DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Ausschließungspatent

(19) DD (11) 266 964 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) A 61 K 37/26

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP A 61 K / 308 078 0	(22)	19.10.87	(44)	19.04.89
(31)	5033/86	(32)	20.10.86	(33)	DK
	3569/87		10 07.87		

(71) siehe (73)
(72) Joergensen, Klavs H., DK
(73) Novo Industri A/S, Bagsvaerd, DK
(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Insulinlösungen

(55) Gehalt an Magnesiumionen, Zinkionen, Protamin, schnell einsetzende Wirkung, verbesserte therapeutische Eigenschaften, Behandlung von Diabetes

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Insulinlösungen. Erfindungsgemäß werden Insulinlösungen für die parenterale Verabreichung mit verbesserten therapeutischen Eigenschaften, die mindestens 20 Insulineinheiten je ml enthalten und aus einer Lösung von Insulin oder einem Derivat davon und Magnesiumionen in einer im Bereich von etwa 0,005 bis 0,5 M liegenden Magnesiumkonzentration bestehen, wobei die Lösung einen *p*H-Wert im Bereich von 3 bis 8,5, vorzugsweise unter 8, aufweist und wahlweise ein verzögernd wirkendes Präzipitat von Insulin oder einem Derivat davon enthält, in der Weise hergestellt, daß ein Magnesiumsalz, Insulin oder ein Insulinderivat und Wasser in angemessenen Mengen vermischt werden und, wenn erforderlich, der *p*H-Wert eingestellt wird.

ISSN 0433-6461

26 Seiten

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Insulinlösungen für die parenterale Verabreichung, die mindestens 20 Insulineinheiten je ml enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß ein Magnesiumsalz, Insulin oder ein Insulinderivat und Wasser in angemessenen Mengen vermischt werden und, wenn erforderlich, der pH-Wert eingestellt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lösung von Insulin oder einem Derivat davon und Magnesiumionen in einer im Bereich von etwa 0,005 bis 0,5 M liegenden Magnesiumkonzentration, wobei die Lösung einen pH-Wert im Bereich von 3 bis 8,5, vorzugsweise unter 8, aufweist und wahlweise ein verzögernd wirkendes Präzipitat von Insulin oder einem Derivat davon vermischt werden.

3. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Insulinlösung einen im Bereich von etwa 4 bis etwa 6,2 liegenden pH-Wert aufweist und vorzugsweise eine Magnesiumkonzentration von über etwa 0,05 M hat.

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Magnesiumkonzentration der Insulinlösung über etwa 0,01 M, vorzugsweise über etwa 0,05 M und am besten im Bereich von 0,08 M bis 0,3 M liegt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Insulinlösung eine Aktivität im Bereich von unter etwa 500 Insulineinheiten je ml, vorzugsweise von etwa 30 bis 200 Insulineinheiten je ml, und am besten von etwa 40 bis 100 Insulineinheiten je ml hat.

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der Insulinlösung im Bereich von etwa 5 bis 6 liegt.

7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Insulinlösung Zink und/oder Protamin enthält.

8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Insulinlösung weniger als etwa 1 Zinkion je Hexamer Insulin oder Insulinderivat, vorzugsweise weniger als etwa 0,5 Zinkionen je Hexamer Insulin oder Insulinderivat und am besten weniger als etwa 0.1 Zinkionen je Hexamer Insulin oder Insulinderivat enthält.

9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Insulinlösung rasch wirkend ist.

10. Verfahren nach den vorstehenden Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, daß die Insulinlösung mehr als etwa 5 % (Masse/Masse), vorzugsweise mehr als etwa 10 %, Protamin in bezug auf den Gehalt von Insulin oder Insulinderivat, und vorzugsweise weniger als etwa 50 % Protamin, am besten weniger als 40 % Protamin, unter der Voraussetzung enthält, daß der pH-Wert unter 6,2 liegt.

266964

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Insulinlösungen für die Behandlung von Diabetes.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Für die Behandlung von Diabetes eingesetzte Insulinpräparate enthalten Insulin sowohl in Lösungen als auch Suspensionen. Die Insulinsuspensionen, alle mit verzögerter Wirkung, besitzen um etwa 7 liegende pH-Werte. Die Insulinlösungen haben entweder bei etwa 3 (schnellwirkende sowie auch verzögert-wirkende Lösungen) oder bei etwa 7 (nur schnell-wirkende Lösungen) liegende pH-Werte.

Der Grund für die Differenz zwischen den beiden pH-Wert-Intervallen von Insulinlösungen liegt in der geringen Wasserlöslichkeit von Insulin in der Nähe seines isoelektrischen pH-Wertes (annähernd 5,3) sowohl beim Fehlen von Zinkionen (Tanford und Epstein: J. Am. Chem. Soc. 76 (1954), 2163 - 69, Fig. 1) als auch beim Vorhandensein von Zinkionen (Fredericq und Neurath: J. Am. Chem. Soc., 72 (1950), 2684 - 91, Fig. 4).

Die sauren Insulinlösungen werden heute wegen des Abbaues von Insulin durch Desamidierung nicht so umfassend angewandt wie zu Beginn der Insulinepoche.

