

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 960253 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **960253**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 38/18
A61K 9/12
C07K 14/535
C12N 9/96

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **19.07.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **18.01.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **18.03.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **19.07.1994 PCT/US1994/008136**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority
19.07.1993 US 093840

(71) Hakija - Sökande - Applicant

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

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Arakawa, Tsutomu, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Niven, Ralph W., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Prestrelski, Steven J., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Aerosolisoitujen proteiinien stabilointi

Stabilisation av aerosoliserade proteiner

Aerosolisoitujen proteiinien stabilointi

Keksinnön tausta

Eräs tärkeä lääkkeiden annostusmenetelmä on sumut-
5 teena annostettu lääkintä. Potilas saa sumutteen muodossa
olevan lääkkeen sisäänhengityksessä, jossa lääke joutuu
kosketuksiin potilaan keuhkojen kanssa. Keuhkojen ilmatei-
den adsorptiopinnan suuruudesta johtuen sumuteannostus on
käyttökelpoinen menetelmä paikallisen lääkeannon (esim.
10 keuhkoputkia laajentavat lääkkeet ja muut astmalääkkeet)
lisäksi myöskin systeemisessä lääkeannossa. Niinpä sumute-
annostuksen uskotaan olevan edullinen menetelmä tiettyjen
lääkkeiden - mukaanlukien proteiinit - ei-invasiivisessa
systeemisessä lääkeannossa. Tavallisesti sumutteen hiuk-
15 kasten kokoa säätämällä kontrolloidaan, pääsevätkö hiuk-
kaset keuhkojen pieniin ilmateihin ja keuhkorakkuloihin
(välttämätöntä systeemisessä lääkeannossa) vai leviävätkä
ne kaikkialle hengitysteissä (paikallinen lääkeanto).

Sumutteina olevia lääkkeitä saadaan dispergoimalla
20 joko kuiva hiukkasmainen lääkeaine tai lääkeaineen vesipi-
toinen tai vettä sisältämätön liuos kaasuväliaineeseen.
Kuivan hiukkasmaisen lääkeainedispersio tapauksessa hiuk-
kaset suspendoidaan ponneaineisiin, jotka haihtuvat ilmaan
suspension annostamisen jälkeen paineistetusta laitteesta.
25 Vaihtoehtoisesti kuiva hiukkasmainen aine voidaan sumuttaa
suoraan kuivan jauheen inhalaatiolaitteesta. Kun lääkeaine
sumutetaan vesiliuoksesta, niin lääkeaineliuos muuttuu
pienistä vesipisaroista koostuvaksi hienoksi suihkeeksi.

Sumutteena lääkkeen annostus voi tapahtua yhtenä
30 mitattuna annoksena tai jatkuvana. Eräänä välineenä sumut-
teena annetun mitatun annoksen saamiseksi on laite, josta
käytetään nimitystä mitta-annosinhalaatiolaitte (metered
dose inhaler = MDI). Kun MDI-laitetta käytetään, niin pai-
neistetusta astiasta purkautuu hienoista hiukkasista koos-
35 tuva suspensio. MDI-laitteen käynnistämisen kanssa saman-

aikaisesti potilas hengittää sisään ja siten vetää sumutteen muodossa olevaa lääkeainetta kosketuksiin keuhkojensa kanssa. Tyypillisimmin MDI-laitteen kautta annostettu lääkeaine on kuivien hiukkasten muodossa oleva aerosoli, mutta on myös mahdollista suihkuttaa yhtenä mitattuna annoksena oleva lääkeaine vesiliuoksesta muodostettuna sumutteena.

MDI-laitteen käyttö vaatii tietyn määrän sellaista koordinointia ja tekniikkaa, jota ei kohtuudella voida odottaa tietyiltä potilailta, kuten erittäin nuorilta, vanhoilta ja heikoilta. Lisäksi niiden lääkkeiden lukumäärä on rajoitettu, jotka voidaan helposti formuloida MDI-laitteissa käytettäviksi. Tästä on seurauksena, että usein pidetään edullisempänä jatkuvalla annostuksella toimivaa lääkesumutusta. Tavallisimmassa menetelmässä lääkeaineen annostamiseksi jatkuvana sumutteena käytetään sumutinta, joka annostaa lääkettä potilaalle, joka normaalin sisäänhengityksen kautta saa lääkettä pidennetyn ajan. Sellaisen jatkuvan sumutuksen saamiseksi, joka tarvitaan annostuksen ulottamiseksi tietyksi ajanjaksoksi, lääkeaineen vesiliuosta muutetaan sumuttimessa jatkuvasti suihkeeksi, jolloin sumuttimesta lähtevästä vesipitoisesta suihkeesta vain pieni osa (noin 1 %) päätyy suoraan potilaaseen tiettyä ajanjaksona. Vesipitoinen suihke, joka ei poistu sumuttimesta, törmää sumuttimen seinämiin tai suuntalevyihin ja valuu takaisin nestesäiliöön sumuttimen pohjalle, josta se uudelleen sumutetaan vesisuihkeena sumutetaan kunnes säiliö on tyhjä tai lääkkeen annostaminen muuten on lopetettu.

Sekä mitatun annoksen luovuttavia että jatkuvasti sumutettavia lääkeaineita, kuten keuhkoputkia lajentavia lääkkeitä, antihistamiineja ja limaa irrottavia lääkkeitä, on laajalti käytetty useiden vuosien ajan. Viime aikoina molekyylibiologiassa tapahtunut kehitys on johtanut monien sellaisten proteiineihin perustuvien lääkeaineiden, kuten

kasvutekijöiden ja sytokiinien kehittämiseen, joiden annostamiseen on ehdotettu käytettäväksi sumutteita (kts. esim. EP-patenttijulkaisu 257 956). Kuten edellä mainittiin sumutteen muodossa suoritettua lääkeantoa pidetään

5 edullisena vaihtoehtoisena menetelmänä sellaisten proteiinien lääkeannossa, joiden vaikutuksen esteenä suun kautta otettuna on niiden huono pysyvyys sellaisten aineiden kuin proteolyyttisten entsyymien suhteen. Kuitenkin proteiinien annostus sumutteena tuo esille uusia haasteita johtuen

10 näiden proteiinien muihin perinteisempiin lääkeaineisiin verrattuna herkemmästä taipumuksesta pilkkoutua.

Mahdollisen ongelman tiettyjen proteiinien annostamisessa sumutteena aiheuttaa proteiinimolekyylin kvaternäärisen ja myös sekundaarisen ja tertiäärisen rakenteen

15 hajoamisherkkyyys, joka molekyylin hajotessa johtaa proteiinin kasaumanmuodostukseen ja pilkkoutumiseen ja siten biologisen aktiivisuuden alenemiseen. Sumutukseen itseensä liittyvät fysikaaliset jännitykset, kuten ilman ja veden välisen suuren pinnan muodostumisesta aiheutuvat jännityk-

20 set, tekevät monien proteiinien rakenteesta epästabiilil. Tämä ongelma pahenee jatkuvatoimisessa sumutuksessa, jossa noin 99 % vesiliuoksessa olevasta lääkeaineesta kierrätetään, so. lääkeaine sumutetaan vesiliuoksesta useampia kertoja ennen kuin se joutuuu potilaaseen. Tämä lääkeaine-

25 liuoksen kierrätys aiheuttaa lisää fysikaalisia jännityksiä proteiiniin jokaisella sumutussyklillä.

Esillä olevan keksinnön kohteena on menetelmä vesiliuoksesta sumutettujen proteiinien aktiivisuuden alenemisen ja pilkkoutumisen ja/tai kasaumanmuodostuksen estämiseksi.

30

Lisäksi esillä olevan keksinnön kohteena on stabioitu proteiinia sisältävä vesiliuos, joka sumutteeksi muodostettaessa on kestävä proteiinin pilkkoutumisen, kasauman muodostuksen ja aktiivisuushäviön suhteen.

Keksinnön yhteenveto

Esillä olevan keksinnön kohteena on menetelmä vesiliuoksena sumutettujen proteiinien stabiloimiseksi. Sumutetut proteiinit stabiloidaan lisäämällä vesiliuokseen ennen sumuttamista vesiliukoista poolista orgaanista yhdistettä, kuten polyetyleeniglykolia tai pinta-aktiivista ainetta.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuviossa 1 on graafisena esityksenä LDH:n alkupe-
10 räisen aktiivisuuden murto-osa sumutusajan funktiona.

Kuviossa 2 on ei-denaturoiva elektroforeesigeeli, jossa nähdään G-CSF sumutettuna PEG-pitoisesta vesiliuoksesta ja liuoksesta ilman PEG:iä ("kontrolli").

Kuviossa 3 on graafisena esityksenä G-CSF:n pilkkoutumisprosentti ajan funktiona, kun sumutetaan toisaalta liuos, joka sisältää 1 % PEG:iä ja toisaalta liuos, joka ei sisällä PEG:iä ("kontrolli").

Kuviossa 4 on SDS-elektroforeesigeeli, jossa nähdään G-CSF sumutettuna PEG-pitoisesta vesiliuoksesta ja liuoksesta ilman PEG:iä ("kontrolli").

Kuviossa 5 on graafisena esityksenä LDH:n alkupe-
25 räisen aktiivisuuden murto-osa sumutusajan funktiona, kun LDH on sumutettu toisaalta liuoksena, joka sisältää 1 % PEG:iä ja toisaalta liuoksena, joka ei sisällä PEG:iä ("kontrolli").

Kuviossa 6 on graafisena esityksenä LDH:n alkupe-
30 räisen aktiivisuuden murto-osa sumutusajan funktiona, kun LDH on sumutettu toisaalta erilaisia PEG-konsentraatioita sisältävinä vesiliuoksina ja toisaalta liuoksena, joka ei sisällä PEG:iä ("kontrolli").

Kuvio 7A on graafinen esitys, joka osoittaa PEG:in erilaisten molekyylipainojen vaikutuksen konsentraationa 0,001 % G-CSF:n stabilointiin sumutuksen kuluessa.

