



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 33 399 T2** 2005.10.27

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 859 601 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 33 399.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/16277**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 936 356.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/013502**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.10.1996**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **17.04.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.08.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **15.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.10.2005**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 9/16**
A61K 38/19

(30) Unionspriorität:

542445 **12.10.1995** **US**

(73) Patentinhaber:

Schering AG, 13353 Berlin, DE; Wyeth Holdings Corp., Madison, N.J., US

(74) Vertreter:

Eisenführ, Speiser & Partner, 28195 Bremen

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

GOMBOTZ, Wayne, Kenmoord, US; PETTIT, Dean, Seattle, US; PANKEY, Susan, Seattle, US; LAWTER, Ronald, James, Goshen, US; HUANG, W. James, Sommerville, US

(54) Bezeichnung: **VERLÄNGERTE FREISETZUNG VON GM-CSF**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung ist allgemein auf dem Gebiet der Mikrokügelchenformulierungen für den rekombinanten humanen Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) mit kontrollierter, lang anhaltender Freisetzung.

[0002] GM-CSF, Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor, ist ein hämatopoietischer Wachstumsfaktor, welcher die Proliferation und Differenzierung hämatopoietischer Vorläuferzellen fördert. Das geklonte Gen für GM-CSF wurde in Bakterien, Hefe- und Säugetierzellen exprimiert. Das humane endogene Protein ist ein monomeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 22.000 Dalton. In einem Hefeexpressionssystem produzierter GM-CSF ist als Leukine® von Immunex Corporation, Seattle, Washington im Handel erhältlich. Es ist ein Glykoprotein aus 127 Aminosäuren, charakterisiert durch drei primäre Molekulararten mit Molekülmassen von 19.500, 16.800 und 15.500 Dalton.

[0003] GM-CSF wird im Allgemeinen über einen Zeitraum von mindestens 6 bis 7 Tagen verabreicht, um die optimale Wirkung auf die weißen Blutkörperchen zu erzielen. Unter gewissen Umständen ist es erwünscht, eine Formulierung zu haben, welche eine anhaltende kinetische Freisetzung von GM-CSF nullter oder erster Ordnung über einen Zeitraum von ungefähr einer Woche liefert. Außerdem kann die Formulierung von GM-CSF mit verlängerter Freisetzung einen vorteilhaften therapeutischen Nutzen haben, den flüssige Standardformulierungen nicht aufweisen. Formulierungen von GM-CSF mit verlängerter Freisetzung sind jedoch gegenwärtig nicht erhältlich.

[0004] Formulierungen mit kontrollierter Freisetzung sind für die Arzneistoffabgabe gut bekannt. Sowohl biologisch abbaubare als auch biologisch nicht abbaubare Polymere wurden verwendet, um Mikrokapseln, Mikrokügelchen oder Mikropartikel unterschiedlicher Durchmesser, Porositäten und Arzneistoffgehalte mit dem Ziel des Erreichens einer Freisetzung des eingekapselten Arzneistoffs über einen längeren Zeitraum zu formen. Viele Formulierungen, die entwickelt wurden, sind für die Verabreichung durch Injektion aufgebaut, obwohl die Mehrheit der Formulierungen mit kontrollierter Freisetzung magensaftresistente Überzüge aufweisen oder Formulierungen sind, die gegen den Durchtritt durch den Magen-Darm-Trakt resistent sind, die für die orale Verabreichung entwickelt wurden.

[0005] Es ist schwierig, eine lineare, kontrollierte Freisetzung bei Verwendung von Standardformulierungen zu erzielen. Die meisten Formulierungen sind entweder dazu entwickelt, eine sehr schnelle Freisetzung durch Diffusion und/oder Abbau des das Mikropartikel formenden Polymers zu liefern oder eine Sprengfreisetzung, gefolgt von irgendeiner Art der linearen Freisetzung, welche im Allgemeinen nach einem längeren Zeitraum ein Plateau erreicht, zu liefern. US-Patent Nr. 5,192,741 von Orsolini et al. ist repräsentativ für die Literatur in Bezug auf die Schwierigkeiten beim Erzielen einer kontrollierten Freisetzung aus aus Poly(lactid-co-glykoliden) (PLGAs) geformten Mikrokügelchen. Ähnlich beschreiben Lu und Park, J. Pharm. Sci. Technical 1995, 49, 13–19 die Verwendung von Mikrokapseln, wobei sie anmerken, dass man mit Mikrokügelchen kein gutes Freisetungsverhalten erhalten kann und dass die Proteinstabilität in den Mikrokügelchen ein Problem ist. Da GM-CSF eine äußerst wirksame Verbindung ist, wobei die Wirkung irrsprünghaft von der gegebenen Dosierung weit variieren kann, kann es unter gewissen Umständen vorteilhaft sein, eine stärker lineare Freisetzung des freigesetzten Arzneistoffs als eine Sprengfreisetzung, gefolgt von einem Plateau, zu erzielen.

[0006] Repräsentativ für die zahlreichen Patente, die die kontrollierte Freisetzung betreffen, ist US-Patent Nr. 4,767,628 von Hutchinson, das die mehrphasige Freisetzung eines Peptids aus einem PLGA-Träger offenbart. Polymermischungen werden in einem Abgabesystem mit großer Matrix verwendet, um eine mehrphasige Freisetzung zu verhindern. US-Patent Nr. 4,897,268 von Tice et al. offenbart die Verwendung verschiedener PLGAs in derselben Zusammensetzung, mischt aber aus verschiedenen PLGAs hergestellte Mikrokügelchen, um eine lineare Freisetzung zu erzielen. US-Patent Nr. 4,849,228 von Yamamoto et al. beansprucht PLGA-Mikrokügelchen mit einem sehr geringem Gehalt an einbasiger Säure, welche angeblich ein hervorragendes Freisetungsverhalten aufweisen. PCT WO 94/01133 von Schering Corporation offenbart Mikrokügelchen aus GM-CSF, hergestellt unter Verwendung verschiedener Polymere, wie Polyanhydride, Polyphosphazene und Kollagen. PCT WO 91/12882 von Medgenix Group S. A. offenbart Mikrokügelchen zur kontrollierten Freisetzung von wasserlöslichen Substanzen, hergestellt unter Verwendung von Polymeren, wie Poly(milchsäure-co-glykolsäure). PCT WO 95/06077 von Sandoz Patent GmbH offenbart Polymermatrizen, die Polyethylen-carbonat enthalten, und aus den Polymermatrizen hergestellte Arzneimittel. DE 44 06 172 A1 von Schwarz Pharma AG offenbart verzweigte Polyester mit Molekulargewichten bis zu 500.000, hergestellt aus elektrolyt-

substituierten Polyolen und Polyhydroxysäuren.

[0007] Es ist deshalb eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Formulierung unter Einkapselung von GM-CSF zur Verfügung zu stellen, welche für eine kontrollierte, lang anhaltende Freisetzung entweder mit Kinetik nullter Ordnung, Freisetzungskinetik erster Ordnung oder mehrphasiger Freisetzungskinetik über einen Zeitraum von mehr als einem Tag, der Verabreichung an einen Patienten durch Injektion folgend, sorgt.

[0008] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Formulierung zur Abgabe von GM-CSF für die orale, trans mukosale, topische Verabreichung oder die Verabreichung durch Injektion zur Verfügung zu stellen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Es wurden Formulierungen zur kontrollierten, lang anhaltenden Freisetzung von GM-CSF entwickelt. Diese basieren auf festen Mikropartikeln, geformt aus der Kombination von biologisch abbaubaren, synthetischen Polymeren, wie Polymilchsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA), und Copolymeren davon mit Exzipienten und Arzneistoffgehalten, die eine verlängerte Freisetzung über einen Zeitraum von einem Tag bis zu mindestens einer Woche liefern, wenn sie oval, trans mukosal, topisch oder durch Injektion verabreicht werden. In der bevorzugten Ausführungsform haben die Mikropartikel in Abhängigkeit von ihrem Verabreichungsweg unterschiedliche Durchmesser. Die durch Injektion verabreichten Mikropartikel weisen Durchmesser auf, die klein genug sind, um eine Nadel zu passieren, in einem Größenbereich zwischen 10 und 100 µm. Oral verabreichte Mikropartikel sind weniger als 10 µm im Durchmesser, um die Aufnahme durch die Peyer-Plaques im Dünndarm zu erleichtern.

