



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 6425/87

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> A 61 K 37/26

(22) Indleveringsdag: 08 dec 1987

(24) Løbedag: 14 apr 1987

(41) Alm. tilgængelig: 08 dec 1987

(44) Fremlagt: 18 mar 1991

(86) International ansøgning nr.: PCT/DK87/00038

(86) International indleveringsdag: 14 apr 1987

(85) Videreførelsesdag: 08 dec 1987

(30) Prioritet: 18 apr 1986 DK 1792/86

(71) Ansøger: \*Novo Nordisk A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Per \*Balschmidt; DK, Finn Benned \*Hansen; DK, Bente Rose \*Johansen; DK

(74) Fuldmægtig: Dansk Patent Kontor A/S

(54) Insulinpræparat til nasal eller rektal administration og anvendelse af et insulinderivat til fremstilling af præparatet

(56) Fremdragne publikationer

SE freml.skrift nr. 382452

US pat. nr. 4534894

Andre publikationer. Hoppe-seylers Zeitschrift für physiologische Chemie bd. 356 (1975), 1397-1404.  
Biochemistry, 19 (1980), 5926-5931.  
Eur. J. Biochem. 31 (1972), 470-473.  
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 366 (1985) 521-525.  
Klinisk Ordbog, 13 udg. (1984), 525.  
Römpps Chemie-Lexikon, 8. udg. (1985), 2997.

(57) Sammendrag:

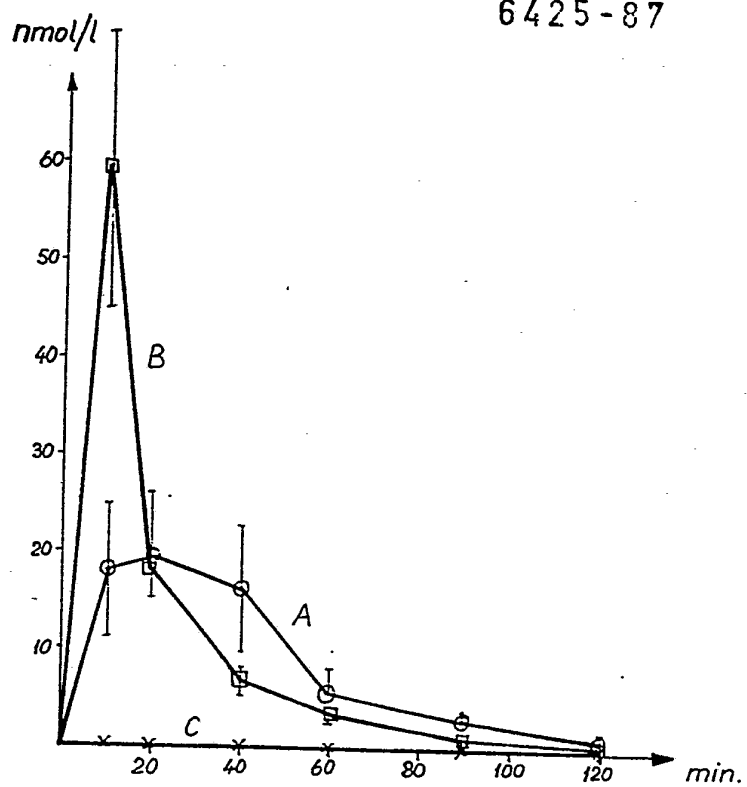
6425-87

Insulinpræparater til nonparenteral administration, indeholdende et eller flere insuliner eller insulinderivater, som i opløsning i det fysiologiske pH-område i overvejende grad foreligger som monomerer, gængse additiver samt eventuelt et konventionelt insulin og eventuelt et eller flere absorptionsfremmende stoffer giver hurtig optagelse af den administrerede insulinaktivitet.

DK 160460 B

fortsættes

6425-87



Den foreliggende opfindelse angår et insulinpræparat til nasal eller rektal administration samt anvendelse af des[(B26-30)-pentapeptid]insulin-B25-amid til fremstilling deraf.

Lige siden insulinets opdagelse og dets efterfølgende anvendelse til behandling af diabetes har den eneste praktisk anvendte administrationsform været subkutan eller intramuskulær injektion, oftest flere gange dagligt. Denne administration medfører på trods af en stærk teknisk udvikling stadig en række ulemper, såsom smerte, infektionsrisiko samt mulighed for kroniske vævsskader. Der har derfor altid været et ønske om at indgive insulinet på anden måde end ved injektion, og således har især oral, rektal, nasal samt ophthalmisk administration været undersøgt.