Insulin-Präparate sind beispielsweise aus folgenden Veröffentlichungen bekannt:

Die DK-PS Nr. 63 000 betrifft Präparate, die Suspensionen von Komplexen enthalten, die aus Insulin, Verzögerungsmitteln

(z. B. Protamin) und Magnesiumionen bei pH-Werten von 6,5 bis 7 bestehen, wobei die angeführten Magnesiumkonzentrationen unter 0,004 M liegen.

Die US-PS 4.196.196 befaßt sich mit einer Zusammensetzung zur Erhöhung der vaskulären Perfusion und Reperfusion bei Krankheitszuständen, wobei die Zusammensetzung aus Glucose, Insulin und Magnesiumdikaliummethylendiamintetraessigsäure besteht. Bei diesem Beispiel enthält das bekannte Präparat 0,02 Insulineinheiten pro ml.

Die US-PS 4.472.385 betrifft die Stabilisierung von Zink-Insulin-Lösungen bei pH-Werten von 7 bis 8, wobei die verbesserte Stabilität durch die Zugabe von etwa 0,0004 bis 0,01 M Calcium- oder Magnesiumionen erreicht wird. Die obere Grenze für die Magnesiumkonzentration liegt in den bekannten Beispielen bei 0,002 M.

Die Gegenstände der drei oben genannten Patente liegen außerhalb des Geltungsbereiches dieser Erfindung.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung von Insulinlösungen mit verbesserten therapeutischen Eigenschaften.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Insulinlösungen mit verbesserten therapeutischen Eigenschaften, insbesondere für die perenterale Anwendung zur Verfügung zu stellen.

Die Erfindung basiert auf den folgenden überraschenden Erkenntnissen:

1) Lösungen, die Insulin in therapeutisch relevanten Konzentrationen enthalten, können mit Konzentrationen von Magnesiumionen von etwa 0,05 bis 0,5 Mol/Liter im pH-Wertbereich von etwa 4 bis 6,2, d. h. annähernd dem isoelektrischen Punkt von Insulin, hergestellt werden.

2) In dem pH-Wertbereich von etwa 3 bis 4, der wegen der chemischen Unbeständigkeit bei Insulin unangebracht ist, können brauchbare Lösungen von Insulinderivaten in Gegenwart von Magnesiumionen in Konzentrationen von etwa 0,005 bis 0,5 M hergestellt werden, unter der Voraussetzung, daß Asn^{A21} durch einen keine Amidogruppe enthaltenden Aminosäurerest substituiert wird.

3) Auch im pH-Wertbereich von etwa 6,2 bis 8,5 können brauchbare Lösungen, die wahlweise ein Insulinpräzipitat enthalten, unter Einbeziehung von Magnesiumionen in Konzentrationen von etwa 0,005 bis 0,5 M hergestellt werden.

Die erfindungsgemäßen Präparate besitzen Eigenschaften, die denen der bisher üblichen Insulinpräparate überlegen sind.

Zu 1) ist zu sagen, daß jetzt überraschenderweise gefunden wurde, daß viele Magnesiumsalze, z. B. Magnesiumchlorid, bei pH-Werten von etwa 4 bis 6 eine Solubilisierungswirkung auf Insulin ausüben, sowohl an sich als auch im Vergleich zu den entsprechenden Natrium-, Kalium- und Ammoniumsalzen (siehe das unten angeführte Beispiel 1). Verschiedene Mischungen von Magnesiumsalzen ergeben die gleiche Wirkung. Man zieht daher die Schlußfolgerung, daß das Vorhandensein von Magnesiumionen in bestimmten Konzentrationen einen kritischen Parameter für die Löslichkeit von Insulin bei pH-Werten von etwa 4 bis 6,2 darstellt.

Unter der Bezeichnung Magnesiumionen sollen sowohl freie als auch gebundene Magnesiumionen zu verstehen sein.

Weiter wurde überraschend ermittelt, daß Protamin in die erfindungsgemäßen Insulinlösungen mit pH-Werten von etwa 4 bis 6,2 einbezogen werden kann, ohne daß der Protamin-Insulin-Komplex

Präzipitation aufweist. Nach der Einstellung des pH-Wertes auf etwa 7 fällt ein derartiger Komplex aus.

Durch Calciumionen wird die Löslichkeit von Insulin im pH-Wertbereich von etwa 4 bis 6,2 gleichfalls erhöht. Allerdings zeigen die Ergebnisse von in vitro Versuchen unter simulierten physiologischen Bedingungen, daß die Injektion einer Calciumionen enthaltenden Lösung in Gewebe zur Präzipitation von Calciumcarbonat und Calciumphosphat selbst bei weit unter 0,05 M liegenden Calciumkonzentrationen führt. Andere Versuche haben ergeben, daß die Präzipitation entsprechender Magnesiumverbindungen nach der Injektion von erfindungsgemäßen Lösungen nicht stattfindet. Da die Präzipitation von Calciumverbindungen in Geweben schädlich sein kann (wegen der Gefahr der künstlichen Calcifizierung), sollte der Gehalt an freien Calciumionen in den erfindungsgemäßen Präparaten nicht wesentlich über dem liegen, der dem Calciumgehalt in extrazellulären Flüssigkeiten entspricht. Die erfindungsgemäßen Präparate enthalten vorzugsweise weniger als etwa 10 mM Calciumionen, noch besser weniger als etwa 2 mM Calciumionen. So weit dem Erfinder bekannt ist, werden in den dem bisherigen Stand der Technik entsprechenden Veröffentlichungen, die sich auf Magnesiumionen enthaltende Insulinlösungen beziehen, der pH-Wertbereich von 4 bis 6,2 oder Magnesiumionenkonzentrationen von 0,005 bis 0,5 Mol/Liter nicht erwähnt.