[0010] Es wurden andere Ausführungsformen entwickelt, um die Freisetzungskinetik oder die Art, in welcher der Arzneistoff in vivo verteilt wird, zu verändern. In einigen Fällen wird beispielsweise ein Polymer ausgewählt, welches eine leicht entzündliche Reaktion auslöst, z. B. PLGA und Polyanhydride, welche als Chemoattraktant, entweder wegen des Polymers selbst oder wegen geringen Verunreinigungen in dem Polymer, wirken können. In einer anderen Ausführungsform wird der GM-CSF in einem Hydrogel verabreicht, das subkutan oder an einer spezifischen Stelle zur kontrollierten Freisetzung injiziert werden kann.

[0011] Die Mikropartikel oder das Hydrogel werden dem Patienten in einer Menge verabreicht, die zum Stimulieren der Proliferation hämatopoietischer Zellen, insbesondere weißer Blutkörperchen, wirksam ist. Dies sind am meisten bevorzugt durch Injektion verabreichte Mikrokügelchen.

[0012] Beispiele demonstrieren die Herstellung von Mikropartikeln, die GM-CSF über einen langen Zeitraum mit einer Freisetzungskinetik nullten Ordnung, erster Ordnung oder mit einer mehrphasigen Freisetzungskinetik freisetzen. Der Typ der Freisetzungskinetik wird für die spezielle klinische Anwendung ermittelt. Die Daten zeigen, dass es nicht nur möglich ist, das gewünschte Freisetzungsverhalten herbeizuführen, sondern auch äußerst hohe Werte der Bioaktivität des eingekapselten GM-CSF zu halten. Beispiele demonstrieren außerdem die Freisetzung aus Hydrogelen.

Kurzbeschreibung der Abbildungen

[0013] [Fig. 1A](#) ist ein Diagramm der Freisetzung von GM-CSF, mittlere kumulative Freisetzung in vitro in Prozent über der Zeit (Tage) für einen Zusatz von 1 (Quadrat) und einen Zusatz von 3% (Rauten) in durch Phasentrennung mit einem einzigen PLGA-Copolymer hergestellten Mikrokügelchen. [Fig. 1B](#) ist ein Diagramm der Freisetzung von GM-CSF, mittlere kumulative Freisetzung in vitro in Prozent über der Zeit (Tage) für einen Zusatz von 1,54% (Quadrat, Charge B4), einen Zusatz von 1,28% (Rauten, Charge O4) und einen Zusatz von 1,5% (Kreise, Charge V4) in durch Phasentrennung unter Verwendung einer Mischung aus PLA- und PLGA-Polymeren hergestellten Mikrokügelchen.

[0014] [Fig. 2A](#) ist ein Diagramm der Freisetzungskinetik in vitro für Mikrokügelchen der "Charge O", hergestellt durch Phasentrennung eines PLGA mit einem einzigen Molekulargewicht, das die Freisetzung von GM-CSF als kumulative Freisetzung in vitro in Prozent über der Zeit (Tage) zeigt. [Fig. 2B](#) ist ein Diagramm der Spiegel an GM-CSF von Mausserum (ng/ml) über der Zeit (Tage), den Mikrokügelchen- oder Bolusinjektionen folgend, für 50 mg Mikrokügelchen, 500 µg Bolus und 50 µg Bolus. [Fig. 2C](#) ist ein Diagramm der Spiegel an GM-CSF, die der Mikrokügelcheninjektion folgen (Rauten), gegen Spiegel, berechnet aus der Freisetzungsgeschwindigkeit in vitro und der experimentellen Halbwertszeit (Linie).

[0015] **Fig. 3A** ist ein Diagramm der Freisetzung von GM-CSF, mittlere kumulative Freisetzung in vitro in Prozent über der Zeit (Tage) für Mikrokügelchen der Charge V4, hergestellt durch Phasentrennung unter Verwendung einer Mischung aus zwei PLGAs unterschiedlichen Molekulargewichts und einer PLA. **Fig. 3B** ist ein Diagramm der TF-1-Bioaktivität von Freisetzungspuren der Charge V4, Aktivität zu diskreten Zeitpunkten (Tagen) in Prozent. **Fig. 3C** sind Diagramme der Anzahl der weißen Blutkörperchen (WBC), der absoluten Neutrophilenzahl (ANC) und der Thrombozytenzahl in Primaten, denen GM-CSF enthaltende Mikrokügelchen injiziert wurden, als Funktion der Zeit (Tage).

[0016] **Fig. 4** ist ein Diagramm der Freisetzung von GM-CSF aus einem PLGA-Gel, kumulative Freisetzung in Prozent über der Zeit (Tage).

[0017] **Fig. 5** ist ein Diagramm der TF-1-Zellaktivität von GM-CSF, extrahiert mit Essigsäure aus PLGA-Mikrokügelchen, das die Aktivität in Prozent gegen die Mikrokügelchencharge grafisch darstellt.

[0018] **Fig. 6** ist ein Diagramm des Abbaus von PLGA über der Zeit von drei Mikrokügelchenarten, hergestellt entweder aus PLGA (Cytec 0,7 IV), PLA (R104) oder einer 80/20-Mischung der beiden Polymere, das das Gewichtsmittel des Molekulargewichts über der Zeit (Tage) grafisch darstellt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0019] Es gibt viele Vorteile bei einer Formulierung mit kontrollierter Freisetzung von GM-CSF. Unter diesen sind der Vorteil einer einzigen Injektion für den Patienten und den Arzt, das Vermeiden von Gipfeln und Tälern bei der systemischen Konzentration an GM-CSF, welche mit wiederholten Injektionen verbunden sind, die Möglichkeit, die Gesamtdosierung an GM-CSF zu verringern, und die Möglichkeit, die pharmakologischen Wirkungen von GM-CSF zu verbessern. Eine Formulierung mit kontrollierter Freisetzung von GM-CSF bietet außerdem die Möglichkeit, GM-CSF auf eine vorher nicht genutzte Weise zu verwenden, wie als Impfstoffadjuvans.

Formulierungen mit kontrollierter Freisetzung

[0020] Wie hierin verwendet, kann die "anhaltende" oder "verlängerte" Freisetzung von GM-CSF kontinuierlich oder diskontinuierlich, linear oder nichtlinear sein. Das kann unter Verwendung einer oder mehrerer Arten von Polymerzusammensetzungen, Arzneistoffzusätzen, des Einschlusses von Exzipienten oder Abbaubeschleunigern oder anderen Modifikatoren realisiert werden, verabreicht allein, in Kombination oder aufeinanderfolgend, um die gewünschte Wirkung herbeizuführen. Eine Freisetzung nullter Ordnung oder eine lineare Freisetzung ist im Allgemeinen so aufzufassen, dass die Menge des über die Zeit freigesetzten GM-CSF als Funktion von Menge/Zeiteinheit während des gewünschten Zeitrahmens, z. B. sechs bis sieben Tage, relativ konstant bleibt. Mehrphasig ist im Allgemeinen so aufzufassen, dass die Freisetzung bei mehr als einem "Sprengen" stattfindet.

[0021] Wie hierin verwendet, bezeichnen "Mikropartikel" Teilchen mit einem Durchmesser von weniger als 1 mm, typischer weniger als 100 µm. Mikropartikel können Mikrokügelchen, welche feste kugelförmige Mikropartikel sind, und Mikrokapseln, welche kugelförmige Mikropartikel mit einem Kern aus einem anderen Polymer, einem Arzneistoff oder einer Zusammensetzung sind, betreffen. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich Mikropartikel auf feste Teilchen, nicht auf Mikrokapseln.

