FI000106433B



(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 106433 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **15.02.2001**

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

A61K 38/19, 9/14, 9/72

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **925163**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **13.11.1992**

(24) Alkupäivä - Löpdag **13.03.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **13.11.1992**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/US92/02126**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

15.03.1991 US 669792 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 •Amgen Inc., Amgen Center, 1840 Dehavilland Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1789, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Platz,Robert M., 324 Valdez Avenue, Half Moon Bay, CA 94019, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Winters,Mark A., 700 Chiquita Avenue, Mountain View, CA 94041, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •Pitt,Colin G., 2379 Leeward Circle, Thousand Oaks, CA 91361, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä farmaseuttisen formulaation valmistamiseksi, joka soveltuu granulosyyttipesäkkeitä stimuloivan tekijän antamiseen keuhkojen kautta
Förfarande för framställning av en farmaceutiskt komposition, vilken lämpar sig för pulmönär dispensering av granulocytkolonistimulerande factor

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

—

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Jyvässolupesäkkeitä stimuloivaa tekijää (G-CSF) voidaan kuljettaa systeemisesti terapeuttisesti tai ehkäisevästi tehokkaina määrinä annolla keuhkoihin käyttäen erilaisia keuhkoihinkuljetuslaitteita, mukaan lukien sumuttimia, mitta-annosinhalaattoreita ja jauheinhalaattoreita. Aerosolianto tämän keksinnön mukaan johtaa neutrofiilitasojen merkittävään kohoamiseen, jota voidaan edullisesti verrata kuljetukseen ihonalaisella ruiskeella. G-CSF:ää voidaan antaa tällä tavalla neutrofiilien vähäisen määrän veressä lääkkeelliseksi hoitamiseksi sekä tartuntojen vastaisessa taistelussa tai ehkäisyssä.

En granulocytkolonistimulerande faktor (G-CSF) kan levereras systematiskt i terapeutiska eller förebyggande mängder genom pulmonär administration under användning av ett flertal olika pulmonära tillförselanordningar, vilka inkluderar nebulisatorer, doserande inhalatorer och pulverinhalatorer. Aerosoladministration i enlighet med denna uppfinning resulterar i märkbar höjning av de neutrofila nivåerna, vilka nivåer gott kan jämföras med tillförsel genom subkutan injektion. G-CSF kan administreras på detta sätt för att medicinskt behandla neutropeni och för bekämpning eller förhindrande av infektioner.

Menetelmä farmaseuttisen formulaation valmistamiseksi, joka soveltuu granulosyyttipesäkkeitä stimuloivan tekijän antamiseen keuhkojen kautta

Keksinnön aihepiiri

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää farmaseuttisen formulaation valmistamiseksi, joka soveltuu G-CSF:n antamiseen keuhkojen kautta.

Tässä kuvataan myös terapeuttisen proteiinin antamista keuhkoihin, ja tarkemmin ottaen terapeuttisesti tehokkaiden määrien jyvässolupesäkkeitä stimuloivaa tekijää (G-CSF) systeemistä antamista hengitysjärjestelmän kautta.

Keksinnön tausta

G-CSF on hormonin kaltainen glykoproteiini, joka säätää verisolujen muodostumista ja jota tarvitaan luuytimessä tavattavien normaalien verisolumuodostusprekursorisolujen kloonikasvuun ja kypsymiseen; Welte et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 82 (1985) 1526 - 1530. Spesifisemmin G-CSF:n esiintyessä alhaisina pitoisuuksina sen tiedetään stimuloivan neutrofiilijyvässolupesäkkeiden tuotantoa käytettynä in vitro. G-CSF:n tiedetään samoin tehostavan neutrofiilimigraatiota; Gabrilove, J., Seminars in Hematology 26:2 (1989) 1 - 4. Lisäksi G-CSF voi merkittävästi lisätä neutrofiilien kykyä tappaa kasvainsoluja in vitro vasta-ainevälitteisen solusytotoksisuuden välityksellä; Souza et al., Science 232 (1986) 61 - 65.

Ihmisissä endogeenistä G-CSF:ää voidaan todeta veriplasmassa; Jones et al., Bailliere's Clinical Hematology 2:1 83 - 111. G-CSF:ää tuottavat sidekudosmuodostussolut, makrofagit, T-solut, alkiota ympäröivät solukerrokset, joista suonikalvo muodostuu, endoteelisolut ja epiteelisolut, ja se on ilmennystuote yksikopiogeenistä, joka koostuu neljästä eksonista ja viidestä intronista ja sijaitsee kromosomissa 17. Tämän paikan kopiointi tuottaa mRNA-lajin, joka prosessoidaan differentiaalisesti, jol-

loin tuloksena on kahden muodon G-CSF:ää ilmennys, joista yhden muodon kypsä pituus on 177 aminohappoa ja toisen kypsä pituus on 174 aminohappoa. 174 aminohaposta koostuvalla muodolla on todettu olevan suurin spesifinen biologinen aktiivisuus in vivo. G-CSF on lajiristireaktiivinen siten, että kun ihmis-G-CSF:ää annetaan toiselle nisäkäälle kuten hiirelle, koiralle tai apinalle, kehittyy jatkuva neutrofiilivalkosolujen runsas esiintyminen veressä; Moore et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 84 (1987) 7134 - 7138.

Ihmis-G-CSF:ää voidaan saada ja puhdistaa lukuisista lähteistä. Luonnollinen ihmis-G-CSF (nhG-CSF) voidaan eristää viljeltyjen ihmiskasvainsolulinjojen supernatanteista. Yhdistelmä-DNA-teknologian kehitys, katso esimerkiksi US-patenttijulkaisu 4 810 643 (Souza), joka sisällytetään tähän viitteeksi, on mahdollistanut G-CSF:n tuotannon kaupallisessa mittakaavassa glykosyloidussa muodossa tuotteena ilmennyksestä eukaryoottisessa isäntäsolussa, ja G-CSF:n ei-glykosyloidussa muodossa tuotteena ilmennyksestä prokaryoottisessa isäntäsolussa. G-CSF:n on todettu olevan käyttökelpoinen syövän hoidossa, keinona stimuloida neutrofiilituotantoa kemoterapiasta tai sädeterapiasta seuranneiden verisolumuodostusvajeiden kompensoimiseksi. G-CSF:n tehokas käyttö terapeuttisena aineena edellyttää, että potilaille annetaan systeemisiä annoksia proteiinia. Tällä hetkellä ruoansulatuskanavan ulkopuolinen anto laskimonsisäisen, lihaksensisäisen tai ihonalaisen ruiskeen välityksellä on edullinen antotie ihmisille ja on tähän asti vaikuttanut olevan ainoa käytännöllinen tapa terapeuttisesti merkittävien määrien G-CSF:ää kuljettamiseksi verenkiertoon, vaikkakin yrityksiä on tehty koskien kuljetusta suun kautta; katso esimerkiksi Takada et al., Chem.Pharm.Bull. 37:3 (1989) 838 - 839.