Erfindungsgemäß können Magnesiumionen in dem oben beschriebenen Konzentrationsbereich zu einer Lösung von Insulin oder einem Insulinderivat gegeben werden, wobei die Lösung, wenn verlangt, außerdem ausgefälltes Insulin oder ein ausgefälltes Insulinderivat mit verzögerter Wirkung enthält. Zum Zwecke der subkutanen Verabreichung werden Magnesiumionen zugesetzt, um

eine Lösung mit einem schnelleren Einsetzen der Wirkung oder, wenn die Lösung Protamin enthält, mit einer verzögerten Wirkung zu erhalten. Wenn die erfindungsgemäße Zusammensetzung auch ausgefälltes Insulin oder ausgefälltes Insulinderivat enthält, kann ein zweiphasiges Präparat gewonnen werden. Im Vergleich mit den bekannten zweiphasigen Insulinpräparaten bewirken die erfindungsgemäßen zweiphasigen Präparate ein rascheres Einsetzen der den Blutzucker senkenden Wirkung. Beispiele für ausgefälltes Insulin sind Zinkinsulinkristalle und Protamin-Zinkinsulinkristalle.

Die Erfindung betrifft daher Insulinlösungen, die wahlweise ein Insulinpräzipitat enthalten können, für die parenterale Verabreichung mit einem im Bereich von etwa 3 bis 8,5 liegenden pH-Wert und einem Gehalt an Magnesiumionen im Konzentrationsbereich von etwa 0,005 bis 0,5 Mol. Die Konzentration von gelöstem Insulin kann im Bereich von etwa 20 bis 500 Insulineinheiten pro ml liegen.

Im Fachgebiet bekannte Stabilisierungs- und Konservierungsmittel können in dem Insulinpräparat vorhanden sein.

Protamin kann vorhanden sein, möglichst von 8 bis 40 % (Masse/Masse) in bezug auf die Masse von Insulin, wobei 10 bis 30 % (Masse/Masse) ein bevorzugter Bereich ist.

Wenn in den erfindungsgemäßen Insulinlösungen keine Verzögerungssubstanzen vorhanden waren, dann erfolgte die Absorption von Insulin überraschenderweise schneller als die des Bezugsinsulins (siehe die folgenden Beispiele 2 bis 9 und 11). Diese Eigenschaft ist für ein rasch wirkendes Insulin von Vorteil, vor allem in Verbindung mit einer mehrmaligen Injektionsform.

bei der Insulin vor jeder Mahlzeit verabreicht wird. Bei schneller einsetzender Wirkung kann das Insulin entsprechend kürzer vor dem Essen als bei herkömmlichen schnell-wirkenden Insulinlösungen verabreicht werden. Außerdem wird durch das schnellere Verschwinden von Insulin möglicherweise die Gefahr von Hyperglycämie nach dem Essen verringert.

Erfindungsgemäße Insulinlösungen mit einem im Bereich von 3 bis 6,2 liegenden pH-Wert können sich auch als besonders brauchbar für Infusionszwecke mit Hilfe von Pumpen erweisen, weil die Möglichkeit einer durch Kohlendioxiddiffusion durch Katheder verursachten Insulinpräzipitation ausgeschlossen wird. Eine derartige Präzipitation ist gelegentlich bei neutralen Infusionslösungen beobachtet worden, und es wird angenommen, daß sie auf eine durch Kohlendioxid hervorgerufene Senkung des pH-Wertes zurückzuführen ist.

Erfindungsgemäße Insulinlösungen, die über etwa 5 %, vorzugsweise über etwa 8 % und am besten über etwa 10 % (Masse/Masse) Protamin auf der Basis von Insulin enthalten, zeigen eine verzögerte Absorption von Insulin nach der subkutanen Injektion bei Schweinen im Vergleich zu dem Bezugsinsulin (siehe die folgenden Beispiele 4 und 5). Vorzugsweise liegt der Gehalt an Protamin unter etwa 50 %, möglichst unter etwa 40 % und am besten unter etwa 30 % (Masse/Masse). Erfindungsgemäße Protamin-Insulin-Präparate haben gegenüber verzögert-wirkenden neutralen Insulin-Protamin-Suspensionen einen Vorteil, weil die Unannehmlichkeit der Sedimentation nicht auftritt. Die bekannten neutralen Protamin-Insulin-Präparate sind Suspensionen, während es sich bei den bevorzugten erfindungsgemäßen Protamin-Insulin-Präparaten um Lösungen mit unter etwa 6,2 liegenden pH-Werten handelt.