Polymere zur Bildung von Mikropartikeln

[0022] Viele Polymere sind für die kontrollierte Arzneistoffabgabe verwendet worden. Polymere sind typischerweise thermoplastische synthetische Polymere, wie Ethylvinylacetat und Polyacrylsäure, welche im Allgemeinen als biologisch nicht abbaubar angesehen werden, da sie in relativ derselben Form über einen der Implantation im Körper folgenden Zeitraum von mindestens zwei oder drei Jahren bleiben, und biologisch abbaubare Polymere, wie Polyhydroxysäuren, einschließlich Polymilchsäure, Polyglykolsäure, und Copolymere davon, Polyanhydride, Polyorthoester und bestimmte Arten von Protein- und Polysaccharidpolymeren. Der Begriff "biologisch erodierbar" oder "biologisch abbaubar", wie hierin verwendet, bedeutet ein Polymer, das sich innerhalb eines Zeitraums, der bei der gewünschten Anwendung (gewöhnlich bei der Therapie in vivo) akzeptabel ist, weniger als etwa fünf Jahre und am meisten bevorzugt weniger als etwa ein Jahr, auflöst oder abbaut, sobald es einer physiologischen Lösung vom pH-Wert 6–8 bei einer Temperatur von zwischen 25°C und 38°C ausgesetzt wird.

[0023] Ein bevorzugtes Polymermaterial ist eines, welches biologisch abbaubar ist und welches eine ausreichende Form behält, um die Freisetzung über einen der Implantation folgenden Zeitraum von mindestens sechs bis sieben Tagen zu regulieren. Die Polyhydroxysäuren, insbesondere Poly(milchsäure-co-glykolsäure) ("PLGA"), sind ein besonders bevorzugtes Polymer, da es seit mehreren Jahrzehnten bei der Herstellung abbaubarer Nähte verwendet wird. Das Polymer baut sich durch Hydrolyse ab, die dem Aussetzen dem wässrigen Milieu des Körpers folgt. Das Polymer wird hydrolysiert, wodurch sich Milchsäure- und Glykolsäuremonomere ergeben, welche normale Nebenprodukte des Zellstoffwechsels sind. Die Geschwindigkeit des Polymerabbaus kann von einigen Wochen bis zu Zeiträumen von mehr als einem Jahr variieren, was von mehreren Faktoren, einschließlich Polymermolekulargewicht, Verhältnis von Lactid- zu Glykolidmonomeren in der Polymerkette und sterischer Regelmäßigkeit der Monomeruntereinheiten (Gemische von L- und D-Stereoisomeren stören die Polymerkristallinität, womit der Polymerabbau verbessert wird), abhängt. Besonders nützliche Ergebnisse werden durch das Mischen von PLGA mit unterschiedlichen Molekulargewichten und/oder unterschiedlichen Verhältnissen von Lactid zu Glykolid erhalten. Das Molekulargewicht und die Monomerverhältnisse können optimiert werden, um die Freisetzungskinetik über einen definierten Zeitraum maßzuschneidern. Die höheren Molekulargewichte ergeben Polymermatrizen, welche die strukturelle Integrität über längere Zeiträume bewahren; während geringere Molekulargewichte sowohl eine schnellere Freisetzung als auch kürzere Matrixhaltbarkeiten nach sich ziehen.

[0024] In einer hierin beschriebenen bevorzugten Ausführungsform enthalten die Mikropartikel Mischungen aus mindestens zwei und stärker bevorzugt mindestens drei biologisch abbaubaren Polymeren, bevorzugt hydrolytisch instabilen Polymeren, am stärksten bevorzugt Polyhydroxysäuren unterschiedlichen Molekulargewichts und/oder Monomerverhältnisses. In einer bevorzugten Ausführungsform werden drei PLGAs mit unterschiedlichem Molekulargewicht gemischt, um eine Zusammensetzung zu bilden, die eine lineare Freisetzung über einen definierten Zeitraum, der sich von mindestens einem Tag bis zu etwa sechzig Tagen erstreckt, aufweist. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform besitzen die PLGAs Molekulargewichte zwischen 1000 und 20.000, stärker bevorzugt zwischen 5.000 und 10.000, zwischen 20.000 und 35.000, stärker bevorzugt zwischen 25.000 und 30.000, und zwischen 35.000 und 70.000, um eine Freisetzung von etwa einem Tag bis zu einundzwanzig Tagen zu erzielen. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform zur Freisetzung über einen Zeitraum von etwa einer Woche werden PLGAs mit Molekulargewichten von etwa 6.000, 30.000 und 41.000 kombiniert.

[0025] PLA-Polymere werden gewöhnlich aus den cyclischen Estern von Milchsäuren hergestellt. Sowohl L(+)- als auch D(-)-Form von Milchsäure können verwendet werden, um die PLA-Polymere herzustellen, sowie das optisch inaktive DL-Milchsäuregemisch aus D(-)- und L(+)-Milchsäure. Verfahren zur Herstellung von Polylactiden sind in der Patentliteratur gut dokumentiert. Die folgenden US-Patente beschreiben detailliert geeignete Polylactide, ihre Eigenschaften und ihre Herstellung: US-Patente Nr. 1,995,970 von Dorough; Nr. 2,703,316 von Schneider; Nr. 2,758,987 von Salzberg; Nr. 2,951,828 von Zeile; Nr. 2,676,945 von Higgins und Nr. 2,683,136; Nr. 3,531,561 von Trehu.

[0026] Da es erwünscht ist, auf die Abgabe von GM-CSF an weiße Zellen abzielen, insbesondere in dem Fall, wo GM-CSF als Zusatz, allein oder in Kombination mit Antigen verwendet wird, kann das Polymer auf andere Eigenschaften als die genau kontrollierte Freisetzung bezogen ausgewählt werden. Es ist beispielsweise bekannt, dass bestimmte Polymere entzündlich sind und deshalb Leukozyten, Makrophagen und andere "weiße" Zellen anziehen. Beispiele von "Chemoattraktant"-Polymeren schließen die Polyhydroxysäuren (PL, PG, PLGAs), Polyanhydride, Polyorthoester und die Polyphosphazene ein.

[0027] In dem Fall, wo die Mikropartikel für die transmukosale oder orale Abgabe vorgesehen sind, kann es wünschenswert sein, die Polymere auszuwählen, welche bioadhäsiv sind. Beispiele von bioadhäsiven Polymeren schließen hydrophile Polymere, insbesondere jene, die Carbonsäurereste enthalten, wie Polyacrylsäure, ein. Biologisch schnell erodierbare Polymere, wie Poly(lactid-co-glykolid), Polyanhydride und Polyorthoester mit Carbonsäureresten, exponiert auf der äußeren Fläche, weil ihre glatte Oberfläche abgetragen wird, sind besonders nützlich. Repräsentative natürliche Polymere sind Proteine, wie Zein, Albumin und Kollagen, und Polysaccharide, wie Cellulose, Dextrane und Alginsäure. Andere repräsentative synthetische Polymere schließen Polyamide, Polycarbonate, Polyalkylene, Polyalkylenglykole, Polyalkylenoxide, Polyalkylenterephthalate, Polyvinylalkohole, Polyvinylether, Polyvinylester, Polyvinylhalogenide, Polyvinylpyrrolidon, Polyglykoxide, Polysiloxane, Polyurethane, Cellulosen, einschließlich Alkylcellulose, Hydroxyalkylcellulosen, Celluloseethern, Celluloseestern und Nitrocellulosen, Polymere von Acrylsäure- und Methacrylsäureestern, Poly(lactid-co-glykolid), Polyanhydride, Polyorthoester-Mischungen und Copolymere davon ein.