Suhteellisen suurten molekyylien kuljetus keuhkoihin ei ole tuntematonta, joskin on vain muutamia esimerkkejä, joilla on kvantitatiivista tukea. Leuprolidiasetaatti on nonapeptidi, jolla on luteinisoivan hormonin vapautumista säätelevä hormoni - (LHRH-) agonistiaktiivisuutta ja jonka saatavuus suun kautta on alhainen. Tutkimukset eläimillä viittaavat siihen, että aerosolikoostumuksen leuprolidiasetaattia sisäänhengitys johtaa merkityksellisiin tasoihin veressä; Adjei et al., Pharmaceutical Research 7:6 (1990) 565 - 569; Adjei et al., International Journal of Pharmaceutics 63 (1990) 135 - 144.

Endoteliini-1:n (ET-1), joka on endoteelisolujen tuottama 21 aminohapon verisuonia supistava peptidi, on todettu alentavan valtimoverenpainetta annettuna marsuille aerosolina; Braquet et al., Journal of Cardiovascular Pharmacology 13:5 (1989) 143 - 146.

Ihmisplasma-α1-antitrypsiinin kuljetuksen keuhkojärjestelmään aerosoliantoa käyttäen toteuttamiskelpoisuuden osan lääkkeestä päästessä systeemiseen kiertoon ovat raportoineet Hubbard et al., Annals of Internal Medicine 3:3 (1989) 206 - 212.

α1-proteinaasi-inhibiittorin annon keuhkoihin on todettu koirilla ja lampailla johtavan osan tästä aineesta pääsyyn verenkiertoon; Smith et al., J.Clin.Invest. 84 (1989) 1145 - 1146.

Kokeet koe-eläimillä ovat osoittaneet, että aerosolina annettu yhdistelmä-DNA-ihmiskasvuhormoni imeytyy nopeasti keuhkosta ja tuottaa nopeamman kasvun, jota voidaan verrata ihonalaisella ruiskeella tavattuun; Oswein et al., "Aerosolization of Proteins" (suom. "Proteiinien aerosolisointi"), Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Kolorado, maaliskuu 1990. Yhdistelmä-DNA-muotoja sytokiineistä gamma-interferoni (IFN-gamma) ja kasvainkuoliotekijä-α (TNF-α) on niinikään ha-

vaittu verenkierrossa aerosoliannon keuhkoon jälkeen; Debs et al., The Journal of Immunology 140 (1988) 3482 - 3488.

Yhteenveto keksinnöstä

Keksinnön mukaiselle menetelmälle farmaseuttisen formulaation valmistamiseksi, joka soveltuu G-CSF:n antamiseen keuhkojen kautta, on tunnusomaista se, että

(a) G-CSF liuotetaan veteen, mahdollisesti yhdessä puskurin ja yksinkertaisen sokerin ja pinta-aktiivisen aineen kanssa, ja täytetään sumuttimeen, tai

(b) G-CSF kuivan jauheen muodossa suspendoidaan ponneaineeseen pinta-aktiivisen aineen avulla ja täytetään mitta-annos-inhalaattorilaitteeseen, tai

(c) G-CSF kuivan jauheen muodossa, mahdollisesti yhdessä täyteaineen kanssa, täytetään jauheinhalaattorilaitteeseen.

On havaittu, että G-CSF:ää voidaan antaa systeemisesti nisäkkäälle keuhkojen kautta. Tyypillisesti tämä suoritetaan ohjaamalla virtana terapeuttisesti tehokas määrä G-CSF:ää sisään hengittävän nisäkkään suuonteloon. Merkittävästi ja yllättävästi huomattavia määriä G-CSF:ää asettuu tällöin keuhkoon ja imeytyy keuhkosta verenkiertoon, mistä seurauksena veren neutrofiilitasot kohoavat. Lisäksi tähän päästään ilman, että joudutaan turvautumaan erityisiin toimenpiteisiin, kuten käyttämään imeytymistä tehostavia aineita tai proteiinijohdannaisia, jotka on spesifisesti suunniteltu parantamaan imeytymistä. G-CSF:n antaminen keuhkoihin antaa täten käyttöön tehokkaan ei-invasiivisen vaihtoehdon G-CSF:n systeemiselle annolle ruiskeena.

Tässä kuvattavaa menetelmää voidaan harjoittaa käyttäen mitä tahansa puhdistettua eristettyä polypeptidiä, jolla on luonnollisesti esiintyvän G-CSF:n primaarirakennekonformaatio osittain tai kokonaisuudessaan (eli jatkuva aminohappotähteiden sekvenssi) ja sen yksi tai useampi biologinen ominaisuus. Lukuisissa julkaisuissa

kuvataan menetelmiä G-CSF:ien tuottamiseksi, mukaan lukien edellä mainittu Souza-patentti ja Welten et al. ja Nicolan et al. julkaisut.

Yleensä ottaen tämän keksinnön mukaisesti valmistetun formulaation käytännössä käyttökelpoinen G-CSF voi olla natiivi muoto, joka on eristetty puhtaana nisäkäsorganismeista, tai vaihtoehtoisesti tuote kemiallisen synteesin menettelyistä tai genomi- tai cDNA-kloonauksella tai geenisynteesillä saatujen eksogeenisten DNA-sekvenssien ilmennyksestä prokaryoottisessa tai eukaryoottisessa isännässä. Sopivia prokaryoottisia isäntiä ovat erilaiset bakteeri- (esim. E. coli -) solut. Sopivia eukaryoottisia isäntiä ovat hiiva- (esim- S. cerevisiae-) ja nisäkäs- (esim. kiinalaisen hamsterin munasarja-, apina-) solut. Käytetystä isännästä riippuen G-CSF-ilmennystuote voi olla glykosyloitu nisäkkään tai muilla eukaryoottisilla hiilihydraateilla, tai se voi olla ei-glykosyloitu. G-CSF-ilmennystuote voi myös sisältää alussa metioniiniaminohappotähteen (asemassa -1). Tässä kuvataan minkä tahansa tällaisen G-CSF-muodon ja kaikkien tällaisten G-CSF-muotojen käyttöä, vaikka yhdistelmä-G-CSF, etenkin E. colista saatu, on edullinen suurimman kaupallisen käytännöllisyyden syistä.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistetun farmaseuttisen formulaation yhteydessä voidaan käytännössä käytettäviksi voidaan harkita laajaa valikoimaa terapeuttisten tuotteiden kuljetukseen keuhkoihin suunniteltuja mekaanisia laitteita, mukaan lukien, mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta, sumuttimet, mitta-annosinhalaattorit ja jauheinhalaattorit, jotka kaikki ovat tuttuja alan ammattilaisille.