Kuvio 7B on graafinen esitys, joka osoittaa PEG:in erilaisten molekyyllipainojen vaikutuksen konsentraationa 1 % G-CSF:n stabilointiin sumutuksen kuluessa.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

5 Esillä olevan keksinnön kohteena on menetelmä proteiinien suojaamiseksi sumutuksen aiheuttamaa pilkkoutumista, kasaumanmuodostusta ja/tai aktiivisuuden heikkenemistä vastaan. Esillä olevaa keksintöä voidaan käyttää missä tahansa tilanteessa, jossa proteiini halutaan sumut-

10 taa, mukaan lukien sumutteena potilaalle annettava proteiiniin perustuva lääke. On huomattava, että esillä olevan keksinnön kohteena on lisäksi stabiloitu vesipitoinen proteiiniliuos, joka on kestävä pilkkoutumista, kasaumanmuodostusta ja/tai proteiinin aktiivisuuden alenemista vastaan, ja systeemi stabiloidun vesipitoisen proteiiniliuoksen muuttamiseen aerosoliksi. Useimmissa tapauksissa systeemillä saatua stabiloidun vesipitoisen proteiiniliuoksen aerosolia käytetään sumutteen muodossa olevan lääkkeen annostamiseen potilaan keuhkoihin.

20 Esillä olevan keksinnön mukaisesti sumutteen muodossa olevat proteiinit ovat sumutettaessa suojattuja aktiivisuushäviöiden, pikkoutumisen ja/tai kasauman muodostuksen suhteen, kun vesipitoiseen proteiiniliuokseen on lisätty poolista orgaanista yhdistettä tai pinta-aktiivista ainetta.

Esillä olevan keksinnön ymmärtämisen helpottamiseksi seuraavat ilmaisut tässä käytettyinä määritellään seuraavasti.

30 Ilmaisu poolinen orgaaninen yhdiste tarkoittaa orgaanista yhdistettä, joka sisältää jossain määrin ei-poolisen ryhmän molekyylin määrittelemättömässä osassa (so. ei-poolisen ryhmän sijainti ei ole määrätty). Pooliset orgaaniset yhdisteet pystyvät alentamaan veden pintajännitystä. Toisin kuin pinta-aktiiviset aineet, jotka tavallisesti muodostavat misellejä, pooliset orgaaniset yhdisteet

35

ovat täysin sekoittuvia veden kanssa ilman misellin muodostusta.

Ilmaisu pinta-aktiivinen aine tarkoittaa yhdistettä, joka sisältää sekä poolisen ryhmän että vahvasti ei-poolisen ryhmän, jotka kumpikin sijaitsevat molekyylin paikallisesti erillisissä osissa siten, että pinta-aktiivinen aine voi alentaa kahden toistensa kanssa sekoittumattoman faasin välistä rajapintajännitystä asettumalla rajapintaan, jossa se voi muodostaa misellejä. Pinta-aktiivisessa aineessa olevien poolisten ja ei-poolisten ryhmien sijainnista johtuen nämä yhdisteet alentavat veden pintajännitystä huomattavasti enemmän kuin pooliset orgaaniset yhdisteet.

Ilmaisu proteiini tarkoitetaan mitä tahansa esillä olevan keksinnön mukaiseen vesiliuokseen dispergoitua proteiinia. Tavallisesti proteiini on terapeuttisesti käytettävä proteiini, joka on tarkoitettu inhalaatioterapiaan. Proteiini voi olla kemiallisesti syntetisoitu tai luonnon lähteestä puhdistettu, tyypillisesti se kuitenkin on luonnossa esiintyvän proteiinin geeniteknologialla saatu yhdistelmämuoto. Proteiini voi olla myös kemiallisesti muunnettu; tavallisesti se on muunnettu liittämällä kemiallinen ryhmä proteiiniin kovalenttisesti proteiinin terapeuttisen vaikutuksen parantamiseksi, kuten terapeuttisen vaikutusajan pidentämiseksi.

Kuten huomataan, proteiinien sumutus voi aiheuttaa ajasta riippuvaista proteiinin aktiivisuuden heikkenemistä. Sumuttaminen vaikuttaa haitallisesti proteiinin pysyvyyteen riippuen useista tekijöistä, mukaan lukien sumutuksessa syntynyt ilma-vesirajapinnan suuri määrä. Proteiinin aktiivisuuden heikkenemisaste sumutettaessa vaihtelee eri proteiineilla riippuen kulloinkin kyseessä olevan proteiinin rakenteesta ja pysyvyydestä ja välineestä, jolla sumutus suoritetaan. Siinä tapauksessa, että proteiinien aerosoliksi muuttaminen tapahtuu jatkuvana suihku-

sumuttimella, suuttimen ilmanpaineesta johtuvat leikkausvoimat hajottavat proteiinia sen vaikutuksen lisäksi, joka sumuttamisprosessissa syntyneellä ilma-vesirajapinnalla on proteiiniin. Kuivuminen voi myös aiheuttaa proteiinin denaturoitumista proteiinin konsentroituaessa haihtuvissa pisaroissa. Siten aktiivisuuden alenemisaste sumutettaessa suihkusumuttimella on riippuvainen sekä suihkutuksen paineesta että säiliössä olevan vesiliuoksen lähtötilavuudesta. Kun proteiinien sumutukseen käytetään ultraäänisumutinta, niin leikkausvoimia ei esiinny samassa muodossa, mutta ultraääniaallot saattavat denaturoida proteiinin muulla tavalla (esim. kuumentamalla).

Sumutettaessa eivät kaikki proteiinit pilkkoudu, muodosta kasaumia ja/tai menetä aktiivisuuttaan. Esimerkiksi sekretorisen leukoproteaasin inhibiittorin ja (SLPI) α -antitrypsiinin on ilmoitettu kestävän sumutusta pilkkoutumatta. McElvany et al., J. Clin. Invest. 90, 1296-1301 (1992) (SLPI); Hubbard et al., Ann. Int. Med., 111(3), 206-212 (1989) (α -antitrypsiini). Jotkut proteiinit pilkkoutuvat osittain tai täydellisesti sumutettaessa riippuen siitä, miten herkkä proteiini on sumutuksessa esiintyvälle jännityksille. Useimmiten sumutus aiheuttaa proteiinin osittaisen pilkkoutumisen. Osittainen pilkkoutuminen ei estä proteiinin tehokasta käyttöä terapeuttisena aineena, mutta vaatii suuremman proteiinimäärän käyttöä, jotta saavutettaisiin sellainen lääkkeen tehokas taso, joka saadaan täysin aktiivisessa muodossa olevalla proteiinilla. On myös olemassa mahdollisuus, että kasaumien muodossa oleva proteiini aiheuttaa erilaista immuuniutusta kuin biologisesti aktiivinen muoto saaden siten aikaan lääkettä sumutteena saavassa potilaassa immunologisen reaktion.

Tarkka mekanismi, jolla proteiinin aktiivisuus alenee ja proteiini pilkkoutuu ja/tai muodostaa kasaumia sumutettaessa, ei ole tunnettu. Granulosyytti-pesäkettä sti-

muloivaa tekijää (G-CSF) sisältävän vesiliuoksen analyysi osoitti, että G-CSF itse alentaa veden pintajännitystä myös ennen sumuttamista osoittaen tämän proteiinin asettumista ilma-vesi-rajapintaan (konsentraationa 4 mg/ml G-CSF:n vesiliuoksen pintajännitykseksi mitattiin 48, kun veden pintajännitys on 72). Tyypillisesti proteiinien adsorptio vesiliuoksessa ilma-vesi-rajapintaan aiheuttaa sen, että ainakin osa proteiinin hydrofobisista alueista joutuu alttiiksi ei-poolisen ilmafaasin vaikutukselle. G-CSF:n vesiliuoksen analyysi osoitti proteiinin olevan homogeeninen tässä vaiheessa (so. ennen sumuttamista) proteiinin näkyessä yhtenä vyöhykkeenä ei-denaturoivalla elektroforeesigeelillä, eikä proteiinin kasaumanmuodostuksesta ollut mitään näyttöä. Tämä osoittaa, että G-CSF:n adsorboituminen pintaan ennen sumuttamista on luultavasti käänteinen prosessi. Sumutuksessa G-CSF:n kuitenkin havaittiin palautumattomasti denaturoituvan seurauksena kasaumanmuodostuksesta, kemiallisesta pilkkoutumisesta tai molemmista.

G-CSF on vaikuttava granulosityttilinjan kasvutekijä, joka lisää veren valkosolujen lukumäärää. Tämän aktiivisuuden johdosta sitä voidaan käyttää kliinisesti hyväksi useiden sairauksien ja tautitilojen käsittelyssä, mukaan lukien tartuntataudit. Nykyisin G-CSF:n annostus on suoritettu pelkästään suonensisäisenä injektiona, mutta eläimillä on osoitettu sen tehokkuus keuhkojen kautta annostettuna (WO 92/16 192). Kuitenkin johtuen osoitetusta kasaumanmuodostuksesta, pilkkoutumisesta ja aktiivisuuden vähenemisestä annostuksen tapahtuessa sumutteena on odotettavissa, että suuri osa sumutteesta olevasta G-CSF:stä saavuttaa potilaan tehottomassa muodossa kovalenttisina ja ei-kovalenttisina dimeereinä ja korkeampimolekyylipainoisina kasaumina ja muina pilkkoutuneina muotoina. Erityisesti kokeiltiin 4 mg/ml G-CSF:ä sisältävien liuosten sumuttamista happamassa pH-arvossa. Tässä käsittelyssä pro-

teini näytti kärsivän vaurioita sekä kasaumanmuodostuksen että pilkkoutumisen vuoksi. Nämä molemmat vauriot lisääntyivät sumutusajan kasvaessa.