[0028] Andere Polymermaterialien, die nützlich sein können, schließen sowohl Hydrogele, wie die natürlich vorkommenden Polysaccharide, wie Alginat, als auch synthetische Hydrogelmaterien, wie einige Polyacrylsäuren, Polyphosphazene, Polyethylenglykol-PLGA-Copolymere und andere synthetische, biologisch abbaubare Polymere, welche bis zu 90% des Endgewichts an Wasser aufnehmen können, ein.

[0029] Das polymere Material, welches zur Implantation in den Körper mit GM-CSF gemischt wird, sollte ein Hydrogel bilden. Ein Hydrogel wird als Stoff definiert, der gebildet wird, wenn ein organisches Polymer (natürlich oder synthetisch) über kovalente, ionische Bindungen oder Wasserstoffbrückenbindungen vernetzt wird, wodurch eine dreidimensionale offene Gitterstruktur erzeugt wird, welche Wassermoleküle einschließt, wodurch ein Gel gebildet wird. Beispiele der Materialien, welche verwendet werden können, um ein Hydrogel zu bilden, schließen Polysaccharide, wie Alginat, Polyphosphazene und Polyacrylate, welche ionisch vernetzt sind, oder Blockcopolymere, wie Pluronics™ oder Tetronics™, Polyethylenoxid-Polypropylen glykol-Blockcopolymere, welche durch Temperatur bzw. pH-Wert vernetzt werden, ein. Andere Materialien schließen Proteine, wie Fibrin, Polymere, wie Polyvinylpyrrolidon, Hyaluronsäure und Kollagen, ein. US-Patente Nr. 5,286,495 und Nr. 5,410,016 von Hubbell et al. beschreiben nützliche Materialien zur Bildung biokompatibler Hydrogele.

[0030] Diese Polymere sind im Allgemeinen zumindest teilweise löslich in wässrigen Lösungen, wie Wasser, Puffersalzlösungen, oder wässrigen Alkohollösungen, diese besitzen geladene Seitenreste, oder ein einwertiges Salz davon. Beispiele von Polymeren mit sauren Seitenresten, die mit Kationen umgesetzt werden können, sind Polyphosphazene, Polyacrylsäuren, Polymethacrylsäuren, Copolymere von Acrylsäure und Methacrylsäure, Polyvinylacetat und sulfonierte Polymere, wie sulfoniertes Polystyrol. Copolymere mit sauren Seitenresten, die durch Umsetzung von Acryl- oder Methacrylsäure und Vinylethermonomeren oder -polymeren gebildet werden, können ebenfalls verwendet werden. Beispiele saurer Reste sind Carbonsäurereste, Sulfonsäurereste, halogenierte (vorzugsweise fluorierte) Alkoholreste, phenolische OH-Gruppen und saure OH-Gruppen.

[0031] Beispiele von Polymeren mit basischen Seitenresten, die mit Anionen umgesetzt werden können, sind Polyvinylamine, Polyvinylpyridin, Polyvinylimidazol und einige iminosubstituierte Polyphosphazene. Das Ammoniumsalz oder quarternäre Salz der Polymere kann außerdem aus den Stickstoffatomen des Polymergerüsts oder anhängigen Iminogruppen gebildet werden. Beispiele basischer Seitenreste sind Amino- und Iminogruppen.

[0032] Calciumalginat und gewisse andere Polymere können ionische Hydrogele bilden, welche formbar sind und zum Einkapseln von GM-CSF verwendet werden können. Alginat kann mit zweiwertigen Kationen ionisch vernetzt werden, in Wasser, bei Raumtemperatur, um eine Hydrogelmatrix zu bilden. Das Hydrogel wird durch Vernetzen des anionischen Salzes der Alginsäure, eines aus Seetang isolierten Kohlenhydratpolymers, mit zweiwertigen Kationen, deren Stärke mit ansteigenden Konzentrationen entweder der Calciumionen oder des Alginats zunimmt, hergestellt.

[0033] Das wasserlösliche Polymer mit geladenen Seitenresten wird durch Umsetzen des Polymers mit einer wässrigen Lösung, die mehrwertige Ionen der entgegengesetzten Ladung enthält, entweder mehrwertige Kationen, wenn das Polymer saure Seitenreste besitzt, oder mehrwertige Anionen, wenn das Polymer basische Seitenreste besitzt, vernetzt. Die bevorzugten Kationen zum Vernetzen der Polymere mit sauren Seitenresten, um ein Hydrogel zu bilden, sind zweiwertige und dreiwertige Kationen, wie Kupfer, Calcium, Aluminium, Magnesium, Strontium, Barium und Zinn, obwohl auch di-, tri- oder tetrafunktionelle organische Kationen, wie Alkylammoniumsalze, z. B. $R_3N^+-C_6H_5-NR_3$, verwendet werden können. Wässrige Lösungen der Salze dieser Kationen werden den Polymeren zugesetzt, um weiche, stark gequollene Hydrogele und Membranen zu bilden. Je höher die Kationenkonzentration oder je höher die Wertigkeit, umso höher ist der Vernetzungsgrad des Polymers. Es wurde demonstriert, dass Konzentrationen von bis zu 0,005 M das Polymer vernetzen. Höhere Konzentrationen sind durch die Löslichkeit des Salzes begrenzt.

[0034] Die zum Vernetzen der Polymere bevorzugten Anionen, um ein Hydrogel zu bilden, sind zweiwertige und dreiwertige Anionen, wie Dicarbonsäuren von geringem Molekulargewicht, z. B. Terephthalsäure, Sulfationen und Carbonationen. Wässrige Lösungen der Salze dieser Anionen werden den Polymeren zugegeben, um weiche, stark gequollene Hydrogele und Membranen zu bilden, wie in Bezug auf die Kationen beschrieben.

[0035] Verschiedene Polykationen können verwendet werden, um das Polymerhydrogel in einen Komplex zu überführen und dadurch zu einer semipermeablen Oberflächenmembran zu stabilisieren. Beispiele der Mate-

rialien, die verwendet werden können, schließen Polymere mit basischen reaktiven Resten, wie Amin- oder Iminresten, mit einem bevorzugten Molekulargewicht zwischen 3.000 und 100.000, wie Polyethylenimin und Polylysin, ein. Diese sind im Handel erhältlich. Ein Polykation ist Poly-L-lysin; Beispiele von synthetischen Polyaminen sind: Polyethylenimin, Polyvinylamin und Polyallylamin. Es gibt auch natürliche Polykationen, wie das Polysaccharid Chitosan. Polyanionen, die verwendet werden können, um durch Umsetzung mit basischen Oberflächenresten auf dem Polymerhydrogel eine semipermeable Membran zu bilden, schließen Polymere und Copolymere von Acrylsäure, Methacrylsäure und anderen Derivaten der Acrylsäure, Polymere mit anhängigen SO_3H -Gruppen, wie sulfoniertes Polystyrol, und Polystyrol mit Carbonsäureresten ein.

[0036] Diese Polymere sind entweder im Handel erhältlich oder können unter Verwendung von den Fachleuten bekannten Verfahren synthetisiert werden. Siehe z. B. *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts*, E. Goethals, Herausgeber (Pergamon Press, Elmsford, New York, 1980).

GM-CSF

[0037] GM-CSF, Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor, ist ein hämatopoietischer Wachstumsfaktor, welcher die Proliferation und Differenzierung hämatopoietischer Vorläuferzellen fördert. Das geklonte Gen für GM-CSF wurde in Bakterien, Hefe- und Säugetierzellen exprimiert. Das endogene Protein ist ein monomeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 22.000 Dalton. Die rekombinante Herstellung, exprimiert in Bakterienzellen, ist nicht glykosyliert. In einem Hefeexpressionssystem hergestellter GM-CSF wird als Leukine durch Immunex Corporation, Seattle, Washington vermarktet. Leukine™ wird in lyophilisierter Form verkauft. Es ist ein Glykoprotein aus 127 Aminosäuren, charakterisiert durch drei primäre Molekülarten mit Molekülmassen von 19.500, 16.800 und 15.500 Dalton.