Joitakin spesifisiä esimerkkejä kaupallisesti saatavana olevista laitteista, jotka sopivat käytettäviksi keksinnön mukaisesti valmistetun farmaseuttisen formulaation yhteydessä, ovat Ultravent-sumutin, jota valmistaa

Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; Acorn II -sumutin, jota valmistaa Marquest Medical Products, Englewood, Kolorado; Ventolin-mitta-annosinhalaattori, jota valmistaa Glaxo Inc., Research Triangle Park, Pohjois-Karoliina; ja Spinhaler-jauheinhalaattori, jota valmistaa Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Kaikki tällaiset laitteet edellyttävät koostumusten käyttöä, jotka sopivat G-CSF:n jakamiseen. Tyypillisesti kukin koostumus on spesifinen käytetylle laitetyypille ja siihen saattaa liittyä tarkoituksenmukaisen ponneaineen käyttö tavallisten laimentimien, lisäaineiden ja/tai kantajien ohella, jotka ovat käyttökelpoisia G-CSF-terapiassa. Nyt kuvataan G-CSF-koostumuksia, joita voidaan käyttää tavallisimman tyyppisissä keuhkojakelulaitteissa tämän keksinnön harjoittamiseksi.

Sumutin-G-CSF-koostumus

G-CSF-koostumukset, jotka sopivat käytettäviksi sumuttimen, joko suihku- tai ultraääni-, kanssa, käsittävät tyypillisesti G-CSF:ää liuotettuna veteen pitoisuudeksi noin 0,1 - 25 mg G-CSF:ää kohden millilitraa liuosta. Koostumus voi myös sisältää puskuria ja yksinkertaista sokeria (esim. proteiinin stabiloimiseksi ja osmoottisen paineen säätämiseksi). Esimerkkejä puskureista, joita voidaan käyttää, ovat natriumasetaatti, -sitraatti ja glysiini. Edullisesti puskurin koostumus ja molaarisuus sopivat liuoksen säätämiseksi pH:hon 3 - 4. Yleensä puskurin molaarisuudet 2 mM - 50 mM sopivat tähän tarkoitukseen. Esimerkkejä sokereista, joita voidaan käyttää, ovat mannitoli ja sorbitoli, tavallisesti määrinä, jotka ovat 1 - 10 paino-% koostumuksen painosta.

Sumutinkoostumus voi samoin sisältää pinta-aktiivista ainetta proteiinin pintaindusoidun aggregaation vähentämiseksi tai estämiseksi, jonka aiheuttaa liuoksen sumuttuminen aerosolia muodostettaessa. Erilaisia tavanomaisia pinta-aktiivisia aineita voidaan käyttää, kuten

polyoksietyleenirasvahappoestereitä ja -alkoholeja, ja polyoksietyleenisorbitaanirasvahappoestereitä. Määrät ovat yleensä 0,001 - 4 paino-% koostumuksen painosta. Erityisen edullinen pinta-aktiivinen aine tämän keksinnön tarkoituksiin on polyoksietyleenisorbitaanimono-oleaatti.

Mitta-annosinhalaattori-G-CSF-koostumus

G-CSF-koostumukset käytettäviksi mitta-annosinhalaattorilaitteen kanssa käsittävät yleensä hienojakoista jauhetta, joka sisältää G-CSF:n lietettynä ponneaineeseen pinta-aktiivisen aineen avulla. Ponneaine voi olla jokin tähän tarkoitukseen käytetty tavanomainen materiaali, kuten kloorifluorivety, hydrokloorifluorivety, hydrofluorivety, tai hiilivety, mukaan lukien triklooorifluorimetaani, diklooridifluorimetaani, diklooritetrafluorietanoli ja 1,1,1,2-tetrafluorietaani, tai mainittujen yhdistelmä. Sopivia pinta-aktiivisia aineita ovat sorbitaanitrioleaatti ja soijalesitiini. Öljyhappo voi myös olla käyttökelpoinen pinta-aktiivisena aineena.

Jauheinhalaattori-G-CSF-koostumus

G-CSF-koostumukset jaettaviksi jauheinhalaattorilaitteesta käsittävät hienojakoista kuivaa jauhetta, joka sisältää G-SCF:ää, ja ne voivat niinikään sisältää täyteainetta, kuten laktoosia, sorbitolia, sakkaroosia tai mannitolia määrinä, jotka helpottavat jauheen jakamista laitteesta, esim. 50 - 90 paino-% koostumuksesta. G-CSF tulisi edullisimmin valmistaa hiukkasjakoiseen muotoon keskimääräisen hiukkaskoon ollessa alle 10 μm (tai mikronia), edullisimmin 1 - 5 μm, tehokkaimpaan kuljetukseen keuhkon distaaliosaan.

Tässä kuvataan terapeuttisten määrien proteiinia antoa, eli määrien, jotka ovat riittäviä aikaansaamaan neutrofiilitason kohoamisen systeemisessä veressä. Se, mikä muodostaa terapeuttisesti tehokkaan määrän nimenomaisessa tapauksessa, riippuu erilaisista tekijöistä, jotka asiaa tunteva käyttäjä ottaa huomioon, mukaan lukien ky-

seisen kohteen normaali veren neutrofiilitaso, hoidettavan tilan tai sairauden vakavuus, neutrofiilien vähäisyyden veressä aste, kohteen fyysinen kunto jne. Yleensä ottaen seurataan sellaista annostusohjelmaa, että hoitoa saavan yksilön normaali veren neutrofiilitaso palautuu, ainakin tapauksissa, joissa on kyseessä epänormaalin alhaiset tai alentuneet veren neutrofiililuvut. Ihmisille normaali veren neutrofiilitaso on noin 5 000 - 6 000 neutrofiiliä kohden mikrolitraa verta. Ihmisissä neutrofiililukujen alle 1 000 katsotaan yleensä osoittavan vakavaa neutrofiilien vähäisyyttä veressä ja saattavan kohteen vakavaan tartuntavaaraan. Kliiniset tutkimukset syöpäpotilailla, jotka kärsivät kemoterapian aiheuttamasta neutrofiilien vähäisyydestä veressä, ovat osoittaneet, että joka 24. tunti ihonalaisesti ruiskutetut 3 - 5 μg:n/kg annokset ovat tehokkaita akuutisti vajaiden veren neutrofiilitasojen kohottamiseksi yli 1 000:een. Alustavien alla kuvattujen tulosten eläimillä nojalla arvellaan, että useimmille nisäkkäille, mukaan lukien ihmiset, annettu annos keuhkoihin kuljetukseen (jota kutsutaan tässä inhalaatioannokseksi) on noin 3 - 10 kertaa vastaava ihonalainen annos, joka tarvitaan johonkin tiettyyn veren neutrofiilitasoon pääsemiseksi.