Von den erfindungsgemäßen Lösungen wird angenommen, daß sie besonders gut für die Verabreichung durch füllhalter-artige Geräte, wie sie für eine mehrmalige Insulin-Injektionstherapie verwendet werden, geeignet sind.

Die erfindungsgemäßen Präparate können ein natürlich vorkommendes Insulin und/oder ein Derivat davon enthalten. Bevorzugte Insuline für die praktische Ausführung der Erfindung sind die von Menschen, Schweinen und Rindern stammenden, am besten von Menschen. Für die erfindungsgemäße Praxis können auch andere natürlich vorkommende Insuline angewandt werden. Vorzugsweise wird Insulin mit hohem Reinheitsgrad verwendet. Im Kontext der Erfindung sollen unter der Bezeichnung Insulin, wenn sie im Plural oder als Gattungsbegriff angewandt wird, sowohl natürlich vorkommende Insuline als auch Insulinderivate zu verstehen sein.

Man kann davon ausgehen, daß zwischen natürlich vorkommenden Insulinen und Insulinderivaten einige Unterschiede bestehen.

Erfindungsgemäß wird die Bezeichnung Derivate von Insulin (oder Insulinderivate) für Peptide angewandt, die einen den Blutzucker senkende Wirkung haben und eine Aminosäurezusammensetzung aufweisen, die mit der von Humaninsulin unter der Voraussetzung identisch ist, daß einige wenige der Aminosäurereste durch andere Aminosäurereste ersetzt sind, und die C-terminale Carboxygruppe der B-Kette wahlweise geschützt ist. Beispiele für derartige Insulinderivate werden unter anderem in zwei Europäischen Patentanmeldungen, den Veröffentlichungen Nr. 86301755 und 86306721 beschrieben, deren Inhalt hier unter Bezugnahme einbezogen wird.

Wenn Human-, Schweine- oder Rinderinsulin für erfindungsgemäße Lösungen eingesetzt wird, muß der Zinkgehalt des Insulins niedrig sein, vorzugsweise unter 0,1 Zinkionen/Hexamer (das ent-

spricht weniger als 0,02 % (Masse/Masse) auf der Basis von Insulin) liegen, um eine Präzipitation von Insulin bei den über etwa 4 liegenden pH-Werten zu verhindern, und das gleiche gilt auch für Protamin enthaltende Lösungen. Aus Zinkinsulinkristallen kann das Zink entfernt werden, z. B. durch Aussalzungsverfahren und anschließende Präzipitation bei einem pH-Wert von 5 (Schlichtkrull: Acta Chem. Scand. 10 (1956), 1455 - 58). Wenn jedoch Mittel vorhanden sind, die mit Zink Komplexe bilden können, wie Citrat, kann der Zinkgehalt höher sein.

Werden Insulinderivate angewandt, braucht der Zinkgehalt nicht in dem gleichen Maße kritisch zu sein. In einigen Fällen von Insulinderivaten kann ein hoher Anteil von Zinkionen (z. B. bis zu 10 Zinkionen/Hexamer) unter den Bedingungen der erfindungsgemäßen Lösungen mit den Insulinlöslichkeiten vereinbar sein und kann sogar wünschenswert sein (siehe Europäische Patentanmeldung Nr. 86301755).

Von Protamin ist bekannt, daß es ein heterogenes Gemisch ist. Protamin kann von Fischen wie Oncorhynchus keta gewonnen werden. Es kann aber auch von anderen Fischen stammendes Protamin verwendet werden. Normalerweise wird Protamin als Protaminsulfat verkauft. Es können aber auch andere Salze eingesetzt werden. Vorzugsweise wird Protamin mit hohem Reinheitsgrad verwendet.

Als Beispiele für andere bevorzugte erfindungsgemäße Präparate können sowohl Zink als auch Protamin enthaltende Präparate angeführt werden. In derartigen Präparaten, bei denen es sich um Lösungen von Insulinderivaten im pH-Wertbereich von 3 bis 4 oder neutrale Suspensionen von Säugetierinsulin handeln kann, kann der Zinkgehalt bis zu etwa 25 Zinkionen pro Hexamer Insulin oder Insulinderivat betragen.

Der Insulingehalt in erfindungsgemäßen Lösungen kann im Bereich von 20 bis 500 IU/ml, vorzugsweise im Bereich von 40 bis 100 IU/ml, bei Präparaten für die Injektion liegen. Für andere Zwecke der parenteralen Verabreichung kann der Insulingehalt jedoch höher sein. Die Insulinlösung kann mit einem festen Insulinmaterial wie Zinkinsulinkristallen oder Zink-Protamin-Insulinkristallen vermischt werden.

Erfindungsgemäß können die verschiedensten löslichen Magnesiumsalze, sowohl einzeln als auch vermischt, verwendet werden. Beispiele für mögliche Anionen sind Chlorid, Sulfat, Monocarboxylate wie Acetat, Propionat und Butyrat und Dicarboxylate wie Succinat, Aspartat und Glutamat. Die optimale Konzentration von Magnesiumionen wird von dem (den) angewandten Salz(en) abhängig sein und sollte in bezug auf die Bedingungen für den verlangten zeitlichen Ablauf der Herstellung, die Insulinlöslichkeit und die Annäherung der Zusammensetzung an isotonische Bedingungen gewählt werden. Isotonische Konzentrationen von Magnesiumsalzen zeigen große Unterschiede, wie durch die isotonischen Konzentrationen von Magnesiumchlorid und Magnesiumsulfat erläutert werden kann, die annähernd 0,1 M bzw. 0,26 M betragen. Andere Salze, Aminosäuren und nicht-ionische Mittel (neben Konservierungsmitteln) können vorhanden sein, wenn sie nicht-toxisch und mit dem Insulinpräparat insgesamt verträglich sind.