Den ophthalmiske administration af insulin er beskrevet i dansk patentskrift nr. 135.268, ifølge hvilket en insulinholdig hydrogel anbringes under øjenlåget. Derved opnås en optagelse på 5-20% af den administrerede insulinmængde i organismen over en periode på adskillige timer.

Den orale administration kræver, at der foretages særlige beskyttelsesforanstaltninger for at hindre insulinet i at blive nedbrudt, før optagelsen kan ske gennem tarmens slimhinde. Det kan ske f.eks. som anført i beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 1925/83 og nr. 2294/84, hvor der tilsættes enzyminhibitorer og eventuelt foretages indkapsling i et galdeopløseligt materiale. Oral administration giver kun en optagelse på 1-2% af den indgivne insulinmængde, jf. Galloway et al., Diabetes 21 (1971), side 640-648, hvilket gør denne administrationsform uanvendelig i praksis.

Rektal insulinadministration er kendt fra f.eks. DE-offentliggørelsesskrift n. 2.641.819, US-patentskrift

nr. 4.164.573 og US-patentskrift nr. 4.442.090. Ved denne indgivelsesmåde indkapsles insulinet i form af et suppositorium, hvori tilstedeværelsen af en enzyminhibitor normalt ikke er nødvendig. Herved kan opnås en absorption af den administrerede insulinmængde på ca. 5%, hvilket er en økonomisk uacceptabel udnyttelsesgrad.

Ved de ovenfor omtalte administrationsformer benyttes i næsten alle tilfælde et overfladeaktivt tilsætningsstof for at forøge absorptionshastigheden og -effektiviteten af insulinet gennem slimhinderne. Et eksempel på sådanne absorptionsfremmende hjælpestoffer er polyoxyethylenfedt-alkoholethere samt især galdesyre eller salte deraf.

Sådanne tilsætningsstoffer er særligt effektive ved nasal administration af insulin, jf. GB-patentskrift nr. 1.527.605 og nr. 1.554.157, og teknikken er nærmere beskrevet af S. Hirai et al., Diabetes 27 (1978), side 296-299, og G.S. Gordon et al., PNAS 82 (1985), side 7419-7423. Ved denne administrationsform indgives insulinet i opløsning som dråber eller bedre i forstøvet form i næsehulen, hvorefter optagelsen over næseslimhinden sker så hurtigt, at den maksimale insulinkoncentration allerede opnås efter 10-30 minutter. Denne hurtigt indtrædende optagelse har særlig terapeutisk betydning, idet den maksimale insulinkoncentration ved normal subkutan injektion af opløst insulin først indtræder efter 30-60 minutters forløb, hvilket kan medføre problemer i en meget benyttet diabetesterapi, hvori der indgives injektioner af hurtigtvirkende insulin umiddelbart før hovedmåltiderne.

Ved den nasale administrationsform har man imidlertid efter nogen tids forløb kunnet vise en uheldig indvirkning på slimhinderne af de tilsatte absorptionsfremmende hjælpestoffer, jf. S. Hirai et al., Int. J. Pharm. 9 (1981), side 173-184, men dette problem angives at være løst ved anvendelse af visse fusidinsyre- eller cephalo-

sporinderivater som hjælpestoffer, jf. beskrivelsen til europæisk patentansøgning nr. 128.831. Andelen af absorberet insulin ved nasal indgivelse i opløst og forstøvet form angives i de ovenfor anførte skrifter at være op til ca. 20%.

En udførelsesform af den nasale administration, hvorved anvendelsen af overfladeaktive hjælpestoffer kan undgås, er kendt fra europæisk patentansøgning nr. 122.036. Denne består i indgivelse af insulinet på pulverform, idet der anvendes et vandopløseligt, men vandabsorberende bærestof, f.eks. krystallinsk cellulose. Partiklerne hæfter herved til næseslimhinden, og der optages fugtighed, som bevirker, at insulinet opnår intens kontakt med slimhinden og derved kan optages med høj effektivitet.

Ved alle de kendte insulinpræparater til administration på anden måde end ved injektion anvendes et konventionelt kommercielt tilgængeligt insulin som basis i formuleringen. Når et sådant insulin opløses ved fysiologisk pH-værdi, indstiller der sig en koncentrationsafhængig ligevægt mellem monomert, dimert, hexamert og polymert insulin. Selvassociationsgraden kan bestemmes ved f.eks. ultracentrifugering eller ved gelfiltreringsmetoder, jf. f.eks. R. Valdes Jr. og G.A. Ackers, "Methods in enzymology", bind 61 (Enzyme Structure, part H, edt.: Hirs & Timasheff), Academic Press 1979, side 125-142. I konventionelle, kommercielle opløste insulinpræparater foreligger en meget stor del af insulinet som hexamerer.