Kuten alan ammattilaiset huomaavat, toimintaolosuhteet sopivan inhalaatioannoksen kuljettamiseksi vaihtelevat käytetyn mekaanisen laitteen tyypin mukaan. Joillekin aerosolikuljetussysteemeille, kuten sumuttimille, antotiheyden ja toimintajakson määrää pääasiassa G-CSF:n määrä kohden yksikkötilavuutta aerosolissa. Yleensä ottaen korkeammat proteiinipitoisuudet sumutinliuoksessa ja vastaavasti aerosolissa edellyttävät lyhyempiä toimintajaksoja. Jotkut laitteet kuten mitta-annosinhalaattorit voivat tuottaa korkeampia aerosolipitoisuuksia kuin muut, jolloin niitä käytetään lyhyempiä aikajaksoja halutun tuloksen saamiseksi.

Muita laitteita kuten jauheinhalaattoreja on suunniteltu käytettävän kunnes tietty panos aktiivista materiaalia on poistunut laitteesta. Laitteen panostus koostetaan tämän mukaisesti sisältämään oikean inhalaatioannosmäärän G-CSF:ää kuljetettavaksi yhdellä annolla.

Samalla kun G-CSF on todettu käyttökelpoiseksi tilojen hoitamiseksi, joihin liittyy neutrofiilivajausta, kuten kemoterapiaan liittyvä neutrofiilien vähäisyys veressä, G-CSF:n odotetaan samoin olevan tehokas tartuntojen vastaisissa taisteluissa sekä muiden tilojen tai sairauksien hoidossa, joissa normin yläpuolelle kohotetuista veren neutrofiilitasoista voi seurata lääketieteellistä etua. Kun suoritetaan jatkotutkimuksia, tullaan saamaan tietoja koskien sopivia annostustasoja silmällä pitäen G-CSF:n antamista näissä viimemainituissa tapauksissa. Odotetaan, että keksinnön mukaisesti valmistettu formulaatio tulee olemaan käyttökelpoinen ei-invasiivisena vaihtoehtona useimmissa tapauksissa, joissa G-CSF:ää annetaan terapeuttisesti ruiskeena.

Suppea kuvaus kuvioista

Kuvio 1 on graafinen esitys ihonalaisesti annetun rhG-CSF:n vaikutuksesta veren neutrofiilitasoihin hamstereissa.

Kuvio 2 on pylväsdiagrammi veren neutrofiilitasoista hamstereissa sen jälkeen, kun ne on altistettu aerosoleille, jotka on muodostettu joko Acorn II -sumuttimella tai Ultravent-sumuttimella käyttäen rhG-CSF:n eri pitoisuuksia vesiliuoksessa.

Kuvio 3 esittää vertailua veren neutrofiilitasojen välillä, jotka saadaan tuloksena rhG-CSF:n ihonalaisesta annosta ja aerosoliannosta.

Yksityiskohtainen kuvaus

Kuten mainittiin, G-CSF:n ruoansulatuskanavan ulkopuolisen annon tiedetään aiheuttavan kohoamista neutrofiilien lukumäärässä ääreisveressä. Tutkimuksia suoritet-

tiin sen osoittamiseksi, että yhdistelmä-DNA-ihmis-G-CSF:n (rhG-CSF) sisään hengittäminen aerosolina samoin aiheuttaa nousua veren neutrofiilien lukumäärässä. Käytetty rhG-CSF oli E. colista saatu yhdistelmä-DNA-ilmennystuote, jonka aminohapposekvenssi esitetään edellä mainitun Souza-patentin kuviossa 7 sekvenssin käsittäessä hG-CSF-polypeptidin kokonaan sekä metioniiniryhmän aminopäässä. Se voidaan valmistaa käyttämällä samaa menettelyä kuin kuvataan mainitussa julkaisussa.

Ihonalainen anto hamstereille

Suoritettiin alustavia kokeita, joissa mitattiin muutos neutrofiilien lukumäärässä 4 - 6 viikon ikäisten urospuolisten Golden Syrian -hamsterien (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts) veressä vaihtelevien annosten rhG-CSF:ää ihonalaisen annon jälkeen. rhG-CSF valmistettiin 4 mg/ml liuokseksi steriiliin tislattuun veteen, laimennettiin steriiliin 0,9-%:iseen suolaliuokseen, minkä jälkeen välittömästi ruiskutettiin ihonalaisesti eri tilavuuksia 3 - 5 eläimen testiryhmissä olevien hamsterien alaselkään. 24 tunnin kuluttua verta otettiin kustakin hamsterista sydänpunktiolla halotaaninukutuksessa. Neutrofiilien lukumäärä veressä määritettiin suorittamalla differentiaalisia ja täydellisiä verisolulaskuja. Tulokset näistä kokeista, jotka esitetään kuviossa 1, osoittavat annoksesta riippuvaisen nousun neutrofiilien lukumäärässä 24 tunnin kuluttua rhG-CSF:n ruiskutuksesta, jolloin kohoamista havaitaan annoksilla aina noin 100 µg/kg ruumiinpainoa (µg/kg). Annosvastekuvaaja vaikutti saavuttavan tason suuremmilla annoksilla.

Aerosolin karakterisointi ja anto

Inhalaatioaltistuksia aerosoleille, jotka sisälsivät rhG-CSF:ää, suoritettiin käyttäen pientä eläinaltistuskammiota, jota valmistaa In-Tox Products (Albuquerque, NM). Käytettiin vain eläinkammion keskimmäisiä 12 porttia; äärimmäiset portit eläinkammion aerosolijakeluyksikössä

suljettiin tiiviisti. Käyttäen tätä kammion modifikaatiota sumuttimen tuottama ilma riitti ylläpitämään 10 hamsteria altistuksen aikana. Suodatinnäytteitä otettiin yhdestä eläinportista ja ilman ulospuhalluslinjasta aerosolipitoisuuden mittaamiseksi altistuskammiossa. Aerosolista otettiin näytteitä jäljellä olevasta vapaasta eläinportista, ja hiukkaskokojakaumamittauksia QCM- (kvartsikidemonitori-) kaskadi-impaktorilla (California Instruments, Inc., Sierra Madre, CA) otettiin ajoittain kautta altistuksen. Tämä kaskadi-impaktori imee vain 240 ml/min, mikä mahdollistaa aerosolin hiukkaskokojakauman mittauksen häiritsemättä ilmavirtauskuviota kammiossa.