Erfindungsgemäß beträgt der Bereich anwendbarer Magnesiumionenkonzentrationen etwa 0,005 M bis 0,5 M, vorzugsweise über 0,05 M. Die obere Grenze ist etwas willkürlich, wobei sie unter der Voraussetzung gewählt wird, daß eine gewisse Überschreitung der Isotonizität in einigen Fällen (z. B. für die intraperitoneale Infusion) annehmbar sein kann. Gemäß einem bevorzug-

ten erfindungsgemäßen Ausführungsbeispiel enthalten die Präparate etwa 0,08 M bis 0,3 M Magnesiumionen.

Das in dem erfindungsgemäßen Insulinpräparat vorhandene Konservierungsmittel kann dem bisher in herkömmlichen Insulinpräparaten entsprechen, zum Beispiel Phenol, m-Cresol und Methylparaben sein.

Zur Herstellung wäßriger erfindungsgemäßer Insulinlösungen kann eine schwach saure Lösung von Insulin mit einer alle anderen Bestandteile des fertigen Präparates enthaltenden Lösung vermischt werden. Anschließend folgen die Einstellung des pH-Wertes, wenn erforderlich, Rühren bis eine klare Lösung gewonnen wird, und abschließend sterile Filtration. Wenn verlangt, kann eine sterile verzögernd-wirkende Insulinsuspension der sterilen Insulinlösung zugesetzt werden, wodurch ein Präparat mit zweiphasiger Wirkung entsteht. Zum Schutz der Präparate gegen Denaturierung, die durch gelegentliches Erwärmen und Schütteln auftreten kann, können bekannte Stabilisierungsmittel wie Phospholipide zugegeben werden.

Präparate, die ein Insulinderivat enthalten, werden in analoger Weise hergestellt.

Die erfindungsgemäßen Insulinpräparate können für die Behandlung von Diabetes eingesetzt werden. Es ist zu empfehlen, daß die Dosierung der erfindungsgemäßen Insulinpräparate von einem Arzt in einer ähnlichen Weise wie die Wahl der Dosierung bekannter Insulinpräparate für Injektionen festgelegt wird.

Die folgenden Beispiele zeigen, wie Magnesiumionen die Löslichkeit von Insulin erhöhen, wie bevorzugte erfindungsgemäße Insulinpräparate hergestellt werden können und wie sie nach der Injektion bei Schweinen wirken.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Saure Lösungen, die 200 IU zinkfreies Human-Monokomponenten-Insulin pro ml, eine Spurenmenge von Human-Mono-^{125}I-(A19)-Insulin, 2 g Phenol/Liter und ein (in der folgenden Tabelle I aufgeführtes) Salz in einer annähernd isotonischen Konzentration enthalten, wurden auf die in Tabelle I angegebenen pH-Werte eingestellt. Die Löslichkeiten wurden mit Hilfe von Messungen der Radioaktivitätskonzentrationen in den überstehenden Flüssigkeiten und die Umwandlung der Ergebnisse auf IU/ml bestimmt (1 IU entspricht 38 µg Insulin). Der Einfluß der Salze auf die Löslichkeit von Insulin (IU/ml) bei Raumtemperatur geht aus Tabelle I hervor.

Tabelle I

pH	0,1 M $MgCl_2$	0,15 M NaCl	0,15 M KCl	0,15 M NH_4Cl
3,5	über 200	über 200	über 200	über 200
4,0	135	79	98	109
4,5	85	20	26	29
5,0	104	16	17	22
5,5	124	18	21	25
6,0	70	25	32	29
6,5	21	41	56	27

Tabelle I zeigt, daß die Löslichkeit des Insulins in einer annähernd isotonischen Magnesiumchloridlösung überraschenderweise viel höher ist als die Löslichkeiten in entsprechenden Lösungen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Ammoniumchlorid, jeweils bei pH-Werten von 4 bis 6, und fast 100 IU/ml erreicht, eine normalerweise angewandte Konzentration von Insulinpräparaten für die Injektion.

Die Löslichkeit von Insulin (IU/ml) bei Raumtemperatur, bei einem pH-Wert von 5,5 und bei verschiedenen Konzentrationen der Salze wurde ermittelt und wird in der folgenden Tabelle II dargestellt.

Tabelle II

Salz-Konz. M	$MgCl_2$	NaCl	KCl	NH_4Cl
0,025	12	4	4	5
0,050	33	5	6	5
0,075	72	7	9	8
0,10	101	11	12	11
0,15	über 200	21	21	25
0,20	über 200	37	34	39
0,25	über 200	41	54	66
0,30	über 200	76	74	108
0,35	über 200	69	84	123
0,40	über 200	100	119	146

Aus Tabelle II geht eine höhere Löslichkeit in Magnesiumchloridlösungen im Verhältnis zu Natriumchlorid-, Kaliumchlorid- und Ammoniumchloridlösungen über einen breiten Bereich von Salzkonzentrationen hervor.