Sumutteissa olevissa proteiineissa havaittiin yllättäen merkittävää stabiloitumista hajoamista vastaan, kun vesiliuokseen, josta proteiinien sumute muodostettiin, sisällytettiin esillä olevan keksinnön mukaisesti tiettyjä poolisia orgaanisia yhdisteitä tai pinta-aktiivisia aineita. Tämä merkittävä stabiloituminen osoitettiin sekä laktaattidehydrogenaasi-entsyymien (LDH) että edellä mainitun G-CSF:n suhteen. Edullisia poolisia orgaanisia yhdisteitä, joiden havaittiin vaikuttavan suojaavasti sumutteessa oleviin proteiineihin, ovat polyetyleeniglykoli (PEG) ja metyyli-pentaanidioli (MPD). Niistä edullisempi poolinen orgaaninen yhdiste on PEG. Edullisimmin poolinen orgaaninen yhdiste on PEG 1 000 (so. PEG, jonka keskimääräinen molekyylipaino on 1 000), vaikka myös muun molekyylipainon omaavat PEG:it ovat tehokkaita, jolloin kuitenkin alempi-molekyylipainoisia PEG:ejä on käytettävä suurempina konsentraatioina sumutteessa olevan proteiinin optimisuojausta saavuttamiseksi. Edullinen pinta-aktiivinen aine on Tween 80.

Polyetyleeniglykolin kyky stabiloida proteiineja ei ole ennestään tunnettu. Itseasiassa PEG on heikon hydrofobisuutensa johdosta paremmin tunnettu proteiinien destabilointikyvystään. Arakawa ja Timasheff, *Biochemistry*, 24(24), 6756-6762 (1985). Tämä yhdiste on suuren poissulkevan tilavuutensa vuoksi myös tunnettu proteiinien saostajana. *Ibid.* Steeristen esteiden vuoksi PEG:in on jokseenkin mahdotonta esiintyä proteiinien pinnalla. Tämä termodynaamisesti vähemmän edullinen PEG:in ja proteiinien välinen vuorovaikutus, jossa PEG on poissuljettu proteiinin pinnalta, johtaa proteiinien liukoisuuden alenemiseen. Tämän seurauksena PEG:in voisi olettaa destabiloivan pro-

teineja ja alentavan proteiinien, kuten G-CSF:n liukoisuutta ja siten edistävän proteiinin kasaumanmuodostusta.

PEG:in on kuitenkin yllättäen havaittu stabiloivan sekä LDH:ta että G-CSF:ä näitä sumutettaessa vesiliuoksista. Tämä saattaa johtua PEG-molekyylin poolisten ja ei-poolisten ei-paikallistettujen alueiden luomien amfifiilisten yksiköiden toistuvasta luonteesta. Tosiasiassa PEG alentaa veden pintajännitystä kuitenkin paljon vähemmän kuin tavalliset pinta-aktiiviset aineet, kuten SDS ja Tween. Siten PEG adsorboituu ilma-vesi -rajapinnalle, mikä saattaa estää proteiinien kuten G-CSF:n adsorptiota pinnalle.

Uskotaan, että mekanismi, jolla muut pooliset orgaaniset yhdisteet saattavat suojata proteiinia sumutuksen aikana, myös liittyy näiden poolisten orgaanisten yhdisteiden heikkoon kykyyn alentaa pintajännitystä. PEG:in antama suoja on riippuvainen konsentraatiosta kuten on jo osoitettu MPD:n suhteen. Muiden poolisten orgaanisten yhdisteiden antaman suojavaikutuksen on samoin odotettu olevan riippuvainen konsentraatiosta, vaikka optimikonsentraatio suojavaikutuksen saamiseen hajoamista ja aktiivisuuden alenemista vastaan vaihtelee kulloinkin poolisesta orgaanisesta yhdisteestä riippuen ja myös riippuen siitä, mikä proteiini sumutetaan. Optimikonsentraation pooliselle orgaaniselle yhdisteelle yhdessä tietyn proteiinin yhteydessä voi alan asiantuntija helposti ottaa selville esillä olevan keksinnön tietojen avulla. Esimerkiksi edullista on, että poolista orgaanista yhdistettä käytetään sellaisena konsentraationa, joka riittää alentamaan veden pintajännitystä korkeintaan arvoon noin $6,5 \times 10^{-4}$ N/cm (65 dyn/cm). MPD:n tapauksessa on edullisempaa käyttää poolista orgaanista yhdistettä konsentraationa, joka pystyy alentamaan veden pintajännitystä korkeintaan arvoon noin $4,8 \times 10^{-4}$ (48 dyn/cm).

Esillä olevan keksinnön yhteydessä käytettäviksi suunnitellut pooliset orgaaniset yhdisteet eroavat jyrkäs-

ti tietyistä pinta-aktiivisista aineista, joiden myös tiedetään alentavan pintajännitystä ja joita myös on ehdotettu käytettäväksi proteiinin sellaisen pinta-indusoidun ka-
sauman muodostuksen vähentämiseen tai estämiseen, joka
5 aiheutuu proteiinin sumuttamisesta vesiliuoksesta. Nämä pinta-aktiiviset aineet ovat "tavanomaisia" pinta-aktiivisia aineita kuten polyoksietyleenirasvahappestereitä ja -alkoholeja ja polyoksietyleenisorbitaanirasvahappestereitä, joista erityisen edullinen pinta-aktiivinen aine on
10 polyoksietyleenisorbitaanimonoo-oleaatti. (WO 92/16 192). On mielenkiintoista todeta, että näiden pinta-aktiivisten aineiden on päätelty kuuluvan sellaisiin, jotka eivät ole välttämättömiä G-CSF:n vesiliuoksen sumuttamisessa. Ibid.

Pinta-aktiiviset aineet kuten Tween saattaa myös
15 pystyä alentamaan pintajännitystä jopa merkittävästi suuremmassa määrin kuin PEG tai muut pooliset orgaaniset yhdisteet, joita ehdotettu käytettäväksi esillä olevan keksinnön käytännössä. Kuitenkin pinta-aktiiviset aineet (varsinkin kationiset pinta-aktiiviset aineet) päinvastoin
20 kuin esillä olevan keksinnön esittämät pooliset orgaaniset yhdisteet, voivat muodostaa misellejä ja destabiloida proteiineja. Eräänä syynä tähän on, että vaikka kationiset pinta-aktiiviset aineet alentavat pintajännitystä, ne myös sitoutuvat vahvasti proteiiniin varsinkin misellin muodossa ja siten muuttavat proteiinin stabiiliutta. Lisäksi
25 pinta-aktiivisten aineiden vaahtoamistaipumus tekee monissa tapauksissa hieman vaikeaksi niiden pintajännitystä alentavien ominaisuuksien käyttämisen painesuutinsumutuksessa. Kuitenkin joissakin tapauksissa saattaa olla edullista käyttää pinta-aktiivista ainetta proteiinin stabi-
30 loimiseen hajoamista vastaan. Kun tähän tarkoitukseen käytetään pinta-aktiivista ainetta, niin pinta-aktiivista ainetta käytetään edullisesti sellaisena konsentraationa, joka riittää alentamaan veden pintajännityksen korkeintaan
35 arvoon noin 4×10^{-4} N/cm (40 dyn/cm). Esillä olevassa kek-

sinnössä käytettäväksi suunnitelluilla poolisilla orgaanisilla yhdisteillä on etuna se, että ne pystyvät alentamaan pintajännitystä ilman että ne sitoutuvat proteiiniin ja destabiloivat proteiinin. Myös PEG:ien tapauksessa niiden

5 sattumanvarainen kierukanmuoto vesiliuoksessa ja suuri hydrodynaaminen tilavuus, jonka jopa alhaismolekyylipainoiset PEG:it tarvitsevat, saattaa lisätä niiden kykyä estää proteiinien joutumista sumutuksen kuluessa syntyneeseen ilmarajapintaan.

10 Esillä olevaa keksintöä voidaan mahdollisesti soveltaa moniin erilaisiin proteiineihin, joiden sumuttaminen vesiliuoksesta olisi toivottua. Tyypillisimmän proteiinien sumutus esillä olevan keksinnön mukaisesti tulee kysymykseen terapeuttisesti hyödyllisen proteiinin annoksessa keuhkojen kautta. Esimerkkejä mahdollisista proteiineista ovat sytokiinit, joihin kuuluu useita hematopoeettisia tekijöitä, kuten edellä mainittu G-CSF, SCF, EPO, GM-CSF, CSF-1, interleukiinit, kuten IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 ja IL-12, IGF:ät, M-CSF, tymosiini, TNF tai LIF. Käytettäväksi

15 sopivia ovat myös muut terapeuttiset proteiinit, kuten interferonit (alfa-, beeta-, gamma- tai konsensusinterferonit) ja kasvutekijät tai hormonit, kuten ihmisen tai muiden eläinten kasvuhormonit (esim. naudan, sian tai kanan kasvuhormonit), ET-1, FGF, KGF, EGF, IGF ja PDGF. Mahdollisia saattavat olla myös proteaasi-inhibiittorit, kuten metalloproteinaasi-inhibiittorit (kuten TIMP-1, TIMP-2 tai muut proteinaasi-inhibiittorit). Sopivia ovat mahdollisesti myös hermojen kasvutekijät, kuten BDNF ja NT3.

20 Mahdollisesti kyseeseen voivat tulla myös plasminogeeniaktivaattorit, kuten tPA, urokinaasi ja streptokinaasi. Samoin mahdollisia mahdollisia voivat olla sellaisten proteiinien peptidiosat, joilla on kokonaan tai osittain kantaproteiinin primaarinen rakenne ja ainakin yksi kantaproteiinin biologisista ominaisuuksista. Myös analogit, kuten

25

30

35

substituutioanalogit tai poistoanalogit tai sellaiset, jotka sisältävät muunnettuja aminohappoja, kuten peptidomimeetit, saattavat olla mahdollisia.

Tämän keksinnön käytäntöön soveltamisessa ovat mahdollisia monet erilaiset mekaaniset laitteet, jotka on suunniteltu terapeuttisten tuotteiden annostamiseen sumuttamalla vesiliuoksesta ja joita ovat alalla tunnetut (joihin ei kuitenkaan rajoituta) sumuttimet ja mitatun annoksen antavat inhalaatiolaitteet. On kuitenkin otettava huomioon, että esillä olevan keksinnön suurin etu saadaan sitä käytettäessä proteiinien jatkuvan sumutuksen yhteydessä, kuten sumuttimessa, koska proteiinien lisääntyvä hajoamisaste on tavallisesti ongelmana jatkuvassa sumutuksessa. Joitakin erityisiä esimerkkejä kaupallisesti saatavista esillä olevan keksinnön käyttöön sopivista laitteista ovat: Ultravent sumutin, valmistaja: Mallinckrodt, Inc, St. Louis, Missouri, Acorn II sumutin, valmistaja Marquest Medical Products, Englewood, Colorado ja Collison 3-jet sumutin, valmistaja BGI, Inc., Waltham, Massachusetts.