Ved anvendelse af des[(B26-30)-pentapeptid]insulin-B25-amid, der i opløsning i det fysiologiske pH-område i overvejende grad foreligger på monomer form, i insulinpræparater til nasal eller rektal administration opnås en endnu hurtigere optagelse af den administrerede insulinaktivitet, idet maximal koncentration i serum opnås allerede efter 5-10 minutter. Der opnås en udnyttelsesgrad

på ca. 25%. Det fysiologiske pH-område omfatter pH-værdier fra ca. 6,5 til ca. 8,5.

Insulinpræparatet ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved,  
5 at det indeholder des[(B26-30)-pentapeptid]insulin-B25-amid, som i opløsning i det fysiologiske pH-område i overvejende grad foreligger på monomer form, og gængse additiver samt eventuelt et konventionelt insulin og eventuelt et eller flere absorptionsfremmende stoffer.

10 Opfindelsen angår især insulinpræparater til nasal administration.

Nasale insulinpræparater kan f.eks. doseres fra en flaske udstyret med en manuel forstøvningsanordning beregnet til at afgive et bestemt volumen insulinopløsning pr. dosis.

15 Flaskens dyse føres således op i et næsebor før forstøvningen, som eventuelt gentages i det andet næsebor.

Des[(B26-30)-pentapeptid]insulin-B25-amid kan fremstilles ved kondensering af des[(B23-30)-octapeptid]insulin og gly-phe-phe-NH<sub>2</sub> ved trypsin-støttet peptidbindingsdannelse  
20 (W.H. Fischer et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366 (1985), side 521-525). Det som udgangsmateriale anvendte des[(B23-30)-octapeptid]insulin kan fremstilles ved spaltning af insulin med pepsin (H.G. Gattner: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 356 (1975), side 1397-1404).

25 Anvendelige absorptionsfremmende stoffer er overfladeaktive forbindelser, som f.eks. fedtalkyl- eller fedtacylsubstitueret polyethylenglycol, blokcopolymere af polyethylenglycol og polypropylenglycol, salte af galde-syrer, som f.eks. taurocholsyre, deoxycholsyre og glyco-  
30 deoxycholsyre, salte af N-acyl-aminosyrer, som f.eks. lauroylsarkosin og palmitoylglutaminsyre, samt derivater af fusidinsyre og cephalosporin. Særligt egnede er sådanne stoffer, som giver mindst mulig vævsirritation.

Som puffere kan anvendes fysiologisk acceptable syrer eller baser med pH-værdier i nærheden af det fysiologiske pH-område, f.eks. phosphater, tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) og glycylglycin. Som isotonika kan anvendes fysiologisk acceptable salte eller polyhydroxyforbindelser, som f.eks. natriumchlorid, glycerol eller mannitol. Nyttige konserveringsmidler omfatter phenol eller benzylalkohol eller lignende stoffer, som er aktive i det fysiologiske pH-område.

Nyttige suppositoriehjælpestoffer i præparater til rektal administration er forblandede syntetiske fedtstoffer, f.eks. "Witepsol"<sup>®</sup> (suppositoriemasse på basis af modificerede triglycerider af mættede plantefedtsyrer) eller delvis spaltede vegetabiliske olier og fedtstoffer eller polyethylenglycoler.

I pulverpræparater til nasal administration kan der som bærestoffer benyttes tørrede vandabsorberende, men vanduopløselige stoffer, f.eks. tværbundet polyvinylpyrrolidon eller især krystallinsk cellulose med en partikelstørrelse mellem 20 og 200  $\mu\text{m}$ .

Vandige præparater beregnet til nasal administration indeholder oftest 40-500 I.U. insulinaktivitet pr. ml, fortrinsvis fra 80 til 300 I.U./ml. Indholdet af overfladeaktive absorptionsfremmende stoffer ligger sædvanligvis i området 0,1-10%, og der foretrækkes et indhold på 0,5-5%. Præparatets pH bør ligge nær det fysiologiske pH-område, og der foretrækkes et pH-område mellem 7 og 8.

Pulverformige præparater til nasal administration indeholder oftest 0,5-10 I.U. insulinaktivitet pr. mg, fortrinsvis 1-8 I.U./mg. Insulinet eller insulinderivatet anvendt i disse præparater bør være fremstillet i umiddelbar vandopløselig form, fortrinsvis ved lyofilisering fra opløsninger med en pH-værdi mellem 6,5 og 8,5.