Ennen eläinaltistustutkimusten suoritusta aerosolipitoisuus ja -hiukkaskokojakauma aerosoleista, jotka oli muodostettu 20 mg:n/ml albumiiniliuoksesta käyttäen joko Ultravent-sumutinta tai Acorn II -sumutinta (molemmat suihkutyyppiä), mitattiin altistuskammiossa. Taulukossa 1 esitetään hiukkaskokojakauma ja keskimääräinen albumiinipitoisuus aerosolissa mitattuina kahdessa kohdassa (nokka ja ulostulo) kammiossa. Ultravent-laite tuotti aerosolin, jossa hiukkaset olivat paljon pienempiä kuin Acorn II -laitteella, mutta Acorn II -laite tuotti paljon konsentroidumman aerosolin. Todettiin, että nämä kaksi sumutinta kuljettivat eläimeen suunnilleen saman määrän proteiinia, kun laitteita käytettiin, kunnes 5 ml:n alkupanos oli tullut ulos ja aerosolinmuodostus häiriintyi (10 tai 15 minuuttia Acorn II -laitteelle riippuen käytetystä ilmavirtausnopeudesta, ja 20 minuuttia Ultravent-laitteelle).

Taulukko 1

Aerosolipitoisuus- ja inhalaatioannosarvioita kahdelle suihkusumuttimelle käytettäessä 20 mg/ml -albumiiniliuosta

Sumutin (ilmavirtaus)	Aerosoli pit. (µg/L+/-SEM)		MMAD (µm)* GSD	Jakso (min)	Kuljetettu annos (µg+/-SEM)
Ultravent	ulostulo	126+/-13	0,93	20	76+/-8
(10 litraa/min)	nokka	141+/-17	3,6	20	85+/-10
Acorn II	ulostulo	239+/-48	2,8	15	107+/-29
(8 litraa/min)	nokka	297+/-2	2,9	15	133+/-3
(10 litraa/min)	ulostulo	362	-	10	109

*MMAD = massamediaaniaerodynaamihalkaisija; GSD = geometrinen standardipoikkeama; SEM = kolmen määrityksen keskiarvon standardipoikkeama.

106433

Arvio hamsteriin aerosolin välityksellä kuljetetun G-CSF:n määrästä inhalaatioaltistuksen sumuttimesta aikana määritettiin seuraavasta yhtälöstä:

$$D = \eta \cdot VC \cdot \Delta t \cdot t$$

jossa D on inhalaatioannos, η on fraktionaalinen kerääntyminen, V on hengitysnopeus, C on aerosolipitoisuus ja Δ-t on antojakso. Käyttämällä sumuttimen mitattua aerosolipitoisuutta (C) ja käyttöjaksoa (Δ-t), sekä lepohengitysnopeutta (V) 30 ml/min täysikasvuiselle hamsterille ja fraktionaalista kerääntymistä (η) 0,5 määritettiin, että G-CSF-pitoisuudet 5 mg/ml - 10 mg/ml sumutinliuosta johtaisivat 100 µg:n/kg (eli 10 µg 100 g:n hamsterille) inhalaatioannokseen. Tämä oli annos, jonka arvioitiin tuottavan maksimaalisen neutrofiilivasteen keuhkojen kautta kuljetettuna.

G-CSF:n anto aerosolina hamstereille

Liuokset, joita käytettiin aerosolialtistusten suorittamiseksi, valmistettiin rekonstituoimalla kylmäkuivattua rhG-CSF:ää steriiliin tislattuun veteen, joka sisälsi 1 mg:n/ml ei-ionista pinta-aktiivista ainetta polyoksietyleenisorbitaanimono-oleaattia. Liuokset, joita käytettiin sumuttimessa altistusaerosolien muodostamiseksi, valmistettiin käyttäen G-CSF:ää pitoisuuksina 1 - 15 mg/ml.

10 hamsterin (täysikasvuisia, urospuolisia Golden Syrian -hamstereita) ryhmiä altistettiin rhG-CSF:ää sisältäville aerosoleille. Hamsterit sijoitettiin pidätysputkiin ja niiden annettiin akklimoitua noin 5 minuutin ajan. Sitten putket työnnettiin altistuskammioon ja aerosolialtistus käynnistettiin. Altistuksen jälkeen hamsterit palautettiin häkkeihinsä ja niille annettiin vapaasti ruokaa ja vettä. Verinäytteitä otettiin 24 tunnin kuluttua altistuksesta, ja veren neutrofiilipitoisuus määritettiin

samalla menettelyllä kuin käytettiin verinäytteiden arvioimiseksi ihonalaisen ruiskeen jälkeen.

Aerosolin pitoisuus ja hiukkaskokojakauma mitattiin kunkin altistuksen aikana. G-CSF-annosta vaihdeltiin altistuksesta toiseen käyttämällä eri G-CSF-pitoisuuksia sumutinliuoksessa.

Hamstereilla, jotka oli altistettu G-CSF:ää sisältäville aerosoleille, todettiin olevan kohonneita neutrofiilipitoisuuksia verrattuna käsittelyä vaille jätettyihin eläimiin ja eläimiin, jotka oli altistettu aerosolille, joka sisälsi vain vettä ja pinta-aktiivista ainetta (polyoksietyleenisorbitaanimono-oleaatti). Kuviossa 2 esitetään neutrofiililukujen nousu, joka havaittiin eläimissä, jotka oli altistettu aerosoleille, jotka oli muodostettu rhG-CSF-sumutinliuoksista, joiden pitoisuus vaihteli kuvatun mukaisesti. Kuten voidaan nähdä, kiertävien neutrofiilien tasot, jotka saatiin G-CSF-aerosolialtistuksesta jopa niinkin alhaisella pitoisuudella kuin 1 mg/ml G-CSF:ää (käyttäen Ultravent-sumutinta), olivat merkitsevästi korkeampia ($p < 0,05$) kuin ryhmässä, joka altistettiin G-CSF:ää sisältämättömälle aerosolille. Nousun neutrofiilitasoissa verrokkiin verrattuna tilastollinen merkitsevyys oli $p < 0,001$ kaikille muille ryhmille. Nousu veren neutrofiilitasoissa korreloi kasvavaan G-CSF-pitoisuuteen sumutinliuoksessa aina pitoisuuteen 5 mg/ml. 15 000 neutrofiilin/μl verta maksimaalinen vaste havaittiin konsentroidummilla G-CSF-sumutinliuoksilla, vasta-ten maksimia, joka saatiin ruiskuttamalla ihonalaisesti 50 μg/kg suurempia annoksia. Käytettäessä alhaisempia G-CSF-liuospitoisuuksia, esim. alle 5 mg/ml, ei ollut käytännöllisesti katsoen eroa käytetyillä kahdella sumuttimella saadussa neutrofiilivasteessa. 5 mg/ml ylittäville G-CSF-liuospitoisuuksille Acorn II -sumutin tuotti suuremman nousun neutrofiilivasteessa kuin Ultravent-laite.