Sumuttimessa - joko painesumuttimessa tai ultraäänisumuttimessa - käytettäväksi sopivat koostumukset sisältävät tyypillisesti sumutettavaa proteiinia (tai kemiallisesti muunnettua proteiinia) veteen liuotettuna. Kun proteiini on G-CSF, sen konsentraation tulisi olla noin 0,1 - 25 mg G-CSF:ää ml:ssa liuosta. Koostumus voi sisältää myös puskuria tai puskurin voi olla yksinkertaisesti HCl-vesiliuos. Esimerkkejä käytettäväksi sopivista pusku-reista ovat natriumasetaatti, sitraatti ja glysiini. Edullisesti G-CSF-koostumuksissa puskurin koostumus ja molaarisuus on sellainen, että liuoksen pH-arvoksi tulee 2,5 - 5,5. Yleensä puskurin molaarisuudet 1 mM - 50 mM ovat sopivia tähän tarkoitukseen.

Esillä olevan keksinnön stabiloidun vesipitoisen proteiinia sisältävän liuoksen sumutukseen käytettävä keino saatetaan järjestää yhdessä vesiliuoksen kanssa syste-

miksi, jolla proteiinisumute tuotetaan. Vaikka esillä olevan keksinnön mukainen systeemi saattaa olla käyttökelpoinen missä tahansa tilanteessa, jossa proteiineja halutaan muuttaa sumutteen muotoon, niin on odotettavissa, että
5 tämä systeemi on eniten hyödyksi proteiineihin perustuvien lääkkeiden annostamisessa keuhkojen kautta sumutteen muodossa.

Tässä yhteydessä esillä olevassa keksinnössä on otettava huomioon, että sumutteen muodossa olevan proteiinin terapeuttisen määrän annostus on riittävä halutun terapeuttisen vaikutuksen saavuttamiseen. Proteiinin terapeuttisesti vaikuttava annos määräytyy tai erityistapauksissa riippuu useista erilaisista tekijöistä, jotka alansa tunteva lääkäri ottaa huomioon ja joihin kuuluvat toivottu
15 terapeuttinen tulos, käsiteltävän sairauden tai taudin vakavuus, hoidon kohteen fyysinen kunto jne. G-CSF:n tapauksessa noudatetaan annostusohjelmaa, jolla käsittelyä saavan yksilön veren normaali neutrofiilitaso palautuu varsinkin tapauksissa, joissa veren neutrofiililuku on
20 epänormaalin alhainen. Ihmisen veren normaali neutrofiilitaso on noin 5 000 - 6 000 neutrofiilia ml:ssa verta. Ihmisen neutrofiililuvun arvoa alle 1 000 pidetään yleisesti osoituksena vakavasta neutropeniasta, joka saattaa yksilön suureen infektiovaaraan. Kemoterapian aiheuttamasta neutropeniasta kärsivillä syöpäpotilailla suoritetut kliiniset
25 tutkimukset ovat osoittaneet, että ihonalaisesti injektoidut G-CSF:n annokset 3 - 5 µg/kg kerran päivässä kohottavat tehokkaasti tilapäisesti alentuneet veren neutrofiilitasot arvoon yli 1 000.

Kuten alan asiantuntijalle on selvää, niin käyttöolosuhteet sopivan inhalaatioannoksen antamisessa vaihtelevat riippuen käytetyn mekaanisen laitteen tyypistä. Joidenkin aerosolisysteemien, kuten sumuttimien tapauksessa lääkkeen annostustiheys ja laitteen käyttöaika riippuu
35 pääasiassa proteiinin tai muun aktiivisen koostumuksen

määrästä sumutteen tilavuusyksikössä. Mitä suurempi proteiinin konsentraatio on sumutinliuoksessa, sitä lyhyempi on yleensä käyttöaika. Jotkut laitteet kuten MDI voivat tuottaa korkeampia sumutekonsentraatioita kuin toiset, joten niiden käyttöaika halutun tuloksen saamiseksi voi olla lyhyempi.

Seuraavat esimerkit on tarkoitettu auttamaan esillä olevan keksinnön ymmärtämisestä, keksinnön todellinen suoja-alue on esitetty liitteessä olevissa patenttivaatimuksissa. On ymmärrettävä, että esitettyihin prosesseihin voidaan tehdä muunnoksia ilman, että siten poiketaan keksinnön ajatuksesta.

Esimerkki 1

Laktaattidehydrogenaasin saattaminen aerosolin muotoon.

Ajan, ilman paineen ja sumutustilavuuden vaikutus tutkittiin ensin käyttäen malliproteiininä laktaattidehydrogenaasiliuosta (LDH), koska tämän proteiinin stabiilius on helppo mitata entsyymin aktiivisuusmittauksissa käytettävällä standarditekniikalla, jota käytetään biologisesti aktiivisen (so. pilkkoutumattoman) proteiinin entsyymiaktiivisuuden kvantitatiiviseen määrittämiseen.

10 ml:n lähtötilavuuksia LDH:ta konsentraationa 25 µg/ml sisältäviä vesiliuoksia sumutettiin käyttäen Collison 3-jet sumutinta (BGI, Inc. Waltaham, Massachusetts) ja paineiman paineita 69, 172 tai 275 kPa (10, 25 tai 40 psig). Säiliönesteestä otettiin 100 ml:n alikvootteja ajankohtina $t = 0, 2, 5, 5$ ja 10 minuuttia ja jokaisesta näytteestä mitattiin entsyymiaktiivisuus.

LDH:n muodostaminen sumutteen esitetyissä olosuhteissa aiheutti säiliöliuoksessa kaikissa tapauksissa palautumattoman ajasta riippuvan entsyymiaktiivisuuden vähenemisen, kuten elektroforeesi/densitometrinen analyysi osoitti. Keskimäärin 60 % entsyymin alkuperäisestä aktiivisuudesta oli hävinnyt 60 minuutin sumuttamisen jälkeen

paineella 275 kPa (40 psig), kuten kuvio 1 nähdään. Ilman painetta alennettaessa aktiivisuushäviö pieneni asteittain, mutta ei olennaisesti (katso kuvio 1).

Esimerkki 2

5 G-CSF:n saattaminen sumutemuotoon

G-CSF-liuokset sumutettiin noudattaen samaa koejärjestelyä kuin esimerkissä 1 LDH:lle ja sumutettavan proteiinin näytteitä otettiin seuraavassa kuvattua kromatografia-analyysiä ja elektroforeesi/densitometristä analyysiä varten.

Sumuttimen säiliöstä sumuttamisen aikana G-CSF-liuoksesta otettujen näytteiden SE HPLC-analyysin mukaan G-CSF muodosti asteittain kasaumia, kuten HPLC-kolonnista ennen monomeerin piikkiä eluoitunut tämän proteiinin kasaumamuodon piikki osoitti. Kasauman muodossa olevaa proteiiniä havaittiin 15 sekunnin sumuttamisen jälkeen ja kasauman muodossa olevan proteiinin suhteellinen osuus näytti saavuttavan suurimman pysyvän arvonsa noin 5 minuutin sumutuksen jälkeen. Tyypillisesti tämä oli noin 25 - 30 % yhteenlasketuista piikkien pinta-aloista. Tämä kasauma näytti olevan ei-kovalenttinen, koska SDS-PAGE-geeleillä ei näkynyt kasaumavyöhykkeitä. Sensijaan havaittiin vain monomeerivyöhyke.

Sumutemuotoon muutetun G-CSF:n arvioimiseen käytettiin homogeenista 6-%:ista ei-denaturoivaa (so. ei sisällä SDS:ää) Novex-geeliä ja elektrodipuskuria, joka sisälsi 25 mM tris-puskuria ja 20 mM glysiiniä. Geeliin viety näyte sisälsi samoina konsentraatioina tris-puskuria (25 mM) ja glysiiniä (20 mM) ja 2,5 % glyserolia, 2,5 % sakkaroosia ja 0,025 % β -bromifenolisistä. Geeli saatettiin 50 V tasajännitteen alaiseksi noin 7 tunnin ajaksi. Geelille lisättiin noin 30 mg G-CSF:ää. Jokainen geeli värjättiin sitten Coomassie-sinisellä. Väripoiston jälkeen, mikäli se oli tarpeen, geelit joutuivat densitometriseen analyysi-

siin, jossa käytettiin LKB Ultrascan[®]XL laser-densitometriä.

Sumutemuotoon saatetun proteiiniliuoksen analyysi käyttäen geelielektroforeesia alkuperäisissä olosuhteissa paljasti, että oli muodostunut uusi vyöhyke, jonka kulku nopeus oli jonkin verran suurempi kuin alkuperäisen molekyylin kulkunopeus. Tämä uusi pilkkoutunutta proteiinia edustava vyöhyke voitiin havaita jo niinkin aikaisin kuin yhden minuutin kuluttua käsittelyn alkamisesta, kuten kuvios-
 10 viosta 2 voidaan nähdä (geelin "kontrolli"-puoli). Kuvios-
 ta 2 nähdään lisäksi, että tämän uuden vyöhykkeen voimak-
 kuus kasvoi ja näytti saavuttavan kyllästysrajan sumutus-
 ajan lisääntyessä. Uuden vyöhykkeen %-osuus on käyrän muo-
 15 dossa kuviossa 3, joka osoittaa muuttumisen tapahtuneen
 nopeasti 20 minuutin puoliajassa ja saavuttavan 40 %:n
 kyllästysasteen 5 minuutissa. Samankaltaista lievästi
 vaihtelevanasteista pilkkoutumista havaittiin pH arvojen
 3 ja 4 välillä HCl-vesiliuoksessa HCl- tai glysiinipusku-
 20 rissa. Pilkkoutuneen proteiinin ja alkuperäisen proteiinin
 karkeasti ottaen samanlaisesta liikkuvuudesta voidaan pää-
 tellä, että proteiini on edelleen ainakin osittain kietou-
 tuneena. Täysin avautuneena molekyyli kulkisi alkuperäi-
 sessä geelissä paljon hitaammin. Näiden näytteiden SDS-
 PAGE analyyseilla saatiin tosiasiaassa yksi ainoa vyöhyke
 25 kuten kuviossa 4 ("kontrolli"-puoli) nähdään, minkä seli-
 tyksenä voi olla peptidin pilkkoutumisen sijasta ennemmin-
 kin varauksen muuttuminen, kuten negatiivisen varauksen
 lisääntyminen.