Rektale insulinpræparater i form af suppositorier indeholder oftest 2-200 I.U. insulinaktivitet pr. g, fortrinsvis 5-100 I.U./g. Det absorptionsfremmende stof  
5 tilsættes sædvanligvis i en mængde på 0,1-25% vægt-%, og der foretrækkes 0,5-10% (v/v). Præparaterne udstøbes oftest som suppositorier på 0,5-3 g, fortrinsvis 1-2,5 g.

Opfindelsen illustreres nærmere i de efterfølgende eksempler.

10

Eksempel 1

Fremstilling af et præparat til rektal administration.

82,5 mg des[(B26-30)-pentapeptid]svineinsulin-B25-amid og 1,0 g natriumcholat blandes grundigt op i 100 ml smeltet "Witepsol"® H ved 36°C, og den resulterende masse udstøbes  
15 i forme til suppositorier à 2 ml, hver indeholdende 20 I.U. insulinaktivitet.

Eksempel 2

Fremstilling af præparat til nasal administration.

75 mg des[(B26-30)-pentapeptid]svineinsulin-B25-amid opløses i 3 ml vand ved hjælp af lidt saltsyre, hvorpå der  
20 tilsættes 5 ml 0,02 M natriumdihydrogenphosphat i 1% phenol. pH justeres til 7,5 med natriumhydroxid, og der tilsættes vand til 10 ml. Denne opløsning blandes nu med 10 ml af en friskfremstillet 2% opløsning af natriumglyco-  
25 deoxycholat i 0,25 M natriumchlorid, justeret til pH 7,5 med saltsyre og fyldes derpå i en flaske, som lukkes med en manuel forstøvningsanordning, der afgiver et bestemt volumen opløsning pr. pust. Med et doseringsvolumen på 100 µl administreres således 10 I.U. insulinaktivitet ved et  
30 enkelt pust.

Eksempel 3

Fremstilling af præparat til nasal administration.

100 mg des[(B26-30)-pentapeptid]svineinsulin-B25-amid op-  
5 løses i 20 ml vand ved justering af pH til 7,5 med natri-  
umhydroxid, hvorpå opløsningen frysetørres. Det resul-  
terende insulinpulver blandes omhyggeligt i en morter med  
800 mg krystallinsk cellulose, så der opnås en ensartet  
pulversammensætning indeholdende 3 I.U. insulinaktivitet  
10 pr. mg.

Nasalpulveret kan derpå administreres til den nasale slim-  
hinde ved hjælp af en insufflator, som kan være udformet  
således, at pulveret administreres som et doseret lægemid-  
del i form af en gelatinekapsel, der perforeres umiddel-  
15 bart før indblåsningen.

Eksempel 4

Fremstilling af des[(B26-30)-pentapeptid]svineinsulin-  
B25-amid.

500 mg des[(B23-30)-octapeptid]svineinsulin, fremstillet  
20 på kendt måde ved trypsinnedbrydning af svineinsulin, og  
1000 mg gly-phe-phe-NH<sub>2</sub>, fremstillet på kendt måde ved  
Merrifield-syntese, opløses i en blanding af 6 ml dime-  
thylformamid og 3 ml vand, og pH justeret til 6,5 med  
triethylamin eller eddikesyre. Under omrøring tilsættes en  
25 opløsning af 25 mg trypsin i 500 µl 0,001 M calciumace-  
tat, og reaktionsblandingen henstår ved 20°C i 4 timer.  
Proteinerne udfældes derpå af opløsningen ved tilsætning  
af 100 ml acetone og fracentrifugeres. Bundfaldet genop-  
løses i 20 ml 1 M eddikesyre, 7 M urinstof og gelfil-  
30 treres på en 5 x 85 cm søjle af "Sephadex"®G50 Superfine i  
1 M eddikesyre. Fraktionerne indeholdende proteinhoved-  
fraktionen hældes sammen og frysetørres.

Det frysetørrede protein genopløses i 40 ml 7 M urinstof, idet pH justeret til 8,1 med 1 M TRIS, og sættes på en 2,6 x 20 cm søjle af DEAE-cellulose ("Whatman"®DE-52), som er  
5 pakket og ækvilibreret i 0,02 M Tris/saltsyre, 7 M urinstof pH 8,1. Søjlen elueres derpå ved 4°C med en natriumchloridgradient fra 0-0,1 M i samme buffer over 48 timer med et flow på 40 ml pr. time. Fraktionerne indehol-  
dende den først eluerede proteinhovedtop hældes sammen og  
10 afsaltes på "Sephadex"®G25 Fine i 1 M eddikesyre. Den proteinholdige blanding frysetørres. Udbytte: 260 mg des-  
[(B26-30)-pentapeptid]svineinsulin-B25-amid.