Inhalaatioaltistus aerosolille, joka oli muodostettu 5 mg:n/ml G-CSF-liuoksesta, joka ei sisältänyt pinta-aktiivista ainetta, tuotti hamstereissa neutrofiilivasteen (9 910 +/- 960 neutrofiiliä/µl), joka ei merkitsevästi poikennut vasteesta, joka saatiin joko 50 µg:n/kg ihonalaisella ruiskeella, joka sisälsi pinta-aktiivista ainetta (10 935 +/- 1 390 neutrofiiliä/µl), tai 50 µg:n/kg ihonalaisella ruiskeella, joka oli valmistettu liuoksesta, josta puuttui pinta-aktiivinen aine (10 270 +/- 430 neutrofiiliä/µl). Nämä arvot ilmoitetaan keskiarvona ja standardipoikkeamana 10 eläimestä aerosolikokeille ja 5 eläimestä ruiskeille. Tästä kokeesta pääteltiin, että pinta-aktiivinen aine ei ollut G-CSF:n vesipohjaisen aerosolikoostumuksen välttämätön ainesosa.

G-CSF-aerosolin fraktionaalinen kerääntyminen hamsterin keuhkoihin

Altistuksen aikana eläimeen kuljetettu annos arvioitiin varmistumiseksi siitä, voidaanko terapeuttisia määriä G-CSF:ää kuljettaa tehokkaasti ja taloudellisesti keuhkon kautta. Kuljetettu tai kerääntynyt annos on eläimen sisään hengittämän lääkemäärän ja tehokkuuden (fraktionaalinen kerääntyminen), jolla aerosolihiukkaset kerääntyvät keuhkoon, tulo. Jälkimmäinen määritettiin mittaamalla G-CSF-määrä, joka saatiin talteen hamsterin keuhkoista aerosolialtistuksen jälkeen.

Keuhkoihin kerääntynyt G-CSF mitattiin kahdesta 4 eläimen ryhmästä, jotka oli altistettu Acorn II -sumuttimella muodostetuille aerosoleille. Välittömästi aerosolialtistuksen jälkeen 4 hamsterin kokonaiset keuhkot poistettiin, sijoitettiin lasikudosjauhajiin, jotka sisälsivät 3 ml kylmää fysiologista puskuroitua suolaliuosta ja homogenisoitiin. Homogenaatti sentrifugoitiin kahdesti ja viimeinen supernatantti siirrettiin puhtaaseen putkeen ja G-CSF määritettiin käyttäen radioimmuunimääritystä (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA). Verrokkikokeissa tätä menettelyä

käyttäen määritettiin, että 75 % G-CSF:stä voitiin saada talteen keuhkohomogenaattinäytteistä, joissa oli tunnettu määrä G-CSF:ää. Kaikki G-CSF:n keuhkoissa mittaukset aerosolialtistuksen jälkeen korjattiin tällä G-CSF:n fraktionaalisella talteensaannilla keuhkokudoksesta.

Keskimäärin 3,1 +/- 0,3 µg G-CSF:ää kerääntyi keuhkoon eläinryhmässä, jota altistettiin 11 minuutin ajan aerosolille, joka oli muodostettu proteiinin 5 mg/ml -liuoksesta. Keskimäärin 20,0 +/- 4,0 µg G-CSF:ää kerääntyi eläinryhmässä, jota altistettiin 11 minuutin ajan aerosolille, joka muodostettiin 20 mg/ml -liuoksesta. G-CSF:n aerosolissa pitoisuuden, joka mitattiin altistuksen aikana, sekä lepohengitysnopeuden (30 ml/min) perusteella eläimet 5 mg/ml -ryhmässä hengittivät sisään 22 µg G-CSF:ää (68 µg/litra x 0,030 litra/min x 11 min), ja 20 mg/ml -ryhmä hengitti sisään 69 µg G-CSF:ää (208 µg/litra x 0,030 litra/min x 11 min) altistusjakson aikana. Käyttämällä sisään hengitetyn G-CSF:n määriä ja keuhkosta talteen saatuja määriä kerääntymistehoksi (fraktionaalinen kerääntyminen x 100) keuhkossa arvioitiin 14 % 5 mg/ml -ryhmälle ja 29 % 20 mg/ml -ryhmälle.

Fraktionaalista kerääntymistä, joka määritettiin keuhkoista aerosolialtistuksen jälkeen mitatusta G-CSF:stä, käytettiin sitten aerosolilla annetun G-CSF-annoksen arvioimiseksi nousun neutrofiilipitoisuudessa korreloimiseksi aerosoliannokseen.

Taulukko 2 sisältää sisään hengitetyt ja kerääntyneet annokset, jotka arvioitiin aerosolialtistuksille käytettäessä eri G-CSF-pitoisuuksia sumutinliuoksessa. G-CSF-aerosolipitoisuus mitattiin gravimetrisesti suodatinnäytteestä, joka kerättiin altistuksen aikana, ja painoa korjattiin pinta-aktiivisen aineen osuudella (1 mg/ml) G-CSF-liuoksessa. Sisään hengitetty annos laskettiin aerosolipitoisuudesta, lepohengitysnopeudesta (30 ml/min) ja altistusjaksosta (11 minuuttia Acorn II -laitteella ja 20

minuuttia Ultravent-laitteella). Kerääntynyt annos laskettiin sisään hengitetystä annoksesta ja mitatusta fraktionaalisesta kerääntymisestä (0,29).

Taulukko 2

Arviot keuhkoon aerosolialtistusten aikana kuljetetusta G-CSF:stä

Liuos pit.(mg/ml)	[C]* (µg/litra)	Sisään hengitetty annos (µg)	Kuljetettu annos (µg)	Ruumiinpaino, keskiarvo (g)	Arvioitu annos/ ruumiinp.(µg/kg)
		Acorn II -sumutin			
1	8	2,6	0,75	66,7	11
2	10	3,3	0,96	76,3	13
5	73	24	7,0	92,2	76
10	109	36	10	83,3	125
15	188	62	18	86,1	209
		Ultravent-sumutin			
1	2,5	1,5	0,44	63,3	6,9
2	2,7	1,6	0,46	77,1	6,1
5	33	20	5,7	91,2	63
10	41	25	7,1	84,8	84
15	38	23	6,6	81,5	81

*Suodattimen painoa korjattiin 1 mg:lle/ml pinta-aktiivista ainetta G-CSF-pitoisuuden aerosolissa saamiseksi.