Esimerkki 3

30 Poolisten orgaanisten yhdisteiden vaikutukset pro-
 teiinin stabiiliuteen

Perustuen sumutemuotoon saatettaessa esimerkeissä 1
 ja 2 havaittuun LDH:n (esim. 1) ja G-CSF:n (esim. 2) sta-
 biiliuden alenemiseen, yrityksenä havaitun pilkkoutumisen
 35 minimoimiseksi näihin vesipitoisiin proteiiniliuoksiin

lisättiin erilaisina konsentraatioina PEG:iä ja MPD:tä. Erityisesti erilaisiin joko LDH:ta tai G-CSF:ää sisältäviin vesiliuoksiin lisättiin PEG 1 000 ja 2-metyyli-2,4-pentaanidiolia. Näiden kahden tutkittavan proteiinin stabiloimiseen käytettävien poolisten orgaanisten yhdisteiden optimikonsentraation määrittämiseksi PEG 1 000 käytettiin konsentraatioina 0,1 %, 1 % ja 10 % (p/v-%) ja MPD:tä konsentraatioina 1 %, 5 % ja 10 % (p/v-%). Saadut liuokset saatettiin sumutteiden muotoon ja sumutteiden proteiinit analysoitiin geelielektroforeesilla ja densitometrillä edellä olevissa esimerkeissä kuvatulla tavalla.

LDH-liuoksella joka sisälsi 1 % PEG 1 000, saatiin tulokseksi proteiinin alkuperäisen aktiivisuuden lähes täydellisen säilymisen 60 minuutin sumuttamisen aikana paineella 275 kPa (40 psig), kuten kuviosta 5 nähdään. PEG:in suojaavan vaikutuksen todettiin myös riippuvan PEG:in konsentraatiosta, kuten kuviosta 6 nähdään. Proteiini, jonka koostumus sisälsi 1 % 2-metyyli-2,4-pentaanidiolia (MPD) säilytti olennaisesti kaiken entsyymäattisen aktiivisuutensa koko sumutusaikana.

Samankaltaisia tuloksia saatiin G-CSF ja vaihtelevina konsentraatioina näitä kahta poolista orgaanista yhdistettä sisältävillä vesiliuoksilla. Proteiinia sisältävissä liuoksissa, joihin toista poolisista orgaanisista yhdisteistä oli lisätty, havaittiin merkittävää alenemista sekä kasaumanmuodostuksessa että "pilkkoutuneen vyöhykkeen" voimakkuudessa ei-denaturoivalla PAGE:lla, kun vertailuna oli G-CSF sumutettuna ilman PEG:iä. Pilkkoutuneen proteiinin muodostus tapahtui huomattavasti hitaammin ja pilkkoutuminen näytti pysähtyvän alle 10 %:iin PEG:n läsnä ollessa, kun kontrollinäytteen pillkoutuminen oli 40 %. Pilkkoutuneen proteiinin SE-HPLC analyysi osoitti G-CSF:n stabiloitumisen riippuvuuden konsentraatiosta sekä PEG:in että MPD:n tapauksessa.

Esimerkki 4**Vertailevia mittauksia G-CSF:n sumutuksessa erilaisista vesiliuoksista**

5 Eri molekyylipainoista PEG:iä ja MPD:tä erilaisina konsentraatioina sisältävien vesiliuosten pintajännitysarvot mitattiin. Lisäksi tutkittiin, mitä sakkaroosi, jonka vaikutus veden pintajännitykseen on vastakkainen, vaikuttaa proteiinin stabilointiin. Taulukossa I on esitetty G-CSF:n havaittu pilkkoutumisprosentti 10 minuutin sumutuksen jälkeen ja vastaava näiden yhdisteiden vesiliuoksen pintajännitys.

10 Vesiliuosten pintajännitys mitattiin Denuoy'n (Leukenheimer ja Wantke, Colloid and Polymer Sci., 259, 354 (1981)) rengasmenetelmällä käyttäen Krüss K10T-pintajännitysmittaria (Krüss Company, Hampuri, Saksa). Kaikki mittaukset suoritettiin 20 °C:ssa. Kaikkien näytteisen annettiin ennen mittausta tasapainottua vähintään 30 minuuttia eri komponenttien pintakonsentraatioiden tasapainottamiseksi. Kaikki arvot muunnettiin ottaen huomioon tiheys siten kuin Harkins ja Jordan, J. Amer. Chem. Soc., 20 52, 1772 (1930), ovat esittäneet. Tarkkuuden varmistamiseksi puhtaan veden (Super Q^R, Millipore) pintajännitys mitattiin ennen kaikkia mittaussarjoja ja niiden jälkeen. Lisäksi suoritettiin kokeita sen varmistamiseksi, ettei 25 tensiometrinen renkaalle mahdollisesti muodostunut proteiinisakka vaikuttanut mittaussarvoihin. Tulokset on esitetty taulukossa I.

Taulukko I

Vesiliuos	Pilkkoutumis-% 10 min kuluttua	Pintajännitys (dyn/cm)
5 1 mM HCl (kontrolli)	39	72
1-%:inen PEG 1 000	5 - 8	65*
1-%:inen MPD	24 - 31	58
5-%:inen MPD	2 - 4	48
1-%:inen sakkaroosi	43	72
10 0,5 M sakkaroosi	44	75

*Cooper et al., J. Polymer. Sci., 3, 345-349 (1948)

Tämä analyysi osoittaa, että sekä PEG että MPD vaikuttavat suojaavasti proteiiniin G-CSF sumutuksen aikana, vaikka korkeatasoisen suojan (so. aktiivisuuden yli 90-%:inen säilyminen) saamiseen tarvittava poolisen orgaanisen yhdisteen, MPD:n määrä (5 %) on korkeampi kuin tarvittava PEG:in määrä (1 %).

Esimerkki 5

20 Vertailu tiettyjen poolisten orgaanisten yhdisteiden ja pinta-aktiivisten aineiden vaikutuksesta proteiinin stabiiliuteen

Lisäkokeissaa tutkittiin, mitä erilaiset pooliset orgaaniset yhdisteet ja pinta-aktiiviset yhdisteet vaikuttavat proteiinin stabiiliuteen sumutettaessa. Erityisesti tutkittiin polyoksietyleenisorbitaanimononoleaatin (Tween 80), sakkaroosin ja metyyliipentaanidiolin (MPD) (kaikki firmasta Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) kykyä stabiloida G-CSF ja LDH sumutettaessa. Lisäksi analysoitiin eri molekyylipainoisia PEG:ejä sen seikan tutkimiseksi, minkälaisia eroja näiden yhdisteiden erilaisella molekyylipainolla saadaan suojavaikutukseen. Erityisesti tutkittiin PEG 8 000 (keskimääräinen molekyylipaino 8 000) ja PEG 400 (keskimääräinen molekyylipaino 400) edellä olevissa esimerkeissä käytetyn PEG 1 000:n lisäksi (kaikki PEG:it firmasta Union Carbide). Poolinen orgaaninen yhdis-

te ja/tai pinta-aktiivinen aine lisättiin ennen sumutusta, joka suoritettiin noudattaen edellä esimerkissä 1 kuvattua koejärjestelyä.

5 Geelielektroforeesi ilman natriumdodekylibentseenisulfaattia ja natriumdodekylibentseenisulfaatin läsnä ollessa suoritettiin edellä esimerkissä 2 kuvatulla tavalla. Geelisuodatuskromatografia suoritettiin käyttäen Superose^R 12 FPLC kolonnia (1 x 30 cm, Pharmacia, Uppsala, Ruotsi) ja eluenttina 0,1 M natriumfosfaattia, pH 6,9. 10 Virtausnopeus oli 0,5 ml/min ja eluointia seurattiin 280 nm absorbanssilla. Pintajännitysmittaukset suoritettiin rengasmenetelmällä edellä esimerkissä 4 kuvatulla tavalla.

A. PEG:in molekyyllipainon vaikutus

15 PEG:in molekyyllipainon vaikutus G-CSF:n stabilointiin sumutuksessa tutkittiin käyttäen 400, 1 000 ja 8 000 daltonin PEG:ejä kutakin konsentraatioina 0,001 ja 1,0 % (p/v.). Tulokset nähdään vastaavasti kuvioissa 7A ja 7B. PEG:in konsentraatiossa 0,001 % (p/v) ei ollut olennaisesti mitään korrelaatiota proteiinin stabiloitumisen ja 20 PEG:in molekyyllipainon välillä (kuvio 7A). Sensijaan PEG:in konsentraatiossa 1 % (p/v) molekyyllipainon ja stabiloitumisen välillä havaittiin selvä riippuvuus siten, että PEG:in molekyyllipainon kasvaessa havaittiin selvä 25 taipumus suurempaan stabiiliuteen.

B. MPD:n vaikutus

MPD:n suojavaikutus LDH:n ja G-CSF:n sumutuksessa testattiin. Samoin kuin PEG MPD on proteiinin stabiloiija, jonka pinta-aktiivisuus on heikko. Kun valmistettiin LDH:n 30 koostumus, joka sisälsi MPD:tä 1 % (p/v), niin proteiini säilytti lähes 100-%:isesti aktiivisuutensa sumutusajanjaksona, kun sensijaan säilynyt aktiivisuus ilman lisäaineita oli vain noin 33 %. MPD:n stabiloiva vaikutus G-CSF:n pilkkoutumista vastaan 10 minuutin sumutuksessa on 35 esitetty taulukossa II.