#### Eksempel 5

In vivo-forsøg.

15 6 uger gamle hanrotter (Wistar, 150 ± 5 g), som er gjort diabetiske 3 dage forinden ved intravenøs injektion af streptozotocin (65 mg/kg), anæstetiseres intraperitonealt med pentobarbital (50 mg/kg), og polyethylenkatetre  
indsættes i en halspulsåre til udtagning af blodprøver. En  
20 luftrørskanyle indsættes i rotterne inden den intranasale insulin administration.

Grupper på 4 rotter indgives intranasalt til tidspunktet 0 10 µl af et af nedenstående præparater:

A. 250 I.U./ml Zn-insulin (human)  
25 1/75 M natriumphosphat  
1,6% (r/r) glycerol  
1,0% (v/r) natriumglycodeoxycholol

B. 250 I.U./ml des[(B26-30)-pentapeptid]svineinsulin-  
B25-amid  
30 1/75 M natriumphosphat  
1,6% (r/r) glycerol  
1,0% (v/r) natriumglycodeoxycholol

- C. 1/75 M natriumphosphat  
1,6% (r/r) glycerol  
1,0% (v/r) natriumglycodeoxycholat

- 5 Blodprøver på 250  $\mu$ l udtages i heparinbehandlede isafkølede glas til tidspunkterne -5, 10, 20, 40, 60, 90 og 120 minutter, og plasmaprøverne fryses efter centrifugering til senere insulinbestemmelse ved radioimmunanalyse.

- I den efterfølgende tabel I er plasmainsulinkoncentrationerne (gennemsnitsværdier og S.E.M) anført ved de forskellige prøvetagningstidspunkter. Detektionsgrænsen er 0,05 nmol/l. Tegningen viser en grafisk afbildning af de tilsvarende værdier.

- Det fremgår af resultaterne, at det monomere des-pentapeptid-insulinamid (B) absorberes hurtigere og mere reproducerbart end det konventionelt anvendte hexamere insulin (A), se også kurverne på tegningen.

Tabel I

|                   |                 | Plasma-insulinkoncentration (nmol/l) |        |             |            |            |            |            |
|-------------------|-----------------|--------------------------------------|--------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| Præparat          | Antal<br>rotter | minutter efter administration        |        |             |            |            |            |            |
|                   |                 | -5                                   | 10     | 20          | 40         | 60         | 90         | 120        |
| A<br>(Zn-insulin) | 4               | $\bar{x}$                            | < 0,05 | 18,07       | 18,14      | 16,32      | 5,97       | 3,21       |
|                   |                 | $\pm$ S.E.M.:                        |        | $\pm$ 6,81  | $\pm$ 6,87 | $\pm$ 6,42 | $\pm$ 2,17 | $\pm$ 0,99 |
|                   |                 |                                      |        |             |            |            |            | 1,21       |
|                   |                 |                                      |        |             |            |            |            | $\pm$ 0,34 |
| B<br>(DPI-amid)   | 4               | $\bar{x}$                            | < 0,10 | 59,39       | 19,46      | 7,13       | 3,88       | 1,42       |
|                   |                 | $\pm$ S.E.M.:                        |        | $\pm$ 14,25 | $\pm$ 2,74 | $\pm$ 1,83 | $\pm$ 1,17 | $\pm$ 0,46 |
|                   |                 |                                      |        |             |            |            |            | 0,96       |
|                   |                 |                                      |        |             |            |            |            | $\pm$ 0,26 |
| C<br>(placebo)    | 4               | $\bar{x}$                            | < 0,05 | < 0,08      | < 0,07     | < 0,06     | < 0,15     | < 0,08     |
|                   |                 | $\pm$ S.E.M.:                        |        |             |            |            |            | < 0,09     |

## P A T E N T K R A V

1. Insulinpræparat til nasal eller rektal administration, kendetegnet ved, at det indeholder des[(B26-30)-pentapeptid]insulin-B25-amid, som i opløsning i det fysiologiske pH-område i overvejende grad foreligger på monomer form, og gængse additiver samt eventuelt et konventionelt insulin og eventuelt et eller flere absorptionsfremmende stoffer.
- 10 2. Insulinpræparat ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det som den overvejende insulinaktive komponent indeholder des[(B26-30)-pentapeptid]insulin-B25-amid.
3. Insulinpræparat ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det er et præparat til nasal administration.
- 15 4. Anvendelse af des[(B26-30)-pentapeptid]insulin-B25-amid til fremstilling af insulinpræparater ifølge krav 1-3.

