CH 671 157 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 671 157 A5

(51) Int. Cl.[4]: A 61 K 37/36
A 61 K 37/02
A 61 K 45/08

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 2727/87

(22) Anmeldungsdatum: 16.07.1987

(30) Priorität(en): 18.07.1986 JP 61-169486
18.07.1986 JP 61-169489
18.07.1986 JP 61-169488
18.07.1986 JP 61-169487

(24) Patent erteilt: 15.08.1989

(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.08.1989

(73) Inhaber:
Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha,
Kita-ku/Tokyo (JP)

(72) Erfinder:
Machida, Minoru, Musashino-shi/Tokyo-to (JP)

(74) Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

(54) Stabiles pharmazeutisches Präparat, enthaltend Granulocytkolonie stimulierender Faktor, und Verfahren zur Herstellung desselben.

(57) Ein stabiles Granulocytkolonie stimulierender Faktor enthaltendes pharmazeutisches Präparat wird beschrieben. Es enthält, zusätzlich zum Granulocytkolonie stimulierenden Faktor, welcher als effektiver Bestandteil vorhanden ist, wenigstens eine Substanz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem pharmazeutisch annehmbaren Oberflächenmittel, Saccharid, Protein und höher-molekulargewichtigen Verbindung.

PATENTANSPRÜCHE

1. Ein stabiles, Granulocytkolonie stimulierender Faktor enthaltendes pharmazeutisches Präparat, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich zum Granulocytkolonie stimulierenden Faktor, welcher als der effektive Bestandteil vorhanden ist, wenigstens eine Substanz enthält, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem pharmazeutisch annehmbaren Oberflächenmittel, einem Saccharid, einem Protein und einer höher molekulargewichtigen Verbindung.

2. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es das Oberflächenmittel in einer Menge von 1 – 10 000 Gew.-Teile pro Gewichtsteil an Granulocytkolonie stimulierendem Faktor enthält.

3. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte Oberflächenmittel wenigstens ein Bestandteil ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem nichtionischen Oberflächenmittel, einem anionischen Oberflächenmittel und einem natürlichen Oberflächenmittel, wobei das nichtionische Oberflächenmittel ein Sorbitan aliphatischer Säureester, ein glycerinaliphatischer Säureester, ein polyglycerinaliphatischer Säureester, ein polyoxyethylensorbitanaliphatischer Säureester, ein polyoxyethylensorbitolaliphatischer Säureester, ein polyoxyethylenglycerinaliphatischer Säureester, ein polyethylenglycolaliphatischer Säureester, ein Polyoxyethylenalkylether, ein Polyoxyethylenpolyoxypropylenalkylether, ein Polyoxyethyenalkylphenylether, ein polyoxyethyliertes, gehärtetes Rhizinusöl, ein polyoxyethyliertes Bienenwachsderivat, ein Polyoxyethylenlanolinderivat, oder ein polyoxyethylenaliphatisches Säureamid ist, und wobei das anionische Oberflächenmittel ein Alkylsulfatsalz, ein Polyoxyethylenalkylethersulfatsalz, oder ein Alkylsulfosuccinatestersalz ist, und wobei das natürliche Oberflächenmittel Lecithin, Glycerophospholipid, Sphingophospholipid, oder ein sucrosealiphatischer Säureester ist.

4. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es das Saccharid in einer Menge von 1 – 10 000 Gew.-Teilen pro Gew.-Teil an Granulocytkolonie stimulierendem Faktor enthält.

5. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Saccharid wenigstens ein Bestandteil ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Glycerin, Erythritol, Arabitol, Xylitol, Sorbitol, Mannitol, Glycuronsäure, Iduronsäure, Galacturonsäure, Neuraminsäure, Glyconsäure, Mannuronsäure, Ketoglycolsäure, Ketogalactonsäure, Ketogulonsäure, Hyaluronsäure und Salze davon, Chondroitinsulfat und Salze davon, Heparin, Inulin, Chitin und Derivate davon, Chitosan und Derivate davon, Dextrin, Dextran mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 5000 – 150 000, und Alginsäure und Salze davon.

6. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es das Protein in einer Menge von 1 – 20 000 Gew.-Teilen pro Gewichtsteil an Granulocytkolonie stimulierendem Faktor enthält.

7. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte Protein wenigstens ein Bestandteil ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus menschlichem Serumalbumin, menschlichem Serumglobulin, Gelatin, Säure- oder Alkali-behandeltem Gelatin mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 7000 – 100 00, und Collagen.

8. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es die höher molekulargewichtige Verbindung in einer Menge von 1 – 20 000 Gew.-Teilen pro Gewichtsteil an Granulocytkolonie stimulierendem Faktor enthält.

9. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte höher molekulargewichtige Verbindung wenigstens ein Bestandteil ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Hydroxypropylcellulose, Hydroxymethylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von 300 – 6000, Polyvinylalkohol mit einem Molekulargewicht von 20 000 – 100 000, und Polyvinylpyrrolidon mit einem Molekulargewicht von 20 000 – 100 000.

10. Ein Verfahren zur Herstellung eines stabilen, Granulocytkolonie stimulierenden Faktor enthaltenden pharmazeutisches Präparats nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Granulocytkolonie stimulierende Faktor mit wenigstens einer Substanz vermischt wird, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem pharmazeutisch annehmbaren Oberflächenmittel, einem Saccharid, einem Protein und einer höher molekulargewichtigen Verbindung.

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein stabiles pharmazeutisches Präparat, enthaltend einen Granulocytkolonie stimulierenden Faktor. Im speziellen bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein stabilisiertes pharmazeutisches Präparat, enthaltend einen Granulocytkolonie stimulierenden Faktor, welcher geschützt ist gegenüber dem Verlust oder der Inaktivierung der aktiven Komponente (d.h. Granulocytkolonie stimulierender Faktor) bedingt durch die Adsorption an der Wand eines Behälters, in welchen das Präparat gegeben worden ist, oder bedingt durch die Assoziation, Polymerisation oder Oxidation der genannten Komponente.