106433

Kuviossa 3 esitetään neutrofiilivaste G-CSF:n ihonalaisen ruiskeen ja aerosoliannon jälkeen edellä lasketuille annostasoille. Verrattaessa aerosolilla saatua neutrofiilivastetta ihonalaisella ruiskeella saatuun ilmenee, että terapeuttisesti tärkeälle annosalueelle 1 - 100 µg/kg kerääntynyt annos vastaa suunnilleen ruisketta.

Vaikka tämän keksinnön mukaisesti valmistetun formulaation käyttöä on spesifisesti havainnollistettu liittyen aerosolisoitujen liuosten ja sumuttimien kanssa, tulee ymmärtää, että mitä tahansa tavanomaista keinoa, joka sopii biologisen materiaalin kuljetukseen keuhkoihin, voidaan käyttää G-CSF:n antamiseksi tämän keksinnön mukaan. Itse asiassa voi olla tilanteita, joissa mitta-annosinhalaattori, tai jauheinhalaattori, tai muu laite on edullinen tai sopii parhaiten nimenomaisiin vaatimuksiin. Edeltävä kuvaus antaa opastusta joidenkin noista laitteista käyttöön. Edelleen muiden käyttäminen on alan taitajan kykyjen puitteissa. Täten tämän keksinnön mukaisesti valmistetun formulaation käytön ei tule katsoa rajoittuvan sen harjoitukseen soveltaen vain kuvattuja nimenomaisia suoritusmuotoja.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä farmaseuttisen formulaation valmistamiseksi, joka soveltuu G-CSF:n antamiseen keuhkojen kautta, t u n n e t t u siitä, että

(a) G-CSF liuotetaan veteen, mahdollisesti yhdessä puskurin ja yksinkertaisen sokerin ja pinta-aktiivisen aineen kanssa, ja täytetään sumuttimeen, tai

(b) G-CSF kuivan jauheen muodossa suspendoidaan ponneaineeseen pinta-aktiivisen aineen avulla ja täytetään mitta-annos-inhalaattorilaitteeseen, tai

(c) G-CSF kuivan jauheen muodossa, mahdollisesti yhdessä täyteaineen kanssa, täytetään jauheinhalaattorilaitteeseen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että G-CSF:n hiukkaskoko on alle 10 µm.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että G-CSF:n hiukkaskoko on 1 - 5 µm.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että G-CSF on ihmis-G-CSF:ää.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ihmis-G-CSF on yhdistelmä-DNA-ihmis-G-CSF:ää.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhdistelmä-DNA-ihmis-G-CSF on tuote ilmennyksestä transformoidussa eukaryoottisessa tai prokaryoottisessa isäntäsolussa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolu on prokaryoottinen.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolu on E. coli.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av en farmaceutisk komposition, vilken lämpar sig för pulmonär dispensering av G-CSF, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

(a) löser G-CSF i vatten, eventuellt tillsammans med ett buffertmedel och ett enkelt socker och ett ytaktivt medel, och fyller en nebulisator med dessa, eller

(b) suspenderar G-CSF i form av ett torrt pulver i ett drivmedel med tillhjälp av ett ytaktivt medel och fyller en doserande inhalatoranordning med dessa, eller

(c) fyller G-CSF i form av ett torrt pulver, eventuellt tillsammans med ett bulkmedel, i en pulverinhalatoranordning.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda G-CSF har en partikelstorlek mindre än 10 µm.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda G-CSF har en partikelstorlek mellan 1 och 5 µm.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda G-CSF är human-G-CSF.

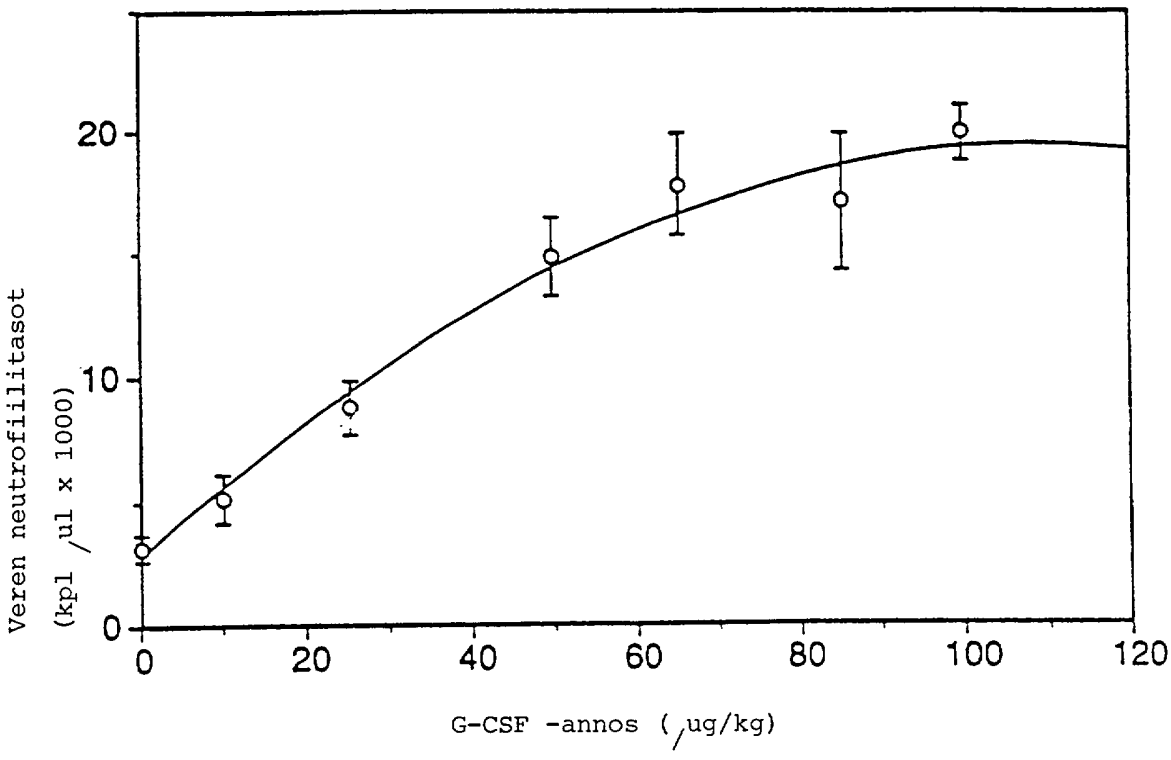
5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att human-G-CSF:et är ett rekombinant human-G-CSF.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda rekombinanta human-G-CSF är exressionsprodukten i en transformerad eukaryotisk eller prokaryotisk värdcell.

