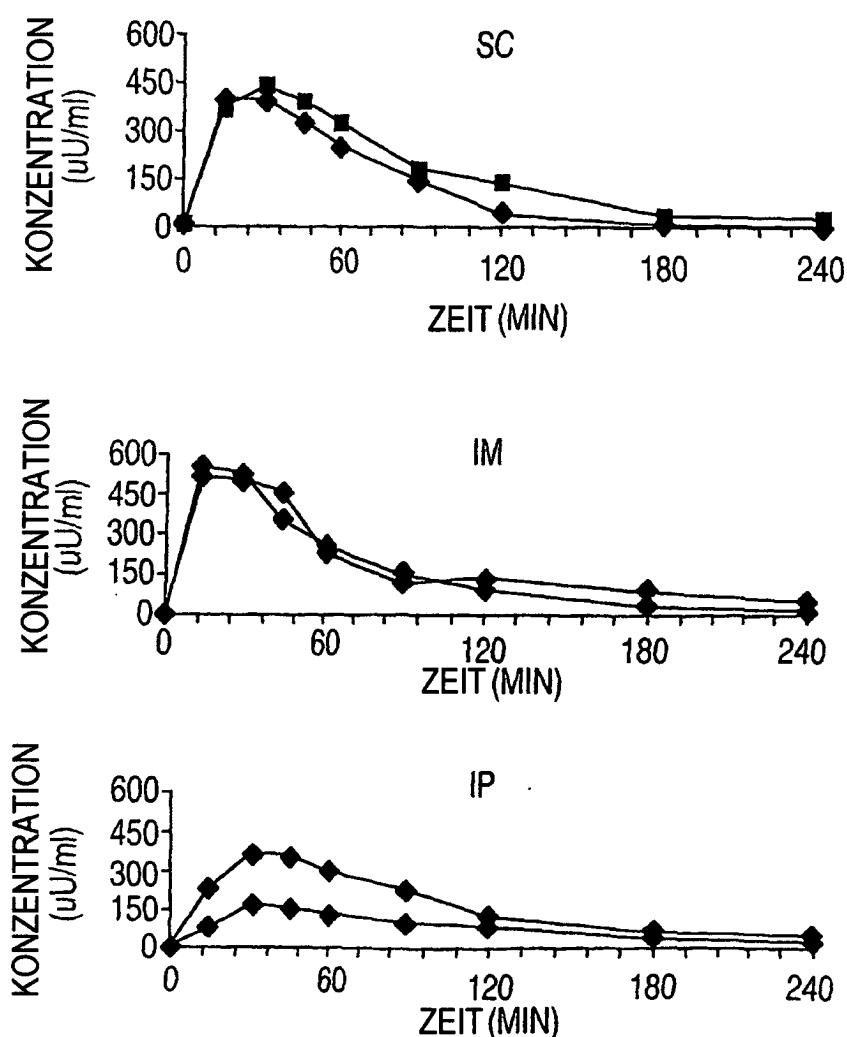


FIG. 7

BLUTGLUCOSESPIEGEL NACH VERABREICHUNG VON  
NANO-INSULIN (■); INSULINLÖSUNG (▲); KONTROLLE-KEIN INSULIN (◆)