Chemotherapie ist angewendet worden als ein Verfahren für die Behandlung einer Vielzahl von infektiösen Krankheiten, aber es ist kürzlich gefunden worden, dass Chemotherapie einige ernsthafte klinische Probleme verursacht, wie etwa die Erzeugung von arzneimittelresistenten Organismen, Veränderung der ursächlichen Organismen, und hohe Nebeneffekte. Um diese Probleme zu vermeiden, welche mit der Chemotherapie assoziiert sind, einschliesslich die Verwendung von therapeutischen Mitteln, wie etwa Antibiotika und Bakterizide, sind Anstrengungen unternommen worden, eine Substanz zu verwenden, welche die prophylaktischen Fähigkeiten des Wirtes gegenüber eines Infektion verursachenden Organismus aktiviert und dabei eine vollständige Lösung der oben erwähnten Probleme der Chemotherapie zur Verfügung stellt. Von der Vielzahl der prophylaktischen Fähigkeiten des Wirtes glaubt man, dass die phagocytisch bakterizide Wirkung von Leucocyten den stärksten Einfluss auf die anfängliche Periode von bakterieller Infektion verursacht, und es wurde daher angenommen, dass es wichtig ist, die Infektion schützenden Fähigkeiten des Wirtes zu begünstigen mittels Förderung des Wachstums von Neutrophilen und deren Differentiation im reifen Stadium. Der Granulocytkolonie stimulierender Faktor (G-CSF) ist eine der sehr brauchbaren Substanzen, welcher solche Wirkungen zeigt, und die Anmelder der vorliegenden Erfindung haben vorgängig eine Patentanmeldung betreffend einem Infektion schützenden Mittel unter Verwendung von G-CFS eingereicht (Japanische Patentanmeldung Nr. 23 777/1985).

Wie weiter oben erwähnt, umfasst die Chemotherapie, wie sie gegenwärtig praktiziert wird, verschiedene unvermeidbare Probleme, und intensive Anstrengungen werden gemacht, um eine Arzneimittelsubstanz zu verwenden, wel-

che fähig ist zur Aktivierung der prophylaktischen Funktionen des Wirtes oder der Person, welche infisziert worden ist.

Unnötig zu sagen, dass G-CSF selbst die Fähigkeit entfaltet, die prophylaktischen Funktionen des Wirtes zu aktivieren, und es ist auch gefunden worden, dass G-CSF grössere therapeutische Effekte bei klinischen Anwendungen zeigt, wenn er angewendet wird in Kombination mit einer Substanz, welche die prophylaktischen Fähigkeiten des Wirtes aktiviert.

G-CSF wird in einer sehr geringen Menge angewendet, und ein pharmazeutisches Präparat, enthaltend 0,1 – 100 µg (vorzugsweise 5 – 50 µg) an G-CSF, wird normalerweise verabreicht bei einer Dosismenge von 1 – 7 mal pro Woche an eine erwachsene Person. Jedoch hat G-CSF eine Tendenz, an der Wand eines Behälters, wie etwa einer Ampulle für die Injektion oder eine Spritze, absorbiert zu werden. Wenn das Arzneimittel als eine Injektion in solch einer Form wie eine wässrige Lösung verwendet wird, wird sie daher an der Wand des Behälters, wie etwa eine Ampulle oder eine Spritze, adsorbiert. Dies resultiert daher entweder im Misslingen von G-CSF, seine Aktivität als ein pharmazeutisches Mittel voll zu entfalten, oder es macht die Inkorporation von G-CSF in einer mehr als notwendigen Menge nötig, wobei man dem möglichen Verlust, bedingt durch die Adsorption, Rechnung trägt.

Ferner ist G-CSF labil und stark empfindlich gegenüber Umweltfaktoren, wie etwa Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Sauerstoff und Ultraviolettstrahlen. Durch die Einwirkung von solchen Faktoren erfährt G-CSF physikalische oder chemische Veränderungen, wie etwa Assoziation, Polymerisation und Oxidation, und erleidet einen grossen Verlust an Aktivität. Diese Phänomene machen es schwierig, die vollständige Erfüllung eines therapeutischen Aktes mittels Verabfolgung einer sehr geringen Menge an G-CSF in einer sehr exakten Art sicherzustellen.

Es ist daher notwendig, ein stabiles pharmazeutisches Präparat von G-CSF zu entwickeln, welches vollständig geschützt ist gegenüber einem Abfall in der Aktivität seiner wirksamen Komponente. Dies ist das Hauptziel der vorliegenden Erfindung, welche ein stabiles pharmazeutisches Präparat von G-CSF zur Verfügung stellt.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung führten intensive Studien durch, um die Stabilität eines G-CSF enthaltenden pharmazeutischen Präparates zu begünstigen, und sie fanden, dass dieses Ziel wirkungsvoll erreicht werden kann mittels der Hinzugabe eines pharmazeutisch annehmbaren Oberflächenmittels, Saccharides, Proteines oder hochmolekulargewichtigen Verbindung.

Demgemäss ist das stabile G-CSF enthaltende pharmazeutische Präparat der vorliegenden Erfindung dadurch gekennzeichnet, dass es sowohl G-CSF und wenigstens eine Substanz enthält, ausgewählt aus der Gruppe eines pharmazeutisch annehmbaren Oberflächenmittels, Saccharides, Proteins und hochmolekulargewichtigen Verbindung.