[0038] GM-CSF ist in US-Patent Nr. 5,078,996 von Conlon et al. beschrieben. Analoga von GM-CSF sind in den US-Patenten Nr. 5,229,496, Nr. 5,393,870 und Nr. 5,391,485 von Deeley et al. beschrieben. In der bevorzugten Ausführungsform ist der GM-CSF rekombinantes Protein mit einem Molekulargewicht von zwischen ungefähr 14.000 und 20.000, hergestellt in Hefe, welche das Protein hyperglykosyliert, wodurch vermutlich der Grad der mit dem Protein beobachteten nichtspezifischen Absorption begrenzt wird. GM-CSF-Fusionsproteine können ebenfalls verwendet werden. Beispiele von GM-CSF-Fusionsproteinen schließen Fusionsproteine mit IL-3 und anderen Lymphokinen oder Wachstumsfaktoren ein.

Herstellung von Mikropartikeln

[0039] Mikrokügelchen oder feste Mikropartikel können unter Verwendung irgendeines von einigen den Fachleuten bekannten Verfahren hergestellt werden. GM-CSF scheint bei Verarbeitung außergewöhnlich beständig zu sein, insbesondere in Gegenwart organischer Lösungsmittel, was die Mikropartikelbildung erleichtert, wobei GM-CSF mit hohen Werten der Bioaktivität, typischerweise höher als 90%, im Vergleich zu dem GM-CSF vor dem Einbringen in die Mikropartikel enthalten ist. Beispiele von Verfahren zur Herstellung schließen Lösungsmittelverdampfung, Sprühtrocknung, Lösungsmittelextraktion und andere den Fachleuten bekannte Verfahren ein. Wie vorstehend erörtert, werden Hydrogele typischerweise durch ionische Vernetzung, durch Zusatz von Ionen oder Polyionen oder durch Fotovernetzung oder andere Formen der chemischen Vernetzung gebildet.

Herstellung von Mikrokügelchen

[0040] Biologisch erodierbare Mikrokügelchen können unter Verwendung irgendeines der für die Herstellung von Mikrokügelchen zur Arzneistoffabgabe entwickelten Verfahren hergestellt werden, beispielsweise wie durch Mathiowitz und Langer, *J. Controlled Release* 1987, 5, 13–22; Mathiowitz et al., *Reactive Polymers* 1987, 6, 275–283 und Mathiowitz et al., *J. Appl. Polymer Sci.* 1988, 35, 755–774 beschrieben. Die Auswahl des Verfahrens hängt von der Polymerauswahl, der Größe, äußeren Morphologie und der Kristallinität, die erwünscht ist, ab, wie z. B. beschrieben durch Mathiowitz et al., *Scanning Microscopy* 1990, 4, 329–340; Mathiowitz et al., *J. Appl. Polymer Sci.* 1992, 45, 125–134 und Benita et al., *J. Pharm. Sci.* 1984, 73, 1721–1724. Die Verfahren schließen Lösungsmittelverdampfung, Phasentrennung, Sprühtrocknung und Schmelzeinkapselung ein. Die US-Patente Nr. 3,773,919; Nr. 3,737,337 und Nr. 3,523,906 sind für Verfahren zur Herstellung von Mikrokügelchen repräsentativ.

[0041] Ein bevorzugtes Verfahren ist in US-Patent Nr. 5,000,886 von Lawter et al. beschrieben. Der GM-CSF wird in einer wässrigen Lösung dispergiert, welche anschließend mit einer organischen Lösung des Polymers gemischt wird. Die Dispersion wird einem für das Polymer und den GM-CSF inaktiven Lösungsmittel zugege-

ben, dann werden die Mikropartikel durch Extraktion des Polymerlösungsmittels in ein flüchtiges Siliconöl gehärtet.

[0042] Bei der Lösungsmittelverdampfung, beispielsweise in Mathiowitz et al. (1990), Benita und US-Patent Nr. 4,272,398 von Jaffe beschrieben, wird das Polymer in einem flüchtigen organischen Lösungsmittel gelöst. Der GM-CSF, entweder in löslicher Form oder in feinen Partikeln dispergiert, wird der Polymerlösung hinzugefügt, und das Gemisch wird in einer wässrigen Phase suspendiert, die ein oberflächenaktives Mittel, wie Polyvinylalkohol, enthält. Die so erhaltene Emulsion wird gerührt, bis das meiste organische Lösungsmittel verdampft ist, wodurch feste Mikrokügelchen zurückbleiben.

[0043] Das Polymer kann im Allgemeinen in Methylenchlorid gelöst werden. Mehrere unterschiedliche Polymerkonzentrationen können verwendet werden, z. B. zwischen 0,01 und 0,50 g/ml. Nach dem Zusatz von GM-CSF zur Lösung wird die Lösung in 200 ml kräftig gerührtem, destillierten Wasser, das 1% (w/v) Polyvinylalkohol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) enthält, suspendiert. Nach vier Stunden Rühren wird das organische Lösungsmittel aus dem Polymer verdampft, und die so erhaltenen Mikrokügelchen werden mit Wasser gewaschen und über Nacht in einem Gefriertrockner getrocknet.

[0044] Mikrokügelchen mit unterschiedlichen Größen (zwischen 1 und 1000 µm) und Morphologien können durch dieses Verfahren, welches für relativ stabile Polymere, wie Polyester und Polystyrol, nützlich ist, erhalten werden. Labile Polymere, wie Polyanhydride, können sich jedoch infolge des Ausgesetztseins gegen Wasser abbauen. Für diese Polymere können Schmelzeinkapselung und Lösungsmittelentzug bevorzugt werden.

[0045] Der Lösungsmittelentzug ist besonders nützlich bei Polyanhydriden. In diesem Verfahren wird der Arzneistoff in einer Lösung eines ausgewählten Polymers in einem flüchtigen organischen Lösungsmittel, wie Methylenchlorid, dispergiert oder gelöst. Das Gemisch wird anschließend in Öl, wie Siliconöl, durch Rühren suspendiert, um eine Emulsion zu bilden. Innerhalb von 24 Stunden diffundiert das Lösungsmittel in die Ölphase, und die Emulsionströpfchen erhärten zu festen Polymermikrokügelchen. Im Gegensatz zur Lösungsmittelverdampfung kann dieses Verfahren verwendet werden, um Mikrokügelchen aus Polymeren mit hohen Schmelzpunkten und einem großen Molekulargewichtsbereich herzustellen. Mikrokügelchen mit einem Durchmesser zwischen 1 und 300 µm können mit diesem Verfahren erhalten werden. Die äußere Morphologie der Kügelchen ist stark von dem verwendeten Polymertyp abhängig.

[0046] Bei der Sprühtrocknung wird das Polymer in Methylenchlorid (0,04 g/ml) gelöst. Eine bekannte Menge eines Arzneiwirkstoffs wird in der Polymerlösung suspendiert (wenn unlöslich) oder mitgelöst (wenn löslich). Die Lösung oder Dispersion wird dann sprühgetrocknet. Mikrokügelchen, deren Durchmesser zwischen 1 und 10 µm liegt, können mit einer Morphologie erhalten werden, welche von der Auswahl des Polymers abhängt.

[0047] Hydrogelmikropartikel aus gelartigen Polymeren, wie Alginat oder Polyphosphazenen, oder anderen Dicarbonsäurepolymeren können durch Lösen des Polymers in einer wässrigen Lösung, Suspendieren des in das Gemisch einzubringenden Materials und Extrudieren der Polymermischung durch eine Vorrichtung zum Erzeugen von Mikrotröpfchen, ausgerüstet mit einer Stickstoffgasdüse, hergestellt werden. Die erhaltenen Mikropartikel fallen in ein langsam gerührtes, ionisches Härtebad, wie z. B. von Salib et al., Pharmazeutische Industrie 1978, 40-11A, 1230 beschrieben. Der Vorteil dieses Systems ist das Vermögen, die Oberfläche der Mikropartikel durch Überziehen dieser mit polykationischen Polymeren, wie Polylysin, nach der Herstellung weiter zu modifizieren, wie beispielsweise von Lim et al., J. Pharm. Sci. 1981, 70, 351-354 beschrieben. Wie von Lim et al. beschrieben, kann beim Alginat ein Hydrogel durch ionisches Vernetzen des Alginats mit Calciumionen, dann Vernetzen der Außenfläche des Mikropartikels mit einem Polykation, wie Polylysin, nach der Herstellung gebildet werden. Die Teilchengröße der Mikrokügelchen wird unter Verwendung von unterschiedlichen Extrudergrößen, Polymerdurchsätzen und Gasströmungsgeschwindigkeiten reguliert.