Taulukko II

	MPD:n konsentraatio (paino/tilavuus)	Pilkkoutumis-% 10 minuutissa
	0 %	39
5	0,01 %	33
	0,1 %	35
	1 %	28
	2,5 %	15
	5 %	3
10	10 %	0

Ajan kuluessa G-CSF:n pilkkoutuminen oli hitaampaa MPD:n läsnä ollessa kuin kontrollikokeessa. Samoin kuin PEG:in tapauksessa G-CSF:n stabilointi MPD:llä oli vahvas-
 15 ti riippuvainen konsentraatiosta. MPD:n tapauksessa tämä erityinen poolinen orgaaninen yhdiste oli erittäin vähän stabiloiva konsentraatiossa alle 0,1 %. Olennainen stabi-
 20 lointi, vaikkakin vähäisempi kuin korkeampimolekyylipainoisilla PEG:eillä samana konsentraationa havaittiin MPD:n konsentraatiolla 1 %. Jonkin verran suurempi suojavaikutus kuin 1 %:lla PEG 1 000 saatiin 5 %:lla MPD:tä ja 10 % MPD:tä antoi käytännöllisesti katsoen täyden suojan.

C. Sakkaroosin vaikutus

Sakkaroosin vaikutus konsentraationa 2 % (p/v, 0,058 M) tai 20 % (p/v, 0,58 M) LDH:n aktiivisuuden säily-
 25 miseen sumutettaessa mitattiin. Tulokset osoittavat, että sakkaroosilla ei ollut merkittävää suojavaikutusta pilkkoutumista vastaan ja tosiasia-
 30 ssa sillä oli taipumus edelleen heikentää LDH:n aktiivisuutta. Myös sakkaroosin vaikutus 1 %:n (p/v) ja 0,5 M (17 %) konsentraationa G-CSF:n stabilointiin määritettiin 10 minuutin sumutuksen jälkeen, ja saadut tulokset olivat lähes samat kuin LDH:lle saadut. Kuten edellä jo todettiin, sakkaroosilla ei siten ollut suojaavaa vaikutusta pilkkotumista vastaan G-CSF:n sumu-

tuksessa. Tosiasiassa sakkaroosilla osoitettiin olevan mahdollista destabiloivaa vaikutusta.

D. Tween 80:n vaikutus

5 Vaikka Tween 80:n liiallinen vaahtoaminen teki sumuttamisen vaikeaksi, niin tämän pinta-aktiivisen aineen vaikutus G-CSF:n pilkkoutumiseen sumutuksen aikana tutkittiin useilla erilaisilla pinta-aktiivisen aineen konsentraatioilla. Tulokset on koottu seuraavan taulukkoon III.

10

Taulukko III

	Tween 80 (p/v)	Pilkkoutuminen %:eina 10 minuutin kuluttua	Pintajännitys
	0 %	40	72
	0,0001 %	39	51
15	0,001 %	39	49
	0,005 %	36	
	0,0075 %	20	
	0,01 %	8	40
	0,05 %	0	
20	0,1 %	0	38
	1 %	0	38

Näistä tuloksista ilmenee, että Tween 80 samoin kuin pooliset orgaaniset yhdisteet PEG ja MPD stabiloi G-CSF:n pilkkoutumista vastaan vahvasti konsentraatiosta riippuvalla tavalla. Olennaisesti minkäänlaista stabiloivaa vaikutus ei havaittu pinta-aktiivisen aineen konsentraatiossa alle 0,001 % (p/v), vaikka olennaista stabiloivaa vaikutusta havaittiin noin 0,01 %:n (p/v) konsentraatiossa. Käytännöllisesti katsoen stabiloiva vaikutus oli täydellinen konsentraatioissa yli 0,05 % (p/v). Samankaltainen stabiloitumismalli havaittiin koskien LDH:n aktiivisuutta Tween 80:n läsnäollessa.

30

E. Pintajännitys

Taulukkoon IV on koottu tulokset G-CSF:n ja useiden erilaisten poolisten orgaanisten yhdisteiden ja/tai pinta-aktiivisten aineiden vesiliuoksilla tässä ja edellä olevassa esimerkissä tehdyistä pintajännityksen mittauksista.

Taulukko IV

	Vesiliuos	Pilkkouutuminen %:eina 10 minuutin kuluttua	Pintajännitys (dyn/cm)
10	1 mM HCl (kontrolli)	39	72
	1 % PEG 1 000	5 - 8	65*
	1 % MPD	24 - 31	58
	5 % MPD	2 - 4	48
15	1 % sakkaroosi	43	72
	0,5 M sakkaroosi	44	75
	0,0001 % Tween 80	39	51
	0,001 % Tween 80	39	49
	0,01 % Tween 80	8	40
20	0,1 % Tween 80	0	38
	1 % Tween 80	0	38

* Cooper et al., J. Polymer Sci., 3, 345 - 349 (1948)

Taulukon IV luvuista ilmenee, että sekä PEG että MPD, jotka alentavat veden pintajännitystä, vähentävät vahvasti G-CSF proteiinissa havaittua pilkkoutumista, kun niitä käytetään lisäaineina sumutuksen aikana. Toisaalta sakkaroosi, joka lievästi suurentaa veden pintajännitystä, myös lievästi lisäsi proteiinin pilkkoutumista. Tween 80:llä osoitettiin olevan selvä vaikutus G-CSF:n stabiili-suuteen sumutuksen aikana kuten taulukossa IV on osoitettu. Tämä on tyypillistä pinta-aktiivisille aineille, mutta, kuten aikaisemmin huomautettiin, pinta-aktiivisten aineiden vaahtoamistaipumus tekee ne useissa tapauksissa poolisia orgaanisia yhdisteitä huonommin sopiviksi käyttöön paineilmasumutuksessa.

Patenttivaatimukset

- 5 1. Menetelmä proteiinin aktiivisuuden vähenemisen ja pilkkoutumisen estämiseksi mainittua proteiinia sisältävästä sumutettavasta vesiliuoksesta, t u n n e t t u siitä, että mainittuun liuokseen lisätään poolista orgaanista yhdistettä konsentraationa, joka alentaa veden pintajännityksen arvoon korkeintaan noin $6,5 \times 10^{-4}$ N/cm (65 dyn/cm).
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu poolinen orgaaninen yhdiste on polyetyleeniglykoli tai metyylipentaanidioli.
- 15 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu poolinen orgaaninen yhdiste on polyetyleeniglykoli ja mainittu proteiini on granulosityttipesäkettä stimuloiva tekijä.
- 20 4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu polyetyleeniglykoli on PEG 1 000 ja sitä on läsnä konsentraationa vähintään noin 1 %.
- 25 5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu poolinen orgaaninen yhdiste on metyylipentaanidioli ja että se alentaa veden pintajännityksen arvoon korkeintaan noin $4,8 \times 10^{-4}$ N/cm (48 dyn/cm).
- 30 6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu metyylipentaanidioli on 2-metyyli-2,4-pentaanidioli, mainittu proteiini on granulosityttipesäkettä stimuloiva tekijä, ja että mainittua 2-metyyli-2,4-pentaanidiolia on läsnä konsentraationa vähintään noin 5 %.
- 35 7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini sumutetaan painemasumuttimella.
8. Menetelmä proteiinin aktiivisuuden vähenemisen ja pilkkoutumisen estämiseksi mainittua proteiinia sisäl-

tävistä sumutettavasta vesiliuoksesta, t u n n e t t u siitä, että mainittuun liuokseen lisätään pinta-aktiivista ainetta konsentraationa, joka alentaa veden pintajännityksen arvoon korkeintaan noin $4,0 \times 10^{-4}$ N/cm (40 dyn/cm).

5 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu pinta-aktiivinen aine on Tween 80, mainittu proteiini on granulosityttipesäkettä stimuloiva tekijä ja mainittua Tween 80:ä on läsnä konsentraationa vähintään noin 0,01 %.

10 10. Veteen dispergoituna proteiinia sisältävä vesiliuos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää poolista orgaanista yhdistettä konsentraationa, joka alentaa veden pintajännityksen arvoon korkeintaan noin $6,5 \times 10^{-4}$ N/cm (65 dyn/cm).

15 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vesiliuos, t u n n e t t u siitä, että mainittu poolinen orgaaninen yhdiste on polyetyleeniglykoli tai metyyli-pentaanidioli.

20 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen vesiliuos, t u n n e t t u siitä, että mainittu poolinen orgaaninen yhdiste on polyetyleeniglykoli ja mainittu proteiini on granulosityttipesäkettä stimuloiva tekijä.

25 13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen vesiliuos, t u n n e t t u siitä, että mainittu polyetyleeniglykoli on PEG 1 000 ja sitä on läsnä konsentraationa vähintään noin 1 %.

30 14. Patenttivaatimuksen 11 mukainen vesiliuos, t u n n e t t u siitä, että mainittu poolinen orgaaninen yhdiste on metyyli-pentaanidioli ja se alentaa veden pintajännityksen arvoon korkeintaan noin $4,8 \times 10^{-4}$ N/cm (48 dyn/cm).

 15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen vesiliuos, t u n n e t t u siitä, että mainittu metyyli-pentaanidioli on 2-metyyli-2,4-pentaanidioli, mainittu proteiini on granulosityttipesäkettä stimuloiva tekijä ja mainittua 2-me-

tyyli-2,4-pentaanidiolia on läsnä konsentraationa vähintään noin 5 %.

5 16. Veteen dispergoituna proteiinia sisältävä vesiliuos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää pinta-aktiivista ainetta konsentraationa, joka alentaa veden pintajännityksen arvoon korkeintaan noin $4,0 \times 10^{-4}$ N/cm (40 dyn/cm).

10 17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen vesiliuos, t u n n e t t u siitä, että mainittu pinta-aktiivinen aine on Tween 80, mainittu proteiini on granulosyyttipesäkettä stimuloiva tekijä ja mainittua Tween 80:ä on läsnä konsentraationa vähintään noin 0,01 %.

15 18. Sumutteena proteiinia potilaalle annostava systeemi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 10 mukaisen vesiliuoksen ja välineen mainitun vesiliuoksen sumuttamiseksi.

20 19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että mainittu vesiliuos sisältää proteiinia dispergoituna veteen ja polyetyleeniglykolia.