Der G-CSF, welcher im pharmazeutischen Präparat der vorliegenden Erfindung enthalten ist, kann erhalten werden mittels irgend einem Verfahren, wie etwa jenen Verfahren, welche in den Beschreibungen der japanischen Patentanmeldungen Nrn. 153 273/1984, 169 455/1985, 269 456/1985, 270 838/1985 und 270 839/1985 beschrieben sind. Zum Beispiel kann ein menschlicher G-CSF hergestellt werden entweder mittels Kultivierung eines Zellstammes (CNCM Hinterlegungs-Nummer I-315 oder I-483), gesammelt aus Tumorzellen von Patienten mit Mundhöhlenkrebs (oral cavity cancer) oder mittels Eingabe (expressing) einer rekombinierten DNA (welche hergestellt worden ist mittels Einwirkung eines menschlichen G-CSF Chiffrierungsgenes [encoding gene]) in eine geeignete Wirtzelle (z. B. E. coli, C 127 Zelle oder Ovarienzellen eines chinesischen Hamsters).

Irgend ein menschlicher G-CSF, welcher in hohem Grad gereinigt worden ist, kann verwendet werden als G-CSF, um im pharmazeutischen Präparat der vorliegenden Erfindung enthalten zu sein. Vorzugsweise sind die menschlichen G-CSFs solche, welche erhalten worden sind mittels Isolation aus dem auf der Oberfläche schwimmenden Teil der Kultur einer menschlichen G-CSF produzierenden Zelle, und ein Polypeptid oder Glycoprotein, welches die menschliche G-CSF Aktivität hat, welches erhalten worden ist mittels Transformierung eines Wirtes mit einem rekombinierten Vector, welcher darin ein Gen inkorporiert hat, welches ein Polypeptid, das die menschliche G-CSF Aktivität hat, codiert.

Zwei speziell bevorzugte Beispiele von menschlichen G-CSF werden im nachfolgenden gezeigt:

(1) Menschlicher G-CSF, welcher die folgenden physikochemischen Eigenschaften hat:

i) Molekulargewicht: etwa 19 000 ± 1000, gemessen mittels Elektrophorese mittels einem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel;

ii) Isoelektrischer Punkt: mindestens einer der drei isoelektrischen Punkte habend: pI = 5.5 ± 0.1, pI = 5.8 ± 0.1, und pI = 6.1 ± 0.1;

iii) Ultraviolettabsorption: eine maximale Absorption be 280 nm und eine minimale Absorption bei 250 nm habend;

iv) Aminosäuresequenz der 21 Reste von N-Enden:

H_2N – Thr – Pro – Leu – Gly – Pro – Ala – Ser – Ser – Leu – Pro – Gln – Ser – Phe – Leu – Leu – Lys – Cys – Leu – Glu – Gln – Val –;

(2) Menschlicher G-CSF, enthaltend entweder ein Polypeptid, welches die menschliche Granulocytstimulierenden Faktor Aktivität hat, welches dargestellt wird durch die gesamte oder teilweise Aminosäuresequenz, die weiter unten gezeigt wird, oder ein Glycoprotein, welches sowohl das genannte Polypeptid als auch einen Zuckerketteteil hat:

$(Met)_n$	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro
Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Cys	Leu	Glu	Gln	Val
Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln
Glu	Lys	Leu	(Val	Ser	$Glu)_m$	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys
Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly
His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser
Ser	Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly
Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu
Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile
Ser	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu
Gln	Leu	Asp	Val	Ala	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile
Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	Pro
Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala
Phe	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly

Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser	Phe	Leu
Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala
Gln	Pro									

(worin m 0 oder 1 ist und n 0 oder 1 ist).

Für Details für das Verfahren zur Herstellung dieser beiden Arten von G-CSF beachte man die Beschreibungen der Japanischen Patentanmeldungen Nrn. 153 273/1984, 269 455/1985, 269 456/1985, 270 838/1985 und 270 839/1985, welche alle durch die Anmelder der vorliegenden Erfindung eingereicht worden sind.

Ein weiteres Verfahren, welches verwendet werden kann, besteht in der Bewerkstellung der Fusion einer G-CSF produzierenden Zelle mit einer selbstwuchernden bösartigen Tumorzelle, und der Kultivierung des resultierenden Hybridomas in der Gegenwart oder Abwesenheit von Mytogen.

Die erhaltene Lösung, welche menschliches G-CSF enthält, kann in einem gefrorenen Stadium gelagert werden, nachdem sie weiter gereinigt und konzentriert worden ist, falls notwendig, und zwar mittels bekannten Techniken. Alternativ hierzu kann die Lösung gelagert werden, nachdem sie dehydratisiert worden ist, beispielsweise etwa mittels Gefriertrocknung.

Alle so hergestellten menschlichen G-CSFs können so verarbeitet werden, wie dies in der vorliegenden Erfindung angegeben ist, um stabile, G-CSF enthaltende pharmazeutische Präparate zu erhalten.