[0048] Chitosanmikropartikel können durch Lösen des Polymers in saurer Lösung und Vernetzen mit Triphosphat hergestellt werden. Mikrokügelchen von Carboxymethylcellulose (CMC) werden beispielsweise durch Lösen des Polymers in einer sauren Lösung und Abscheiden der Mikropartikel mit Bleiionen hergestellt. Alginat/Polyethylenimid (PEI) kann hergestellt werden, um die Menge an Carboxylgruppen auf den Alginatmikropartikeln zu verringern.

Zusatz von GM-CSF

[0049] Der Bereich des Zusatzes des abzugebenden GM-CSF liegt typischerweise zwischen etwa 0,001 Gew.-% und 10 Gew.-%. GM-CSF kann in einem Anteil von 0,001 Gew.-% bis zu 10 Gew.-% in eine Polymer-

matrix eingebracht werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird GM-CSF bis zu 2 Gew.-% in PLGA-Mischungen eingebracht.

[0050] Der Zusatz hängt sowohl von der zu behandelnden Krankheit als auch von dem Zeitraum, über welchen der GM-CSF freizusetzen ist, ab. Geringere Dosen werden für die Verwendung als Impfstoffadjuvans, in dem Bereich von 0,001 bis 0,1%, benötigt. Mikropartikel zur Behandlung einer schweren Infektion würden typischerweise als Mikropartikel mit 2 Gew.-% Arzneistoffgehalt verabreicht werden.

Die Freisetzung verändernde Zusatzstoffe bei Mikropartikeln

[0051] Die Polymerhydrolyse wird bei sauren oder basischen pH-Werten beschleunigt, und daher kann der Einschluss saurer oder basischer Exzipienten verwendet werden, um die Polymererosionsgeschwindigkeit anzupassen. Die Exzipienten können als Teilchen zugesetzt werden, können mit dem eingebrachten GM-CSF vermischt werden oder können innerhalb des Polymers gelöst werden.

[0052] Abbaubeschleuniger sind bezogen auf Gewicht, relativ zu dem Polymergewicht. Sie können der Proteinphase zugegeben werden, als separate Phase (d. h. als Teilchen) hinzugefügt werden oder können in der Polymerphase in Abhängigkeit von der Verbindung mitgelöst werden. In allen Fällen sollte die Menge zwischen 0,1 und 30% (w/w, Polymer) betragen. Typen von Abbaubeschleunigern schließen anorganische Säuren, wie Ammoniumsulfat und Ammoniumchlorid, organische Säuren, wie Citronensäure, Benzoesäuren, Heparin und Ascorbinsäure, anorganische Basen, wie Natriumcarbonat, Kaliumcarbonat, Calciumcarbonat, Zinkcarbonat und Zinkhydroxid, und organische Basen, wie Protaminsulfat, Spermin, Cholin, Ethanolamin, Diethanolamin und Triethanolamin, und oberflächenaktive Mittel, wie TweenTM und PluronicTM, ein.

[0053] Porenbildner werden verwendet, um den Matrizen eine Mikrostruktur zu verleihen (d. h. wasserlösliche Verbindungen, wie anorganische Salze und Zucker). Sie werden als Teilchen zugesetzt. Der Bereich sollte zwischen 1 und 30% (w/w, Polymer) liegen.

[0054] Exzipienten können dem GM-CSF außerdem zugesetzt werden, um seine Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Freisetzungsdauer zu bewahren. Stabilisatoren schließen Kohlenhydrate, Aminosäuren, Fettsäuren und oberflächenaktive Mittel ein und sind den Fachleuten bekannt. Außerdem können Exzipienten, welche die Löslichkeit von GM-CSF ändern, wie Salze, Komplexbildner (Albumin, Protamin), verwendet werden, um die Freisetzungsgeschwindigkeit des Proteins aus den Mikropartikeln zu regulieren.

[0055] Stabilisatoren für den GM-CSF sind auf das Gewichtsverhältnis von Stabilisator zu dem GM-CSF auf Gewichtsbasis bezogen. Beispiele schließen Kohlenhydrat, wie Sucrose, Lactose, Mannit, Dextran und Heparin, Proteine, wie Albumin und Protamin, Aminosäuren, wie Arginin, Glycin und Threonin, oberflächenaktive Mittel wie TweenTM und PluronicTM, Salze, wie Calciumchlorid und Natriumphosphat, und Lipide, wie Fettsäuren, Phospholipide und Gallensalze, ein.

[0056] Die Verhältnisse betragen im Allgemeinen 1 : 10 bis 4 : 1, Kohlenhydrat zu Protein, Aminosäuren zu Protein, Protein stabilisator zu Protein, und Salze zu Protein; 1 : 1000 bis 1 : 20, oberflächenaktives Mittel zu Protein; und 1 : 20 bis 4 : 1, Lipide zu Protein.

Zu behandelnde klinische Indikationen

Systemische Abgabe zur Proliferation von Zellen

[0057] GM-CSF ist zur Behandlung von Patienten, die eine erhöhte Proliferation weißer Blutkörperchen erfordert, zugelassen. Daten zeigen, dass GM-CSF außerdem als Impfstoffadjuvans nützlich ist, Morrissey et al., J. Immunology 1987, 139, 1113–1119. GM-CSF-Mikropartikel können auch verwendet werden, um infektionsanfällige Patienten, wie jene, die sich einer risikoreichen Darmoperation unterziehen, Verletzungsoffer und Personen mit HIV, zu behandeln. Die Protokolle und die klinische Wirksamkeit von GM-CSF sind den Fachleuten gut bekannt. Wie hierin beschrieben, werden die Protokolle abgeändert, um die Veränderungen in den Abgabegeschwindigkeiten und Dosierungen, die sich aus den Freisetzungsprofilen aus Mikropartikeln oder, wenn geeignet, Hydrogelen ergeben, widerzuspiegeln.

[0058] Die Daten in vitro sowohl in Bezug auf die Freisetzungsprofile für GM-CSF als auch auf die Wirksamkeit scheinen für die Daten in vivo prädiktiv zu sein, obwohl sie diesen nicht identisch sind. Wie mit den folgenden Beispielen demonstriert, zeigen die Daten vom Rhesusaffen maximale Anstiege in den Leukozytenzahlen

innerhalb von vier der Verabreichung von GM-CSF folgenden Tagen, während die Ergebnisse in vitro zeigten, dass sechs bis sieben Tage für die vollständige Freisetzung des eingebrachten GM-CSF benötigt werden. Der Vorteil der Verwendung von GM-CSF ist, dass das Protein selbst äußerst stabil ist, mit mindestens 60%, in vielen Fällen 90 bis 100%, der Bioaktivität, die nach dem Einbringen in die Mikropartikel unter Verwendung irgendeines von mehreren Verfahren erhalten bleibt.