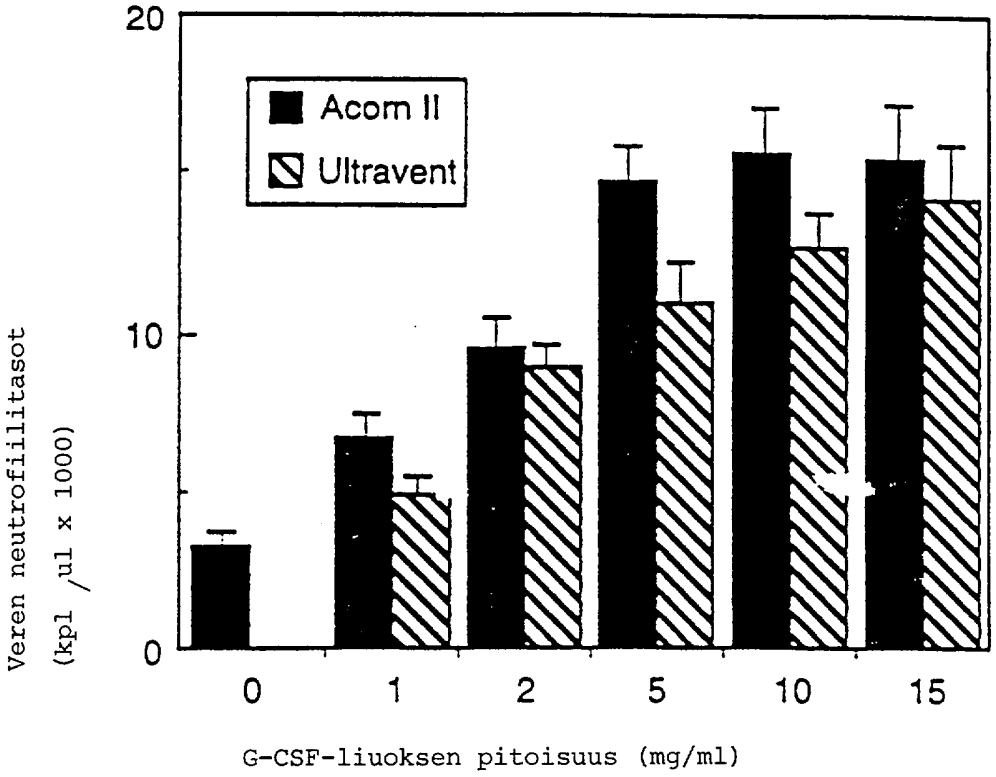
7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att värdcellen är prokaryotisk.

8. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att värdcellen är E. coli.

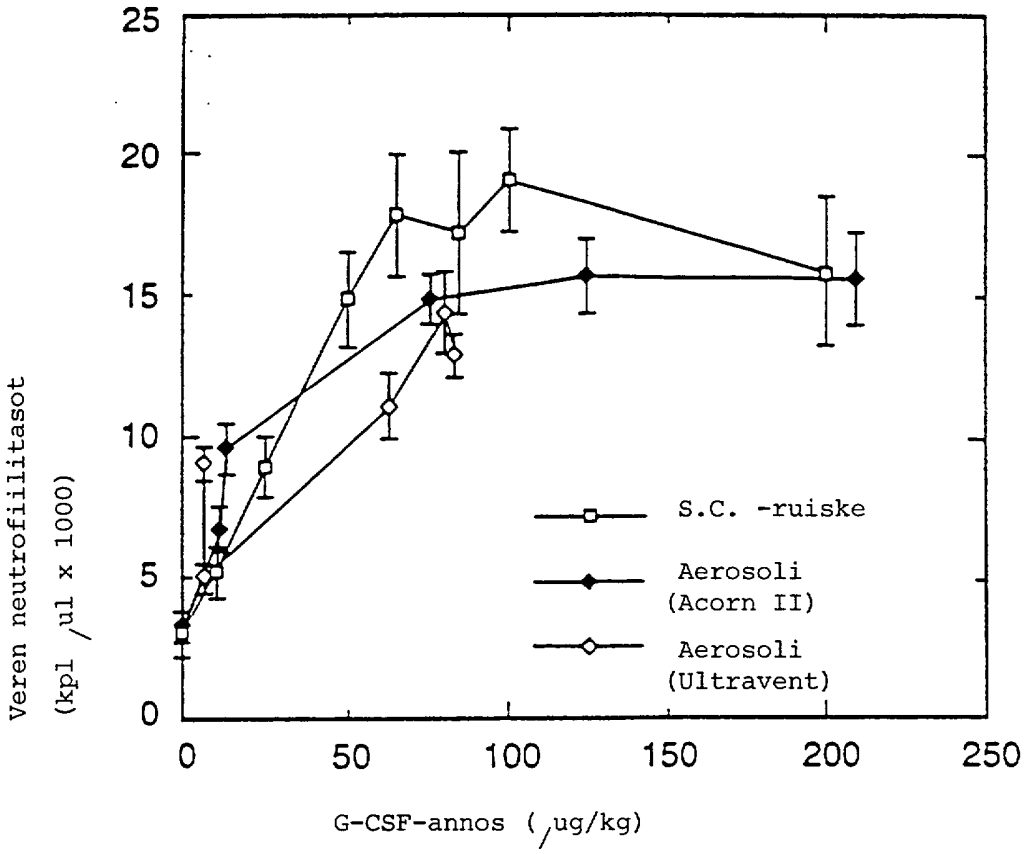
K U V I O 1


Veren neutrofiilitasot
(kpl /ul x 1000)
0
10
20
0
20
40
60
80
100
120
G-CSF -annos (/ug/kg)

K U V I O 2


20
10
0
Acom II
Ultravent
Veren neutrofiilitasot
(kpl /ul x 1000)
0
1
2
5
10
15
G-CSF-liuoksen pitoisuus (mg/ml)

K U V I O 3


25
20
15
10
5
0
0
50
100
150
200
250
Veren neutrofiilitasot
(kpl /ul x 1000)
G-CSF-annos (/ug/kg)
S.C. -ruiske
Aerosoli
(Acorn II)
Aerosoli
(Ultravent)