Typische Beispiele von Oberflächenmitteln, welche verwendet werden, um das stabile, G-CSF enthaltende pharmazeutische Präparat der vorliegenden Erfindung zu erhalten, werden im folgenden aufgelistet: Nichtionische Oberflächenmittel mit HLB von 6 – 18, wie etwa Sorbitan aliphatische Säureester (z. B. Sorbitan-monocaprylat, Sorbitan-monolaurat und Sorbitan-monopalmitat), Glycerinaliphatische Säureester (z. B. Glycerin-monocaprylat, Glycerin-monomyristat und Glycerin-monostearat), Polyglycerinaliphatische Säureester (z. B. Decaglyceryl-monostearat, Decaglyceryldistearat und Decaglyceryl-monolinoleat), Polyoxyethylen sorbitanaliphatische Säureester (z. B. Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat, Polyoxyethylen-sorbitan-monooleat, Polyoxyethylen-sorbitan-monostearat, Polyoxyethylen-sorbitan-monopalmitat, Polyoxyethylen-sorbitan-trioleat und Polyoxyethylen-sorbitan-tristearat), Polyoxyethylen-sorbitolaliphatische Säureester (z. .B. Polyoxyethylen-sorbitol-tetrastearat und Polyoxyethylen-sorbitol-tetraoleat), Polyethylen-glycerinaliphatische Säureester (z. B. Polyoxyethylenglyceryl-monostearat), Polyethylen-glycolaliphatische Säureester (z. B. Polyethylen-glycol-distearat), Polyoxyethylenalkylether (z. B. Polyoxyethylen-lauryl-ether), Polyoxyethylen-polyoxypropylen-alkyl-ether (z. B. Polyoxyethylen-polyoxypropylen-glycol-ether, Polyoxyethylen-polyoxypropylen-propyl-ether, und Polyoxyethylen-polyoxypropylen-cetylether), Polyoxyethylen-alkylphenylether (z. B. Polyoxyethylen-nonylphenyl-ether), polyoxyethyliertes Rizinusöl (polyoxyethyliertes hydriertes Rizinusöl), polyoxyethylierte Bienenwachsderivate (z. B. polyoxyethylierter Sorbitolbienenwachs), polyoxyethylierte Lanolinderivate (z. B. Polyoxyethylen-lanolin), und Polyoxyethylen-aliphatische Säureamide (z. B. Polyethylen-stearinsäureamid); anionische Oberflächenmittel, wie etwa Alkylschwefelsäuresalze mit einer $C_{10}-C_{18}$ Alkylgruppe (z. B. Natriumcetylsulfat; Natriumlaurylsulfat und Natriumoleylsulfat), Polyoxyethylenalkylether-Schwefelsäuresalze, worin die durchschnittliche molare Zahl an Ethylenoxidaddition 2 – 4 ist und die Alkylgruppe 10 – 18 Kohlenstoffatome hat, (z. B. Polyoxyethylen-Natrium-Laurylsulfat), Salze von Alkylsulfosuccinatestern, worin die Alkylgruppe 8 – 18 Kohlenstoffatome hat (z. B. Natriumlaurylsulfosuccinatester); und natürliche Oberflächenmittel, wie etwa Lecithin, Glyerophospholipid, Sphingophospholipid (z., B. Sphingomyelin), und Sucrose-aliphatische Säureester, worin die aliphatische Säure 12 – 18 Kohlenstoffatome hat. Diese Oberflächenmittel können natürlich entweder unabhängig voneinander oder im Gemisch miteinander verwendet werden.

Die weiter oben aufgeführten Oberflächenmittel werden vorzugsweise in Mengen von 1 – 10 000 Gew.-Teilen pro Gew.-Teil an G-CSF verwendet.

Das Saccharid, welches verwendet wird bei der Herstellung des stabilen, G-CSF enthaltenden pharmazeutischen Präparates der vorliegenden Erfindung kann ausgewählt sein aus Monosacchariden, Oligosacchariden und Polysacchariden, wie auch aus Phosphatestern und Nucleotidderivaten davon, solange diese pharmazeutisch annehmbar sind. Typische Beispiele werden weiter unten angegeben: trivalente und höhere Zuckeralkohole, wie etwa Glycerin, Erythritol, Arabitol, Xylitol, Sorbitol, und Mannitol; saure Zucker, wie etwa Glucuronsäure, Iduronsäure, Neuraminsäure, Galacturonsäure, Gluconsäure, Mannuronsäure, Ketoglycolsäure, Ketogalactonsäure und Ketogulonsäure; Hyaluronsäure und Salze davon, Chondroitinsulfat und Salze davon, Heparin, Inulin, Chitin und Derivate davon, Chitosan und Derivate davon, Dextrin, Dextran mit durchschnittlichen Molekulargewichten von 5000 – 150 000, und Alginsäure und Salze davon. Alle diese Saccharide können mit Vorteil entweder unabhängig voneinander oder im Gemisch miteinander verwendet werden.

Die weiter oben aufgeführten Saccharide werden vorzugsweise in Mengen von 1 – 10 000 Gew.-Teilen pro Gew.-Teil an G-CSF verwendet.

Typische Beispiele von Proteinen, welche verwendet werden bei der Herstellung des stabilen, G-CSF enthaltenden pharmazeutischen Präparates der vorliegenden Erfindung umfassen menschliches Serumalbumin, menschliches Serumglobulin, Gelatin, Säure-behandeltes Gelatin (durchschnittliches Molekulargewicht = 7000 – 100 100), Alkalibehandeltes Gelatin (durchschnittliches Molekulargewicht = 7000 – 100 000), und Collagen. Unnötig zu sagen, dass diese Proteine entweder unabhängig voneinander oder im Gemisch miteinander verwendet werden können.

Die weiter oben angegebenen Proteine werden vorzugsweise in Mengen von 1 – 20 000 Gew.-Teilen pro Gew.-Teil an G-CSF verwendet.

Typische Beispiele der hoch-molekulargewichtigen Verbindung, welche verwendet wird bei der Herstellung des stabilen, G-CSF enthaltenden pharmazeutischen Präparates der vorliegenden Erfindung, umfassen: Natürliche Polymere, wie etwa Hydroxypropylcellulose, Hydroxymethylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose, und Hydroxyethylcellulose; und synthetische Polymere, wie etwa Polyethylenglycol (Molekulargewicht = 300 – 6000), Polyvinylalkohol (Molekulargewicht = 20 000 – 100 000), und Polyvinylpyrrolidon (Molekulargewicht = 20 000 – 100 000). Unnötig zu sagen, dass diese höher-molekulargewichtigen Verbindungen entweder alleine oder in Kombination verwendet werden können.