Beispiel 2

Es wurde eine als 1 bezeichnete Lösung mit der folgenden Zusammensetzung hergestellt: 0,15 M Magnesiumbutyrat, 0,006 M Zitronensäure, 2 g/Liter Phenol und 100 IU/ml zinkfreies Human-Monokomponenten-Insulin; pH-Wert = 5,8.

Eine als O bezeichnete Lösung, die als schnell-wirkendes Standard-Insulinpräparat, Actrapid^{TM}HM, hergestellt wurde und folgende Zusammensetzung hatte, wurde als Bezugspräparat verwendet: 16 g Glycerol/Liter, 2 g Phenol/Liter und 100 IU/ml Human-Monokomponenten-Insulin (2 Zinkionen/Hexamer); pH-Wert 7,4. Das Mittel entspricht den Anforderungen der United States Pharmacopeia XIX für Neutrale Insulin Injektion.

Beiden Lösungen wurde Human-Mono-^{125}I-(A-19)-Insulin in Spurenkonzentrationen (0,3 bis 1 µCi/ml) zugesetzt. Anschließend wurde 0,1 ml jeder Lösung getrennt zwei Schweinen subkutan injiziert. Die Absorption wurde durch äußerliche Überwachung der Radioaktivität, die an der Injektionsstelle zurück blieb, mit Hilfe eines Szintillationskristalldetektors, der mit einem Spektrometer verbunden war, analog einer Methode verfolgt, die für Absorptionsuntersuchungen bei Menschen "Absorption von injiziertem Insulin" (Doktorarbeit) entwickelt worden war (Binder 1969). Zur Bestimmung von Plasmaglucose und Plasmainsulin wurden Blutproben entnommen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle III enthalten.

Tabelle III zeigt die zeitliche Bestimmung von Restradioaktivität, Plasmaglucose und Plasma-IRI (immuno-reaktivem Insulin, bestimmt durch Radioimmunoanalyse). Die Werte der Radioaktivi-

tät an der Injektionsstelle sind in Prozent des unmittelbar nach der Injektion gemessenen Wertes (Zeit = 0) angeführt. Die Plasmaglucosekonzentrationen sind in Prozent des Wertes der Blutprobe, die unmittelbar vor der Injektion entnommen wurde (Zeit = 0), angegeben.

Lösung 0: Bezugslösung, die einem Schwein verabreicht wurde (Masse: 77 kg).
Lösung 1: Testlösung, die einem anderen Schwein verabreicht wurde (Masse: 79 kg).

Tabelle III:

Zeit nach der Injektion min	% Radioaktivität		% Plasmaglucose		Plasma IRI, µU/ml	
	0	1	0	1	0	1
-15	-	-	98	98	unter 5	unter 5
0	100	100	100	100	unter 5	unter 5
30	91	67	95	41	16	25
60	76	54	67	49	18	23
90	69	40	56	43	19	18
120	56	27	51	41	13	14
180	38	11	47	45	10	5
240	23	5	58	78	9	unter 5
300	14	3	65	108	7	unter 5

Wie aus Tabelle III zu entnehmen ist, wird das Testinsulin schneller absorbiert als das Bezugsinsulin. Das stimmt vollkommen mit den Beziehungen zwischen dem zeitlichen Verhalten des Prozentanteils der Plasmaglucose bei den Lösungen 0 und 1 bzw. zwischen dem zeitlichen Verhalten von Plasma-IRI bei den Lösungen 0 und 1 überein.

Beispiel 3

Es wurde eine als 2 bezeichnete Lösung mit folgender Zusammensetzung hergestellt: 0,175 M Magnesiumacetat, 0,0375 M Essigsäure, 2 g/Liter Phenol, 100 IU/ml zinkfreies Human-Monokomponenten-Insulin; pH-Wert 5,5.

Spureninsulin wurde wie in Beispiel 2 zugegeben. 0,1 ml der Lösung 2 wurde einem Schwein an einer Seite des Halses subkutan injiziert, während 0,1 ml Bezugeinsulinlösung, 0 (nach der Beschreibung in Beispiel 2 hergestellt) dem gleichen Schwein an der anderen Seite des Halses subkutan injiziert wurde.

Die Absorption wurde wie in Beispiel 2 beobachtet. Nach einer Woche wurde der Versuch unter Vertauschen der Injektionsstellen wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV enthalten.

Tabelle IV

Zeitliche Bestimmung von % Restradioaktivität. Mittelwerte aus zwei Versuchen an dem gleichen Schwein

Zeit nach der Injektion min	% Radioaktivität	
	0	2
0	100	100
30	92	79
60	86	63
90	73	53
120	63	44
180	42	26
240	25	12
300	15	5

Aus dieser Tabelle ist zu entnehmen, daß das Testinsulin schneller als das Bezugeinsulin absorbiert wird.