Lokale Verabreichung als Adjuvans

[0059] Eine verbesserte Reaktion auf Impfstoff kann durch die Verwendung von GM-CSF allein erzielt werden, wird aber stärker bevorzugt durch eine Auswahl des Polymers in Kombination mit der kontrollierten Freisetzung des GM-CSF erreicht. Es ist bekannt, dass bestimmte Polymere als Chemoattraktanten für weiße Zellen dienen. PLGA ist wie Polyanhydride und Polyorthoester ein wenig entzündlich. Durch die Auswahl des Chemoattraktant-Polymers als die Matrix für GM-CSF in einer Form, die eine kontrollierte Freisetzung über einen Zeitraum von ungefähr einer Woche bringt, kann eine maximale Impfstoffverbesserung erzielt werden. Bei dieser Ausführungsform kann die Freisetzung aus polymeren Matrizen in verschiedenen Formen, nicht nur Mikropartikeln oder Hydrogelen, erfolgen. Der GM-CSF und das Polymer können sogar synergistisch wirken, um sowohl die unterstützende Wirkung des GM-CSF als auch das Abzielen des GM-CSF auf die weißen Zellen zu verbessern.

[0060] Der GM-CSF kann außerdem mit einem Tumorantigen oder Tumorzellen, die Antigene oder deren Oberflächen exprimieren, zur Verwendung als Tumorpimpstoff injiziert werden.

Topische oder transmukosale Verabreichung

[0061] Die Hydrogelformulierungen sind besonders nützlich für topische Anwendungen. Beispielsweise wurde durch Braunstein et al., J. Invest. Dermatol. 1994, 103, 601–604 gezeigt, dass GM-CSF die Keratinozytenproliferation in menschlicher Haut stimuliert, und daher als topisches Wundheilungsmittel verwendet werden könnte. Die mukosale Abgabe von GM-CSF-Mikropartikeln könnte auch bei der Stimulation mukosaler Immunität wirksam sein, da gezeigt wurde, dass das Protein eine Rolle bei der Antikörperproduktion spielt (Grabstein et al., J. Mol. Cell. Immunol. 1986, 2, 199–207).

Verabreichung der GM-CSF-Mikropartikel

[0062] In der bevorzugten Ausführungsform zur Stimulation der Proliferation hämatopoietischer Vorläuferzellen wird GM-CSF in Mikropartikeln eingeschlossen verabreicht, welche sich über einen Zeitraum von 1 bis 2 Monaten abbauen. Die Mikropartikel reichen in der Größe bevorzugt von 10 bis 60 µm, mit einem Durchschnitt von 35 µm im Durchmesser, und werden gleichzeitig mit Hilfe eines Suspensionsmediums injiziert. In einer Ausführungsform besteht das Suspensionsmedium aus 3% Methylcellulose, 4% Mannit und 0,1% TweenTM 80, unter Verwendung einer 22-Gauge-Nadel. In einer anderen Ausführungsform werden die 3% Methylcellulose durch 1% Carboxymethylcellulose ersetzt. 1 ml des viskosen Suspensionsmediums wird benötigt, um 100 mg der Mikropartikel, die genügend GM-CSF enthalten um 125 µg/m²/Tag über einen Zeitraum von 7 Tagen abzugeben, zu suspendieren. Größere Dosen können durch Injizieren von mehr Mikropartikeln erzielt werden. Beispielsweise würde eine Dosis von 250 µg/m²/Tag zwei 1-ml-Injektionen, wovon jede 100 mg der Mikropartikel enthält, erfordern.

[0063] Die vorliegende Erfindung wird durch Bezugnahme auf die nachfolgenden nicht begrenzenden Beispiele weiter verständlich sein.

Beispiel 1: Herstellung von Mikrokügelchen unter Verwendung eines Phasentrennungsverfahrens

A. Chargen-Nr. 14223-133, Probe "A"

[0064] Das einkapselnde Polymer war ein Poly(glykolid-co-D,L-lactid) mit einer inhärenten Viskosität von 0,43 dl/g (wie in 0,5% (w/v) Hexafluorisopropanollösung bei 30°C bestimmt) und einem Verhältnis von Glykolid zu Lactid von 45 : 55. Es wurde mit Glykolsäure als dem Initiator und Zinn(II)-chlorid-Dihydrat als dem Katalysator hergestellt. Es wurde mit C13-NMR und Löslichkeitsmessungen bewiesen, dass die Verteilung von Lactoyl- und Glykoylgruppen in dem Copolymer zufällig war. Der Restlactidgehalt wurde durch Vakuumstrippung verringert. Die einkapselnde Polymerlösung wurde durch Zusetzen von 100 g des Polymers zu 900 g Methylenchlorid und Rühren des Gemisches, bis das Polymer gelöst war, hergestellt.

[0065] 0,978 ml einer GM-CSF-Lösung (mit 63,3 mg/ml in 100 mM Tris-Puffer) wurden einem Anteil der einkapselnden Polymerlösung von 20 g zugegeben. Das Gemisch wurde mit einem Homogenisator unter Verwendung eines 10-mm-Kopfes 2 Minuten bei 10.000 rpm gerührt, um eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) zu erzeugen.

[0066] 18,0 g Dow Corning® 360 Fluid (Polydimethylsiloxan) wurden der W/O-Emulsion zugesetzt, und das Gemisch wurde 2 Minuten bei 10.000 rpm homogenisiert. Das Gemisch wurde dann zu 2,4 kg Dow Corning® 244 Fluid (Octamethylcyclotetrasiloxan) unter Rühren bei 750 rpm gegeben, um die Mikrokügelchen zu härten. Das Rühren wurde über 90 Minuten fortgesetzt. Die Mikrokügelchen wurden mit einem Seiher, ausgestattet mit einem 1-µm-Sieb aus rostfreiem Stahl, gesammelt, dann unter Vakuum getrocknet.

[0067] Die Partikelgrößenverteilung wurde mit einem Malvern Particle Sizer 2600 analysiert. Ungefähr 50 mg der Mikrokügelchen wurden in etwa 10 ml Dow Corning® 244 Fluid suspendiert und 2 Minuten beschallt, um die Mikrokügelchen vollständig zu dispergieren. Einige Tropfen dieser Suspension wurden anschließend in die optische Zelle, welche Dow Corning® 244 Fluid enthielt, gegeben. Die Partikelgrößenverteilung wurde anschließend gemessen. Die Probe hatte einen volumengemittelten Durchmesser von 66,7 µm, 10% der Mikrokügelchen waren unter 24,1 µm, 90% der Mikrokügelchen waren unter 118,6 µm.

B. Chargen-Nr. 14223-134, Probe "B"

[0068] Das einkapselnde Polymer und seine Lösung in Methylenchlorid waren dieselben wie in "A" beschrieben.

[0069] 0,320 ml einer GM-CSF-Lösung (mit 63,3 mg/ml in 100 mM Tris-Puffer) wurden einem Anteil der einkapselnden Polymerlösung von 20 g zugegeben. Das Gemisch wurde mit einem Homogenisator unter Verwendung eines 10-mm-Kopfes 2 Minuten bei 10.000 rpm gerührt, um eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) zu erzeugen.

[0070] 18,0 g Dow Corning® 360 Fluid (Polydimethylsiloxan) wurden der W/O-Emulsion zugesetzt, und das Gemisch wurde 2 Minuten bei 10.000 rpm homogenisiert. Das Gemisch wurde dann zu 2,4 kg Dow Corning® 244 Fluid (Octamethylcyclotetrasiloxan) unter Rühren bei 750 rpm über 90 Minuten gegeben, um die Mikrokügelchen zu härten. Die Mikrokügelchen wurden gesammelt, getrocknet, und die Partikelgrößenverteilung wurde wie bei "A" beschrieben analysiert. Die Probe hatte einen volumengemittelten Durchmesser von 43,8 µm, 10% der Mikrokügelchen waren unter 7,0 µm, 90% der Mikrokügelchen waren unter 77,9 µm.

[0071] Wie [Fig. 1A](#) zeigt, beweisen die Proben "A" und "B", dass PLGA-Mikrokügelchen hergestellt werden können, um GM-CSF auf eine dreiphasige Weise freizusetzen. In der ersten Phase wird das Protein über ungefähr 5 Tage kontinuierlich freigesetzt. Dieser Phase folgt ein Zeitraum minimaler Freisetzung von GM-CSF bis Tag 35. Zu dieser Zeit wird ein weiterer Impuls an GM-CSF aus dem System freigesetzt. Die Dauer jeder Phase kann mit den zur Herstellung der Mikrokügelchen verwendeten Polymertypen reguliert werden.