Die hochmolekulargewichtigen Verbindungen, welche weiter oben angegeben worden sind, werden vorzugsweise in Mengen von 1 – 20 000 Gew.-Teilen pro Gew.-Teil an G-CSF verwendet.

Zusätzlich zum Oberflächenmittel, dem Saccharid, dem Protein oder der höher-molekulargewichtigen Verbindung, welche alle weiter oben beschrieben worden sind, kann noch

wenigstens ein Bestandteil, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Aminosäure, einem Schwefel-reduzierenden Mittel und einem Antioxidationsmittel, bei der Herstellung des G-CSF enthaltenden pharmazeutischen Präparates der vorliegenden Erfindung inkorporiert werden. Illustrative Aminosäuren umfassen Glycin, Threonin, Tryptophan, Lysin, Hydroxylysin, Histidin, Arginin, Cystein, Cystin, und Methionin. Illustrative Schwefel-reduzierende Mittel umfassen: N-Acetylcystein, N-acetylhomocystein, Thioctinsäure, Thiodiglycol, Thioethanolamin, Thioglycerol, Thiosorbitol, Thioglycolsäure und Salze davon, Natriumthiosulfat, Natriumhydrogensulfit, Natriumpyrosulfit, Natriumsulfit, Thiomilchsäure, Dithiothreitol, Glutathion, und ein mildes Schwefel-reduzierendes Mittel, welches eine Sulfhydrylgruppe hat, wie etwa eine C_1-C_7-Thioalkansäure. Illustrative Antioxidationsmittel umfassen Erythorbinsäure, Dibutylhydroxytoluol, Butylhydroxyanisol, dl-α-Tocopherol, Tocopherol-acetat, L-Ascorbinsäure und Salze davon. L-Ascorbinsäure-palmitat, L-Ascorbinsäure-stearat, Triamyl-gallat, Propyl-gallat und Chelierungsmittel, wie etwa Dinatriumethylendiamintetraacetat (EDTA), Natriumpyrophosphat und Natriummetaphosphat.

Die weiter oben angegebenen Aminosäuren, Schwefel-reduzierenden Mittel und Antioxidationsmittel oder Gemische davon werden vorzugsweise in Mengen von 1 – 10 000 Gew.-Teilen pro Gew.-Teil an G-CSF verwendet.

Für den Zweck der Formulierung des stabilen, G-CSF enthaltenden Präparates der vorliegenden Erfindung in eine geeignete Dosierungsform kann eines oder mehrere der folgenden Bestandteile inkorporiert werden: Ein Verdünnungsmittel, eine Löslichkeitshilfe, ein isotonisches Mittel, ein Arzneimittelträger, ein pH-Wertmodifikator, ein schmerzlinderndes Mittel, und ein Buffer.

Das stabilisierte G-CSF pharmazeutische Präparat der vorliegenden Erfindung kann entweder für die orale Verabfolgung oder für die parenterale Verabfolgung formuliert sein, wie etwa durch Injektion, angewendet in verschiedenen Wegen, und eine Vielzahl von Verabfolgungsformen kann verwendet werden, und zwar in Abhängigkeit von der spezifischen Art der Verabfolgung. Typische Dosierungsformen umfassen: Jene, welche für die orale Verabfolgung bestimmt sind, wie etwa Tabletten, Pillen, Kapseln, Granulate und Suspensionen; Lösungen, Suspensionen und gefriergetrocknete Präparate, hauptsächlich bestimmt für intravenöse Injektion, intramuskuläre Injektion, subkutane Injektion und intrakutane Injektion; und jene, welche für die transmukosale Verabfolgung bestimmt sind, wie etwa rektale Suppositorien, nasale Arzneimittel, und vaginale Suppositorien.

Entsprechend der vorliegenden Erfindung wird wenigstens eine Substanz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Oberflächenmittel, einem Saccharid, einem Protein oder einer hochmolekulargewichtigen Verbindung zu einem G-CSF enthaltenden pharmazeutischen Präparat hinzugegeben, so dass dieses daran gehindert wird, an der Wand seines Behälters oder einer Spritze absorbiert zu werden, währenddem es gleichzeitig stabil über eine verlängerte Zeitspanne bleibt.

Der detaillierte Mechanismus, mit welchem die weiter oben erwähnten Substanzen den G-CSF stabilisieren oder ihn daran hindern, absorbiert zu werden, muss noch geklärt werden. In der Gegenwart eines Oberflächenmittels würde die Oberfläche vom G-CSF, welcher ein hydrophobes Protein ist, mit dem Oberflächenmittel bedeckt, um solubilisiert zu werden, so dass der G-CSF, welcher in einer Spurenmenge vorhanden ist, wirksam daran gehindert wird, an der Wand seines Behälters oder einer Spritze absorbiert zu werden. Ein Saccharid oder eine hydrophile hoch-molekulargewichtige Verbindung würde eine hydratisierte Schicht zwischen G-CSF und der adsorptiven Oberfläche der Wand des Behälters oder einer Spritze bilden, wobei die Adsorption von G-CSF in einer wirksamen Art verhindert wird. Ein Protein würde mit dem G-CSF bezüglich der Adsoption an der Wand seines Behälters oder einer Spritze konkurrieren, wobei die Adsorption von G-CSF wirksam verhindert wird.