Beispiel 4

Es wurden zwei als 3A und 3B bezeichnete Lösungen mit den folgenden Zusammensetzungen hergestellt: 3A: 0,14 M $MgSO_4$, 0,05 M $MgCl_2$, 2 g/Liter Phenol, 100 IU/ml zinkfreies Human-Monokomponenten-Insulin; pH-Wert eingestellt auf 5,5 mit HCl. 3B: wie 3A, aber mit einem Zusatz von 1 g Protaminsulfat/ml.

Spureninsulin wurde wie in Beispiel 2 zugegeben. 0,1 ml der Lösung 3A wurde Schwein I und Schwein II an einer Seite des Halses subkutan injiziert. 0,1 ml von Lösung 3B wurde entsprechend Schwein III und Schwein IV injiziert. 0,1 ml einer Bezugsinsulinlösung, O, (nach der Beschreibung in Beispiel 2 hergestellt) wurde subkutan jedem der vier Schweine an der anderen Halsseite injiziert. Die Absorption wurde wie in Beispiel 2 beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle V enthalten.

Tabelle V

Zeitliche Bestimmung von Restradioaktivität

3A: ohne Protamin, 3B: mit Protamin

	% Radioaktivität							
Zeit nach d.	Schwein I		Schwein II		Schwein III		Schwein IV	
Injektion	O	3A	O	3A	O	3B	O	3B
min								
0	100	100	100	100	100	100	100	100
30	97	89	85	79	92	103	94	95
60	89	69	75	54	77	93	78	93
90	71	63	62	43	60	95	65	88
120	66	45	54	29	50	86	53	82
180	45	25	38	13	30	82	34	73
240	26	12	24	6	15	83	18	71
300	16	6	17	3	9	73	11	66

Aus dieser Tabelle ist zu entnehmen, daß das Testinsulin in Abwesenheit von Protamin schneller absorbiert wird als das Bezugsinsulin, aber viel langsamer als das Bezugsinsulin in Gegenwart von Protamin.

Beispiel 5

Es wurden drei als 4A, 4B und 4C bezeichnete Lösungen mit folgenden Zusammensetzungen hergestellt: 4A: 0,18 M Magnesiumsuccinat, 0,01 M $MgCl_2$, 0,002 M $MnSO_4$, 0,02 M Succinsäure, 2 g/Liter Phenol, 100 TU/ml zinkfreies Human-Monokomponenten-Insulin; pH-Wert 5,6. 4B: Wie 4A, jedoch mit einer Zugabe von 0,55 mg Protaminsulfat/ml. 4C: Wie 4A, jedoch mit einer Zugabe von 0,73 mg Protaminsulfat/ml.

Spureninsulin wurde wie in Beispiel 2 zugegeben. 0,1 ml der Lösungen 4A, 4B und 4C wurde den Schweinen A, B bzw. C subkutan an einer Seite des Halses injiziert. 0,1 ml einer Bezugsinsulinlösung, O, (nach der Beschreibung in Beispiel 2 hergestellt) wurde jedem der drei Schweine an der anderen Halsseite subkutan injiziert. Die Absorption wurde wie in Beispiel 2 verfolgt. Eine Woche später wurde der Versuch unter Vertauschen der Injektionsstellen wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI enthalten.

Tabelle VI

Angaben von Beispiel 5. Zeitliche Bestimmung von Restradioaktivität. Mittelwerte von zwei Versuchen. 4A: ohne Protamin. 4B: mit Protamin, niedriger Gehalt. 4C: mit Protamin, hoher Anteil.

	% Radioaktivität					
Zeit nach der Injektion min	Schwein A		Schwein B		Schwein C	
	0	4A	0	4B	0	4C
0	100	100	100	100	100	100
30	91	82	92	87	92	89
60	78	71	87	86	84	87
90	66	57	74	80	71	85
120	51	45	63	73	59	81
180	33	23	47	62	40	70
240	21	15	35	54	25	66
300	15	9	25	46	17	56
480	10	6	16	35	9	45
600	8	4	8	27	5	31
720	6	4	5	17	4	19

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß das Testinsulin im Vergleich zum Bezugsinsulin schneller ohne Protamin absorbiert wird, langsamer bei dem niedrigen Gehalt an Protamin und sogar noch langsamer bei dem hohen Protamingehalt.

In den Beispielen 6 bis 8, 10 und 11 wurden die Absorptionseigenschaften der Testpräparate im Vergleich mit einer Human-Actrapid-Bezugslösung wie in den Beispielen 2 bis 5 untersucht. In Beispiel 9 wurde eine andere Bezugslösung verwendet, siehe unten. Der Einfachheit halber wird das Vergleichsergebnis je-

doch als das Durchschnittsverhältnis angegeben:

$$R = T_{50\,\%}(\text{Test})/T_{50\%}(\text{Bezug})$$

worin $T_{50\%}$(Test) und $T_{50\%}$(Bezug) die Zeit darstellen, die vom Zeitpunkt der Injektion bis zum Absinken der an der Injektionsstelle gemessenen Radioaktivität auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes bei Test bzw. Bezug vergangen ist. Die Anzahl der eingesetzten Schweine wird mit N bezeichnet.