20 20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini on granulosyyttipesäkettä stimuloiva tekijä, mainittu polyetyleeniglykoli on PEG 1 000 ja mainittua PEG 1 000 on läsnä konsentraationa vähintään noin 1 %.

25 21. Patenttivaatimuksen 18 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että mainittu vesiliuos sisältää proteiinia dispergoituna veteen ja metyyli-2,4-pentaanidiolia.

30 22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että mainittu metyyli-2,4-pentaanidioli on 2-metyyli-2,4-pentaanidioli, mainittu proteiini on granulosyyttipesäkettä stimuloiva tekijä ja mainittua 2-metyyli-2,4-pentaanidiolia on läsnä konsentraationa vähintään noin 5 %.

FIG. 1

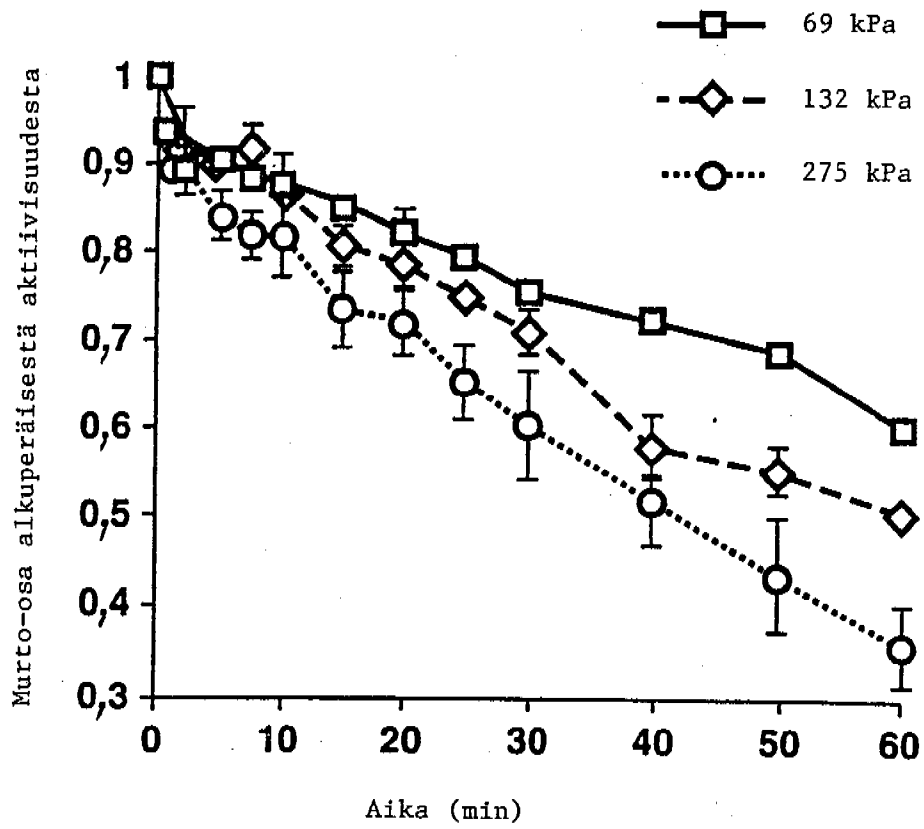


FIG. 2

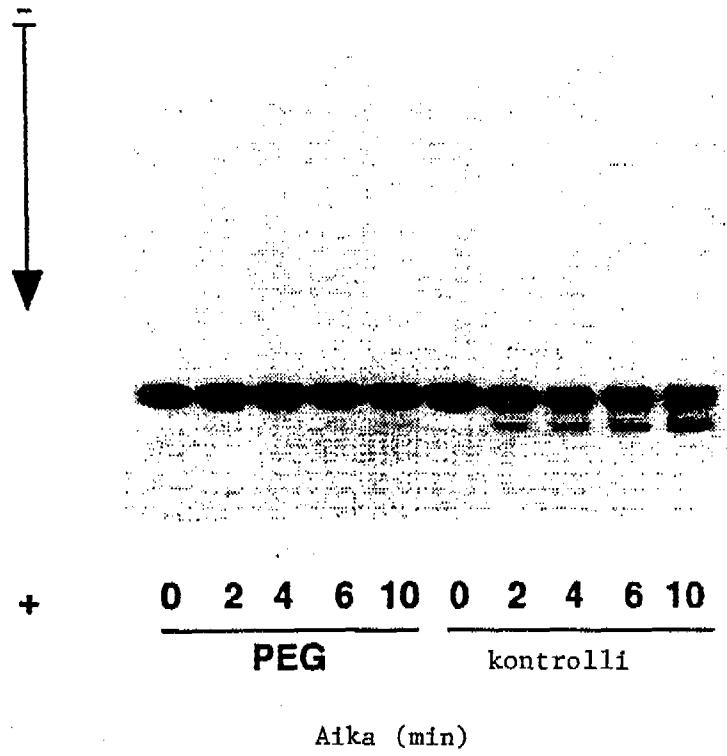


FIG. 3

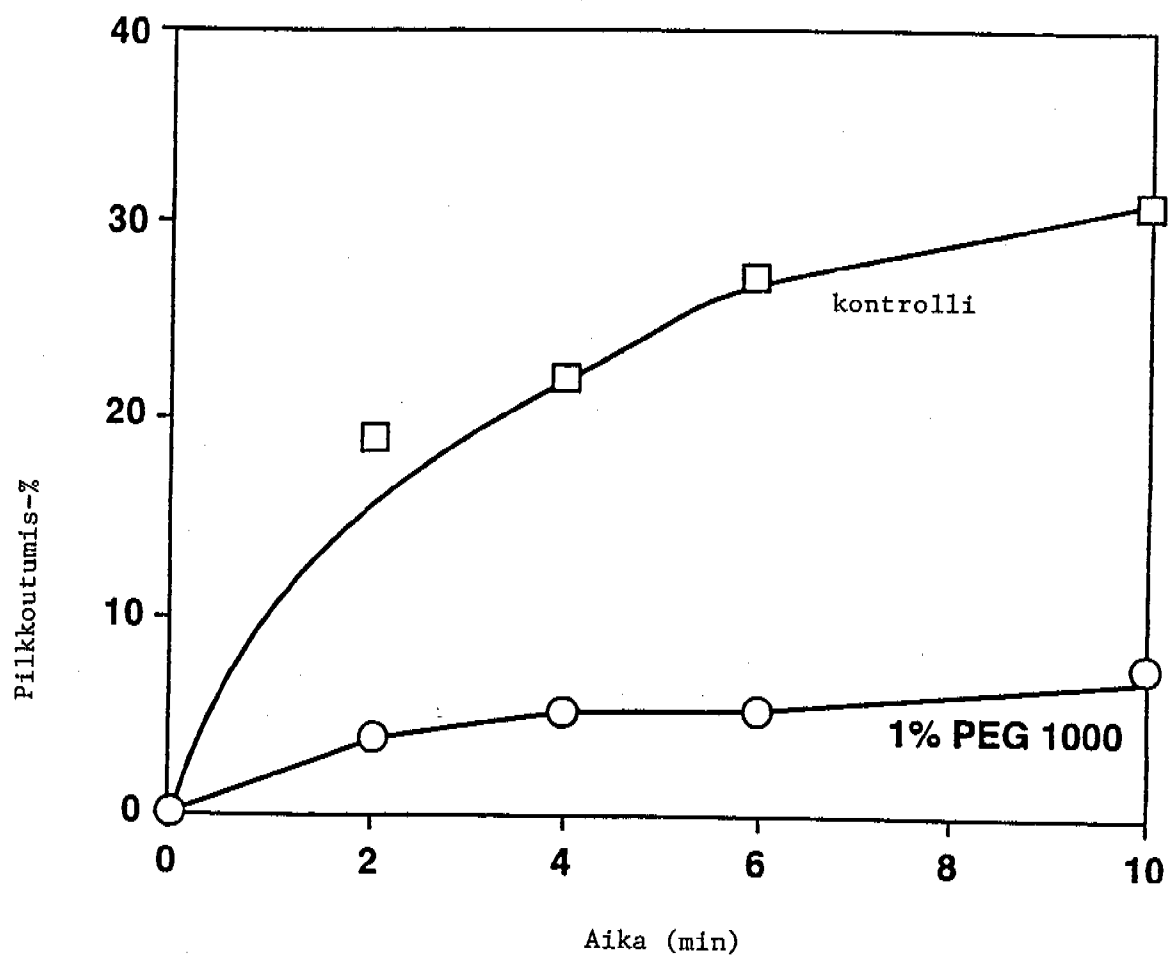


FIG. 4

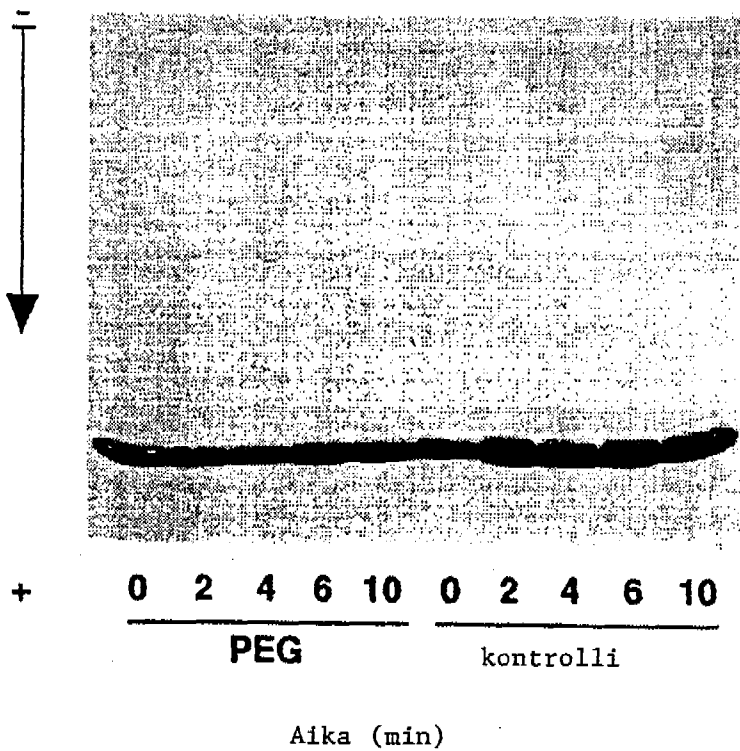


FIG. 5

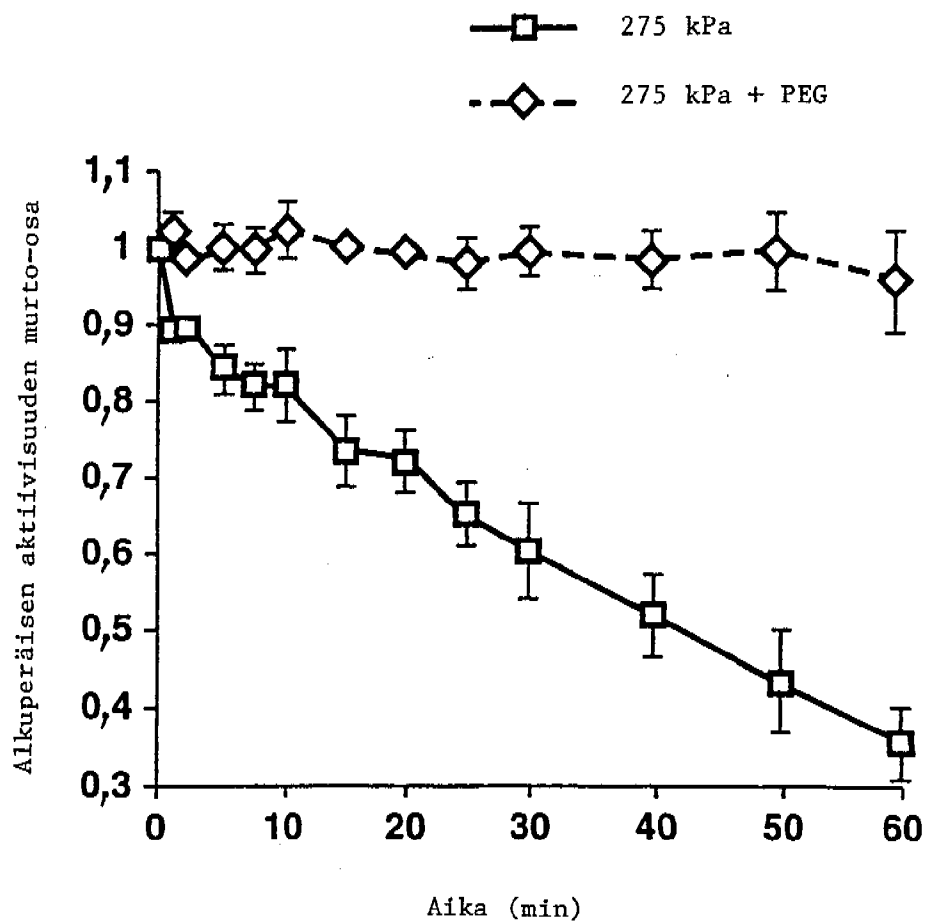


FIG. 6

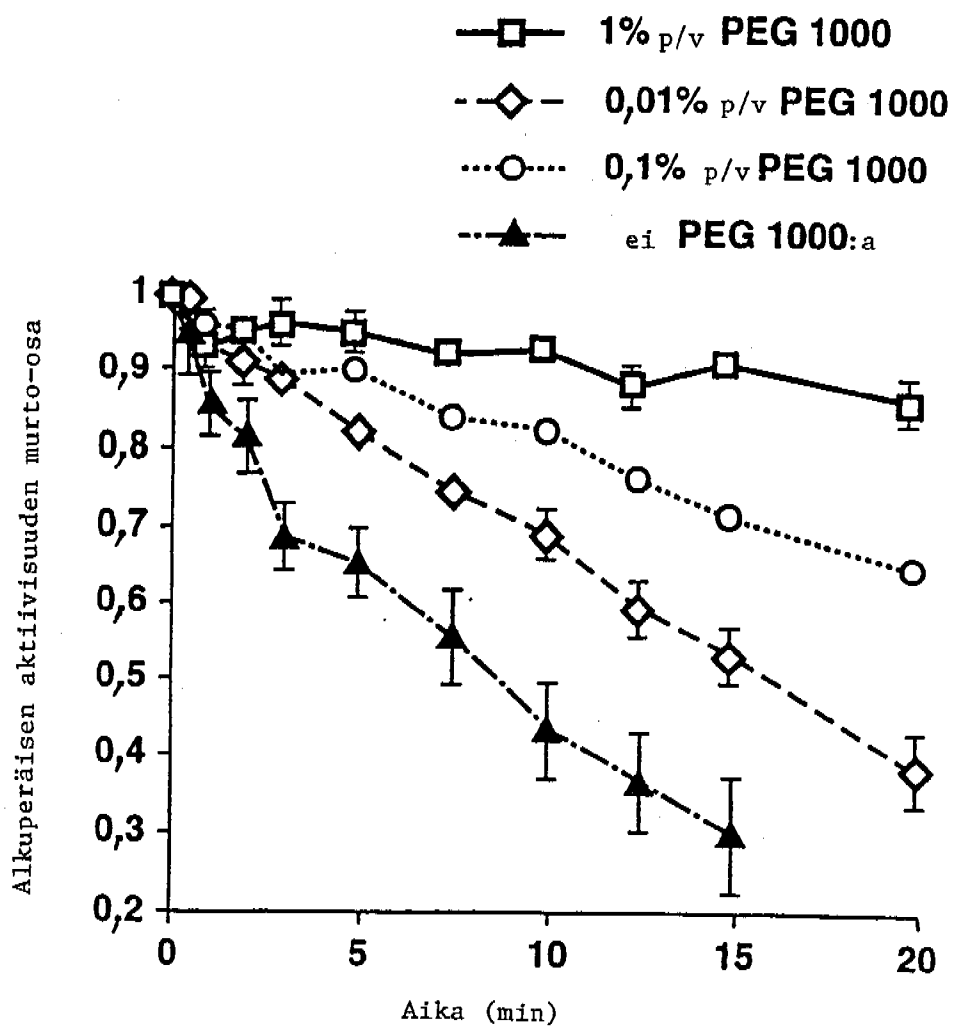


FIG. 7A

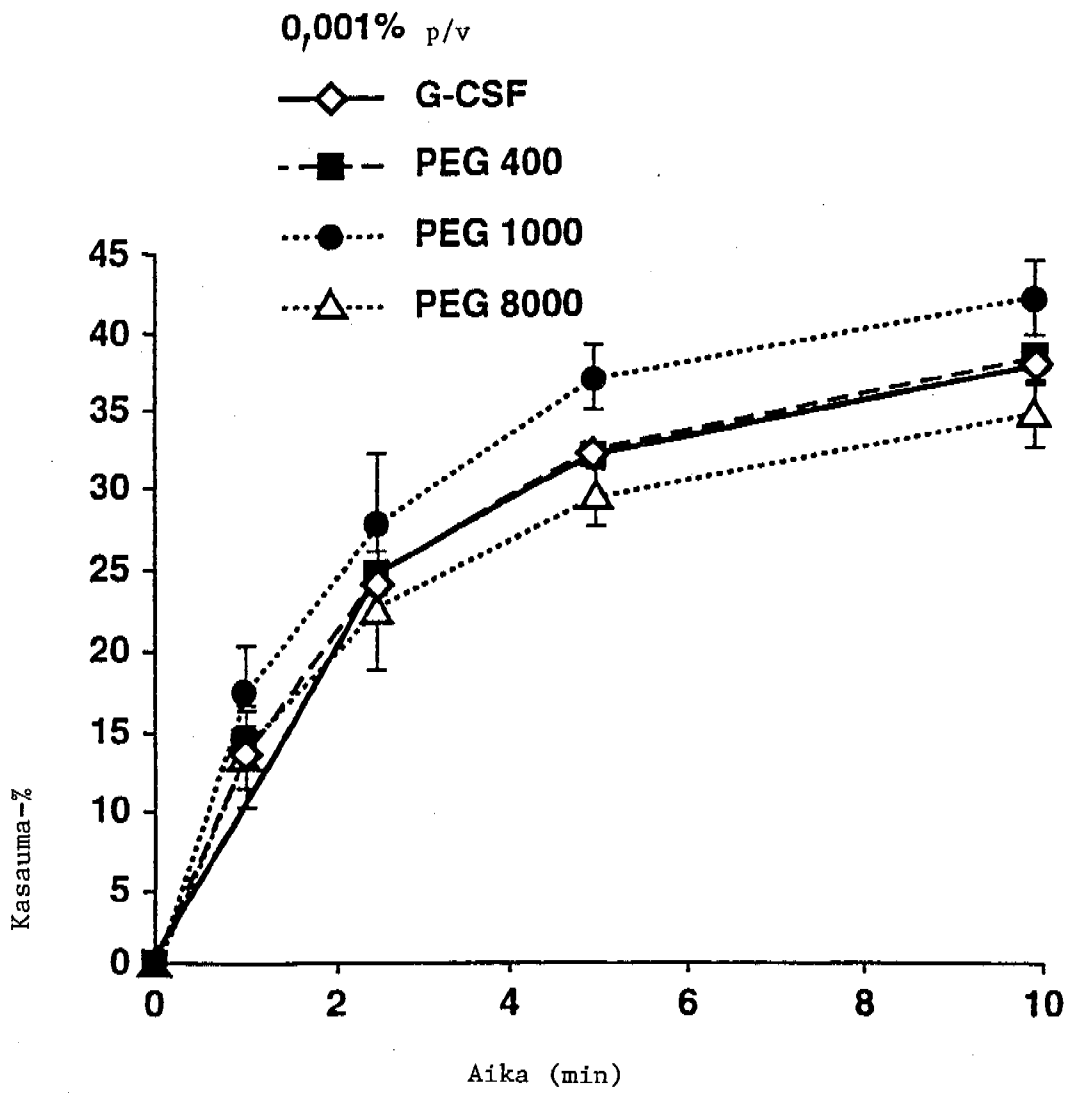


FIG. 7B