Neben der Verhinderung der G-CSF Adsorption tragen die oben erwähnten Substanzen auch zur Verhinderung der Assoziation oder Polymerisation der G-CSF Moleküle bei. In der Gegenwart eines Oberflächenmittels, Saccharides, Proteines oder hoch-molekulargewichtigen Verbindung werden die einzelnen Moleküle von G-CSF in diesen Substanzen dispergiert, und die Interaktion zwischen den G-CSF-Molekülen wird genügend reduziert, um eine signifikante Abnahme der Wahrscheinlichkeit ihrer Assoziation oder Polymerisation zu bewirken. Zusätzlich verzögern diese Substanzen die Autoxidation von G-CSF, welche bei hohen Temperaturen oder Luftfeuchtigkeit beschleunigt wird, oder sie hindern G-CSF daran, assoziiert oder polymerisiert zu werden, als ein Resultat der Autoxidation. Diese Effekte der Verzögerung der Autoxidation von G-CSF oder der Verhinderung der Assoziation oder Polymerisation werden weiter begünstigt durch die Hinzugabe einer Aminosäure, eines Schwefel-reduzierenden Mittels oder eines Antioxidationsmittels.

Die weiter oben beschriebenen Probleme treten speziell in Lösungen für Injektionen und in Suspensionen auf, aber sie treten auch während des Verfahrens der Formulierung von G-CSF in anderen Dosierungsformen, wie etwa Tabletten, auf. Die Hinzugabe von Oberflächenmitteln, Sacchariden, Proteinen oder hoch-molekulargewichtigen Verbindungen ist auch in diesem letzteren Fall wirksam.

Durch die Hinzugabe wenigstens einer Substanz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Oberflächenmittel, Saccharid, Protein und einer hoch-molekulargewichtigen Verbindung, wird G-CSF stark stabilisiert und behält seine Aktivität für eine verlängerte Zeitspanne, wie dies in den folgenden Beispielen gezeigt wird. Zur Erzielung dieser Resultate ist die Menge von jeder dieser Substanzen, im speziellen deren untere Grenze, kritisch, und die folgenden Bereiche sind wünschbar: 1 – 10 000 Gew.-Teile an Oberflächenmittel, 1 – 10 000 Gew.-Teile an Saccharid, 1 – 20 000 Gew.-Teile an Protein, und 1 – 20 000 Gew.-Teile an hoch-molekulargewichtiger Verbindung, pro 1 Gew.-Teil an G-CSF.

Gemäss der vorliegenden Erfindung wird ein Oberflächenmittel, ein Saccharid, ein Protein und/oder eine hochmolekulargewichtige Verbindung in einer spezifizierten Konzentration verwendet, und dies ist nicht nur wirksam bei der Verhinderung von G-CSF, an der Wand seines Behälters oder einer Spritze absorbiert zu werden, sondern auch bei der Begünstigung der Stabilität eines G-CSF enthaltenden pharmazeutischen Präparates. Als ein Resultat davon wird es möglich, die Verabfolgung einer kleinen aber hochpräzisen Dosis an G-CSF an Patienten sicherzustellen. Weil G-CSF teuer ist, führt seine effiziente Verwendung zu niedrigen Kosten bei der Herstellung von G-CSF enthaltenden pharmazeutischen Präparaten.

Die folgenden Beispiele dienen dem Zwecke der weiteren Illustration der vorliegenden Erfindung, und sie sollen in keinem Sinn als begrenzend betrachtet werden. In diesen Beispielen wurde die übrigbleibende Aktivität an G-CSF bestimmt mittels einem der folgenden Verfahren.

(a) Weiche Agar-Methode unter Verwendung von Mäuseknochenmarkzellen:

Ein Pferdeserum (0,4 ml), 0,1 ml der Probe, 0,1 ml einer C3H/He (weiblichen) Mäuseknochenmarkzellensuspension ($0,5-1 \times 10^5$ nukleare Zellen), und 0,4 ml einer modifizierten McCoy's 5A Kulturlösung, enthaltend 0,75% an Agar,

wurden miteinander vermischt, in ein Kunststoffgefäss für Gewebekulturen (35 mm∅), geleert, coaguliert, und während 5 Tagen bei einer Temperatur von 37 °C in 5% CO_2/95% Luft und einer 100%igen Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Anzahl an gebildeten Kolonien wurde gezählt (eine Kolonie bestand aus wenigstens 50 Zellen), und die Aktivität wurde bestimmt mit einer Einheit, welche die Aktivität ist für die Bildung einer Kolonie.

Die modifizierte McCoy's 5A Kulturlösung, welche in der Methode (a) verwendet wurde, wurde durch die folgenden Verfahren hergestellt.

Modifizierte McCoy's 5A Kulturlösung
(doppelte Konzentration)

12 g an McCoy's 5a Kulturlösung (Gibco), 2,55 g an MEM Aminosäure-Vitaminmedium (Nissui Seiyaku Co., Ltd.), 2,18 g an Natriumbicarbonat und 50 000 Einheiten an Kalium-Penicillin G wurden zweimal in 500 ml destilliertem Wasser gelöst, und die Lösung wurde aseptisch durch einen Milliporefilter (0,22 µm) filtriert.

(b) «Reverse-phase» HPLC (high-performance liquid chromatography:

Unter Verwendung einer «reverse-phase» C8 Säule (4,6 mm × 300 mm; 5 µm) und einem n-Propanol/Trifluoressigsäure-Gemisch als mobile Phase wurde die übrigbleibende Aktivität von G-SCF (injiziert in einer Menge equivalent zu 1 µg) bestimmt unter den folgenden Gradientbedingungen.

Zeit (Sek.)	Lösungsmittel (A)	Lösungsmittel (B)	Gradient
0	100%	0%	linear
15	0%	100%	
25	100%	0%	linear

Lösungsmittel (A): 30% n-Propanol und 0,1% Trifluoressigsäure
Lösungsmittel (B): 60% n-Propanol und 0,1% Trifluoressigsäure

Der Nachweis wurde ausgeführt bei einer Wellenlänge von 210 nm, und der prozentmässige Anteil der übrigbleibenden G-CSF Aktivität wurde mittels der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Übrigbleibende G-CSF Aktivität (\%)} = \frac{\text{übrigbleibende Menge an G-CSF nach dem Ablauf einer gegebenen Zeit}}{\text{anfängliche Menge an G-CSF}} \times 100$$

Die übrigbleibende Menge an G-CSF, bestimmt mittels diesem Verfahren, korrelierte sehr gut mit dem Resultat, welches erhalten wurde bei der Messung mit der weichen Agarmethode (a) unter Verwendung von Mäuseknochenmarkzellen.