Beispiel 6

Testlösung: 0,14 M $MgSO_4$, 0,05 M $MgCl_2$, 0,01 M Magnesiumacetat, 0,002 M $CaCl_2$, 2 g m-Cresol/l, 100 I./ml zinkfreies Human-Monokomponenten-Insulin plus Human-Spureninsulin; pH-Wert mit Chlorwasserstoffsäure auf 5,7 eingestellt.

0,04 ml jeder Test- und Bezugslösung wurden jedem Schwein injiziert.

Der R-Wert wurde mit 0,73 ermittelt (N = 6).

Beispiel 7

Testlösung: 0,02 M $MgCl_2$, 0,?? (unleserlich, d. Ü.) M Argininmonohydrochlorid, 2 g Phenol/l, 100 IU/ml zinkfreies Human-Monokomponenten-Insulin plus Spureninsulin; pH-Wert mit NaOH auf 7,7 eingestellt.

0,08 ml jeder Test- und Bezugslösung wurden jedem Schwein injiziert.

Der R-Wert wurde also 0,74 ermittelt (N = 2).

Beispiel 8

Testlösung: 0,095 M $MgCl_2$, 2 g Phenol/l, 100 IU-Äquivalente/ml zinkfreies Schweine-Monodesamidoinsulin plus Spurenderivat; pH-Wert mit Chlorwasserstoffsäure auf 3,2 eingestellt.

0,08 ml jeder Test- und Bezugslösung wurde jedem Schwein injiziert. Der R-Wert wurde mit 0,71 ermittelt (N = 2).

Beispiel 9

Testlösung: 0,095 M $MgCl_2$, 2 g Phenol/l, 100 IU-Äquivalente/ml zinkfreies Human-Insulinderivat mit Ser(B9), substituiert durch Asp und Thr(B27), substituiert durch Glu, plus Spurenderivat; pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Da vorher bekannt war, daß das als Actrapid formulierte Derivat schneller absorbiert würde als Human-Actrapid (siehe Europäische Patentanmeldung Nr. 83306721), diente in diesem Beispiel das als Actrapid formulierte Derivat als Bezugslösung mit 100 IU-Äquivalenten/ml Derivat. 0,08 ml jeder Test- und Bezugslösung wurden jedem Schwein injiziert.

Der R-Wert wurde mit 0,85 ermittelt (N = 5).

So wird auch bei diesem schnell absorbierbaren Insulinderivat durch die Magnesiumionen eine verstärkende Wirkung auf die Absorption erzielt.

Beispiel 10

Testlösung 1: 0,0095 M $MgCl_2$, 0,002 M Zinkacetat, 1 mg Protaminsulfat/ml, 3 g m-Cresol/ml, 100 IU-Äquivalente/ml zinkfreies Schweine-Monodesamidoinsulin plus Spurenderivat; pH-Wert mit Chlorwasserstoffsäure auf 3,2 eingestellt.

Testlösung 2: wie 1, nur wurden 0,095 M $MgCl_2$ durch 0,14 M NaCl substituiert.

0,05 ml der Testlösung (entweder 1 oder 2) und der Bezugslösung (Human-Actrapid^R plus Human-Spureninsulin) wurden jedem Schwein injiziert.

Die R-Werte wurden mit 3,7 (N = 2) und 2,9 (N = 2) für die Testlösungen 1 bzw. 2 ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen die verzögernde Wirkung von Magnesiumionen neben der der Zinkionen bei Protamin enthaltende Monodesamidoinsulin-Lösungen.

Beispiel 11

Es wurde eine pharmako-kinetische Untersuchung bei gesunden Versuchspersonen durchgeführt. Testlösung: 0,14 M $MgSO_4$, 0,05 M $MgCl_2$, 0,01 M Magnesiumacetat, 2 g m-Cresol/l, 100 IU/ml zinkfreies Human-Monokomponenten-Insulin; pH-Wert mit Chlorwasserstoffsäure auf 5,7 eingestellt. Bezugslösung (Actrapid^{TM}HM): 16 g Glycerol/l, 3 g m-Cresol/l, 100 IU/ml Human-Monokomponenten-Insulin (3 Zinkionen/Hexamer); pH-Wert 7,4.

Human ^{125}I-Insulin wurde in Spurenkonzentrationen von 5 und 3 µCi/ml der Test- bzw. Bezugslösung zugesetzt. 4 IU der Testlösung wurden subkutan an einem Oberschenkel und 4 IU der Bezugslösung am anderen Oberschenkel jeder Person injiziert. Die Verteilung der beiden Präparate auf den linken und rechten Oberschenkel erfolgte willkürlich. Die Absorption wurde durch kontinuierliche äußere Überwachung der an der Injektionsstelle jedes Oberschenkels zurückbleibenden Radioaktivität verfolgt.

Der R-Wert wurde mit 0,78 ermittelt (N = 15). Somit wird ohne Verzögerungssubstanzen eine verstärkende Wirkung auf die Absorption von Insulin durch Magnesiumionen auch bei Menschen erzielt.

Die in der obigen Beschreibung und den folgenden Ansprüchen dargelegten Merkmale, sowohl getrennt als auch in jeder beliebigen Kombination, stellen das Material für die Realisierung der Erfindung in ihren verschiedenen Formen dar.