Beispiel 1

Zu 5 µg an G-CSF wurde eines der Stabilisierungsmittel, welche in Tabelle 1 aufgelistet sind, hinzugegeben, und das Gemisch wurde aseptisch gelöst in einer 20 mM Bufferlösung (enthaltend 100 mM Natriumchlorid; pH 7,4), um ein pharmazeutisches Präparat herzustellen, enthaltend 5 µg G-CSF pro ml, welches anschliessend gefriergetrocknet wurde. Die zeitabhängige Veränderung der G-CSF Aktivität wurde mittels der Methode (a) gemessen, und die Resultate werden in der Tabelle 1 gezeigt. Der Ausdruck «Aktivität (%)» in der Tabelle stellt die übrigbleibende Aktivität an G-CSF dar, relativ zur anfänglichen Einheit, und wird definiert durch die folgende Formel:

$$\text{Aktivität (\%)} = \frac{\text{Aktivitäteinheit nach dem Ablauf einer gegebenen Zeit}}{\text{anfängliche Aktivitätseinheit}} \times 100$$

Die Gefriertrocknung wurde durch die folgenden Verfahren ausgeführt:

Die G-CSF-Lösung, enthaltend ein Stabilisierungsmittel, wurde in ein steriles, sulfa-behandelndes Glasfläschchen gegeben, auf eine Temperatur von −40 °C oder darunter während 4 Stunden gefroren, dann einem ersten Trocknen mittels Erwärmung von −40 °C auf 0 °C während einer Zeitspanne von 48 Stunden unter einem Druck, welcher von 0,03 auf 0,1 Torr erhöht wurde, dann einem zweiten Trocknen mittels Erwärmung von 0 °C auf 20 °C während einer Zeitspanne von 12 Stunden unter einem Druck, welcher von 0,03 auf 0,08 Torr erhöht wurde, unterworfen, wonach das Innere des Glasfläschchens mit einem sterilen trockenen Stickstoffgas gefüllt wurde, um einen atmosphärischen Druck zu erhalten, und das Glasfläschchen wurde mit einem Gefriertrocknungsgummistopfen verschlossen und anschliessend mit einer Aluminiumkappe abgedichtet.

Tabelle 1

Stabilisierungsmittel	Menge (Gew.-Teile)	Aktivität (%)	
		Nach Lagerung bei 4 °C während 6 Monaten	Nach Lagerung bei 37 °C während 1 Monat
Xylitol	10,000	92	86
Mannitol	10,000	91	85
Glucuronsäure	10,000	86	82
Hyaluronsäure	2,000	92	89
Dextran (Molekulargewicht 40 000)	2,000	95	90
Heparin	5,000	85	80
Chitosan	2,000	93	91
Alginsäure	2,000	90	90
menschliches Serum-albumin	1,000	98	99
menschliches Serum-globulin	1,000	98	95
säurebehandeltes Gelatin	2,000	97	95
alkali-behandeltes Gelatin	1,000	99	96
Collagen	2,000	95	90

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Stabilisierungsmittel	Menge (Gew.-Teile)	Aktivität (%)	
		Nach Lagerung bei 4 °C während 6 Monaten	Nach Lagerung bei 37 °C während 1 Monat
Polyethylenglycol (Molekulargewicht 4 000)	10,000	94	90
Hydroxypropyl-cellulose	1,000	98	94
Natrium-carboxymethylcellulose	1,000	88	80
Hydroxymethyl-cellulose	5,000	92	90
Polyvinyl-alkohol (Molekulargewicht 50 000)	2,000	96	95
Polyvinylpyrrolidon (Molekulargewicht 50 000)	2,000	95	94
menschliches Serum-albumin	2,000		
Mannitol	2,000	100	97
Cystein	100		
menschliches Serum-albumin	2,000		
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat	100	99	96
Mannitol	2,000		
menschliches Serum-albumin	2,000		
Hydroxypropyl-cellulose	500	98	92
Dextran (Molekulargwicht 40 000)	2,000		
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat	100		
Sorbitol	2,000	98	96
Polyoxyethyliertes gehärtetes Rizinusöl	100		
Dextran (Molekulargewicht 40 000)	2,000	94	92
nichts hinzugegeben	–	74	58

Beispiel 2

Zu 10 µg an G-CSF wurde eines der Stabilisierungsmittel, welche in Tabelle 2 aufgelistet sind, hinzugegeben, und das Gemisch wurde aseptisch gelöst in einer 20 mM Phosphatbufferlösung (enthaltend 100 mM Natriumchlorid; pH 7,4), um ein pharmazeutisches Präparat herzustellen, enthaltend 10 µg an G-CSF pro ml. Das Präparat wurde aseptisch in ein sulfa-behandeltes Glasfläschchen gegeben und abgedichtet, um eine G-CSF-Lösung herzustellen. Die zeitabhängige Veränderung in der Aktivität an G-CSF in dieser Lösung wurde mittels dem gleichen Verfahren gemessen, wie in Beispiel 1 verwendet, und die Resultate sind in der Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2

Stabilisierungsmittel	Menge (Gew.-Teile)	Aktivität (%)		
		Nach Lagerung bei 4 °C während 7 Tagen	Nach Lagerung bei 4 °C während 2 Monaten	Nach Lagerung bei Raumtemperatur während 1 Monat
Mannitol	5,000	91	87	82
Hyaluronsäure	2,000	93	87	70
Dextran (Molekulargewicht 40 000)	2,000	96	95	85
Glycerin	10,000	90	90	88
Neuraminsäure	5,000	93	91	84
Chitin	2,000	95	92	86
Dextrin	2,00	90	92	87
menschliches Serum-albumin	1,000	99	95	92
menschliches Serum-globulin	1,000	98	94	90
säurebehandeltes Gelatin	2,000	97	96	87
alkalibehandeltes Gelatin	500	99	95	92
Collagen	2,000	99	94	88
Polyethylenglycol (Molekulargewicht 40 000)	10,000	94	89	90
Hydroxypropyl-cellulose	2,000	98	95	92
Natrium-carboxymethyl-cellulose	2,000	92	91	80
Hydroxyethyl-cellulose	4,000	92	94	90
Polyvinyl-alkohol (Molekulargewicht 50 000)	4,000	97	93	90
Polyvinylpyrrolidon (Molekulargewicht 50 000)	4,000	95	95	92
Sorbitan-monolaurat	400	97	96	95
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat	400	100	96	94
Polyoxyethylen-sorbitan-monostearat	400	98	97	94
Polyoxyethylen Polyoxypropylen Glycolether	400	100	94	93

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Stabilisierungsmittel	Menge (Gew.-Teile)	Aktivität (%)		
		Nach Lagerung bei 4 °C während 7 Tagen	Nach Lagerung bei 4 °C während 2 Monaten	Nach Lagerung bei Raumtemperatur während 1 Monat
Polyoxyethyliertes gehärtetes Rizinusöl	400	99	98	90
Natrium-lauryl-sulfat	2,000	97	93	87
Lecithin	2,000	97	94	90
menschliches Serum-albumin	2,000			
Mannitol	2,000	100	99	97
Cystein	100			
menschliches Serum-albumin	2,000			
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat	100	99	97	95
Mannitol	2,000			
menschliches Serum-albumin	1,000			
Hydroxypropyl-cellulose	500	99	97	95
Dextran (Molekulargewicht 40 000)	2,000			
Polyoxyethylen-sorbitan-monopalmitat	100	96	96	93
Sorbitol	2,000			
Polyoxyethyliertes gehärtetes Rizinusöl	100	95	92	92
Dextran (Molekulargewicht 40 000)	2,000			
nichts hinzugegeben	–	72	61	47

Beispiel 3

Zu 10 µg G-CSF wurde eines der Stabilisierungsmittel, welche in Tabelle 3 aufgelistet sind, hinzugegeben, und das Gemisch wurde in einer 20 mM Phosphatbufferlösung (enthaltend 100 mM Natriumchlorid; pH 7,4) gelöst, um ein pharmazeutisches Präparat herzustellen, enthaltend 10 µg an G-CSF pro ml. Ein Milliliter des Präparates wurde in ein sulfa-behandeltes, Silikon-beschichtetes Glasfläschchen gegeben und bei einer Temperatur von 4 °C gelassen. Die Wirksamkeit von jenem Stabilisierungsmittel bei der Verhinderung der G-CSF Adsorption wurde evaluiert mittels Messung der übrigbleibenden Aktivität an G-CSF in der Lösung nach 0,5, 2 und 24 Stunden. Die Messung wurde gemäss Methode (b) ausgeführt unter Verwendung von «reverse-phase» HPLC (high-performance liquid chromatography). Die Resultate sind in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3

Stabilisierungsmittel	Menge (Gew.-Teile)	Übrigbleibende Aktivität (%)			
		anfänglich	0,5 h	2 h	24 h
Mannitol	5,000	100	93	90	91
Hyaluronsäure	2,000	100	97	92	92
Dextran (Molekulargewicht 40 000)	2,000	100	98	95	96
Glycerin	10,000	100	94	91	90
Heparin	2,000	100	92	90	90
Glucuronsäure	5,000	100	96	90	91
Ketoglycolsäure	5,000	100	92	88	90
menschliches Serum-albumin	1,000	100	100	101	99
menschliches Serum-globulin	1,000	100	98	100	98
alkali-behandeltes Gelatin	500	100	99	98	99
säurebehandeltes Gelatin	2,000	100	99	97	97
Collagen	2,000	100	100	98	99
Polyethylenglycol (Molekulargewicht 4 000)	10,000	100	100	100	99
Hydroxypropyl-cellulose	2,000	100	100	100	99
Natriumcarboxymethyl-cellulose	2,000	100	98	96	95
Hydroxyethyl-cellulose	4,000	100	96	93	92
Polyvinylalkohol (Molekulargewicht 50 000)	4,000	100	99	100	98
Polyvinylpyrrolidon (Molekulargewicht 50 000)	4,000	100	98	98	96
Sorbitan-monocaprylat	400	100	100	100	98
Polyoxyethylen-sorbitan-monstearat	400	100	100	98	100
Polyoxyethyliertes gehärtetes Rizinusöl	400	100	99	101	99
Natriumlaurylsulfat	2,000	100	100	99	97
Lecithin	2,000	100	99	100	98
menschliches Serum-albumin	2,000				
Mannitol	2,000	100	100	100	101
Cystein	100				

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Stabilisierungsmittel	Menge (Gew.-Teile)	Übrigbleibende Aktivität (%)			
		anfänglich	0,5 h	2 h	24 h
menschliches Serum-albumin	2,000				
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat	100	100	100	98	99
Mannitol	2,000				
menschliches Serum-albumin	1,000				
Hydroxypropyl-cellulose	500	100	101	99	100
Dextran (Molekulargewicht 40 000)	2,000				
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat	100	100	100	99	99
Sorbitol	2,000				
Polyoxyethyliertes gehärtetes Rizinusöl	100	100	100	98	97
Dextran (Molekulargewicht 40 000)	2,000				
nichts hinzugegeben	–	100	91	72	73