C. Chargen-Nr. 9663-96A, Probe "B4"

[0072] Das einkapselnde Polymer war ein Gemisch von 60 : 20 : 20 aus 1) einem Poly(glykolid-co-D,L-lactid) mit einem Verhältnis von Glykolid zu Lactid von 47 : 53 und einer inhärenten Viskosität von 0,72 dl/g, wie in einer 0,5% (w/v) Hexafluorisopropanollösung bei 30°C bestimmt, (Polymer I), 2) einem Poly(glykolid-co-D,L-lactid) mit einem Verhältnis von Glykolid zu Lactid von 50 : 50 und einer inhärenten Viskosität von 0,33 dl/g, wie in einer 0,1% (w/v) Chloroformlösung bei 25°C ermittelt, (Polymer II), und 3) einem Poly(D,L-lactid) mit einem mittleren Molekulargewicht von 1938, wie durch Endgruppentitration bestimmt, (Polymer III). Polymer II und Polymer III wurden vor der Verwendung umgefällt. Die einkapselnde Polymerlösung wurde durch Zusetzen von 1,20 g Polymer I, 0,40 g Polymer II und 0,40 g Polymer III zu 18,00 g Methylenchlorid und Rühren des Gemischs, bis die Polymere gelöst waren, hergestellt.

[0073] 0,481 ml einer GM-CSF-Lösung (mit 84,8 mg/ml in 100 mM Tris-Puffer) wurden der einkapselnden Polymerlösung zugegeben, mit einem 20-mm-Kopf 60 Sekunden bei 10.000 rpm homogenisiert, um eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) zu erzeugen.

[0074] Das die W/O-Emulsion enthaltende Becherglas wurde unter einen mit einem dreiflügligen Teflonrührer ausgestatteten Mischer gestellt und bei 1000 rpm gerührt. 20 ml Dow Corning® 360 Fluid wurden der W/O-Emulsion, während sie bei 1000 rpm gerührt wurde, über eine Zeitspanne von 1 Minute unter Verwendung einer

Spritzenpumpe zugesetzt.

[0075] Das Gemisch wurde anschließend unter Rühren bei 400 rpm über 90 Minuten zu 2,0 kg Dow Corning® 244 Fluid hinzugegeben, um die Mikrokügelchen zu härten.

[0076] Die Mikrokügelchen wurden gesammelt, getrocknet, und die Partikelgrößenverteilung wurde wie vorstehend beschrieben analysiert. Die Probe hatte einen volumengemittelten Durchmesser von 31,8 µm, 10% waren unter 14,1 µm, und 90% der Mikrokügelchen waren unter 52,2 µm.

D. Chargen-Nr. 9663-135C, Probe "O4"

[0077] Das einkapselnde Polymer war ein Gemisch von 60 : 20 : 20 aus 1) einem Poly(glykolid-co-D,L-lactid) mit einem Verhältnis von Glykolid zu Lactid von 47 : 53 und einer inhärenten Viskosität von 0,72 dl/g, wie in einer 0,5% (w/v) Hexafluorisopropanollösung bei 30°C bestimmt, (Polymer I), 2) einem Poly(glykolid-co-D,L-lactid) mit einem Verhältnis von Glykolid zu Lactid von 50 : 50 und einer inhärenten Viskosität von 0,33 dl/g, wie in einer 0,1% (w/v) Chloroformlösung bei 25°C ermittelt, (Polymer II), und 3) einem Poly(D,L-lactid) mit einem mittleren Molekulargewicht von 1938, wie durch Endgruppentitration bestimmt, (Polymer III). Polymer II und Polymer III wurden vor der Verwendung umgefällt. Die einkapselnde Polymerlösung wurde durch Zusetzen von 1,20 g Polymer I, 0,40 g Polymer II und 0,40 g Polymer III zu 18,00 g Methylenchlorid und Rühren des Gemischs, bis die Polymere gelöst waren, hergestellt.

[0078] 0,462 ml einer GM-CSF-Lösung (mit 88,4 mg/ml in 100 mM Tris-Puffer) wurden der einkapselnden Polymerlösung zugegeben, mit einem 20-mm-Kopf 60 Sekunden bei 10.000 rpm homogenisiert, um eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) zu erzeugen. Die W/O-Emulsion wurde bei 1000 rpm gerührt. 20 ml Dow Corning® 360 Fluid wurden der W/O-Emulsion, während sie gerührt wurde, über eine Zeitspanne von 1 Minute unter Verwendung einer Spritzenpumpe zugesetzt. Das Gemisch wurde anschließend unter Rühren bei 400 rpm über 90 Minuten zu 2,0 kg Dow Corning® 244 Fluid hinzugegeben, um die Mikrokügelchen zu härten.

[0079] Die Mikrokügelchen wurden gesammelt, getrocknet, und die Partikelgrößenverteilung wurde wie vorstehend beschrieben analysiert. Die Probe hatte einen volumengemittelten Durchmesser von 39,5 µm, 10% der Mikrokügelchen waren unter 14,9 µm, und 90% der Mikrokügelchen waren unter 65,1 µm.

E. Chargen-Nr. 9490-168, Probe "V4", aseptisches Verfahren

[0080] Die Mikrokügelchen wurden wie folgt aseptisch hergestellt. Glasgeräte, Rührerwellen und -köpfe und Behälter aus rostfreiem Stahl wurden vor der Verwendung autoklaviert.

[0081] Das einkapselnde Polymer war ein Gemisch von 60 : 20 : 20 aus 1) Poly(glykolid-co-D,L-lactid) mit einem Verhältnis von Glykolid zu Lactid von 47 : 53 und einer inhärenten Viskosität von 0,72 dl/g, wie in einer 0,5% (w/v) Hexafluorisopropanollösung bei 30°C bestimmt, (Polymer I), 2) einem Poly(glykolid-co-D,L-lactid) mit einem Verhältnis von Glykolid zu Lactid von 50 : 50 und einer inhärenten Viskosität von 0,33 dl/g, wie in einer 0,1% (w/v) Chloroformlösung bei 25°C ermittelt, (Polymer II), und 3) einem Poly(D,L-lactid) mit einem mittleren Molekulargewicht von 1938, wie durch Endgruppentitration bestimmt, (Polymer III). Polymer II und Polymer III wurden vor der Verwendung umgefällt. Die einkapselnde Polymerlösung wurde durch Zusetzen von 3,00 g Polymer I, 1,00 g Polymer II und 1,00 g Polymer III zu 45,00 g Methylenchlorid und Rühren des Gemischs, bis die Polymere gelöst waren, hergestellt. 20,00 g dieser Lösung wurden für die Mikro-einkapselung durch einen Glasfaservorfilter und einen 0,45-µm-Teflonfilter filtriert.

[0082] Ungefähr 100 g Dow Corning® 360 Fluid wurden bei 160°C 1 Stunde in einem mit Aluminiumfolie abgedeckten Becherglas erhitzt, dann auf Raumtemperatur abgekühlt.

[0083] 2,0 kg Dow Corning® 244 Fluid wurden durch einen 0,22-µm-Filter "Millipak™ 20" in den Härtingsbehälter filtriert.

[0084] 0,485 ml einer GM-CSF-Lösung (mit 87,3 mg/ml in 100 mM Tris-Puffer, filtriert durch einen 0,2-µm-Filter) wurden den 20 g der filtrierten, einkapselnden Polymerlösung zugegeben, mit einem Homogenisator unter Verwendung eines 20-mm-Kopfes 60 Sekunden bei 10.000 rpm gerührt, um eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) zu erzeugen.

[0085] Das die W/O-Emulsion enthaltende Becherglas wurde unter einen mit einem dreiflügligen Teflonrührer

ausgestatten Mischer gestellt und bei 1000 rpm gerührt. 20 ml des wärmebehandelten Dow Corning® 360 Fluid wurden der W/O-Emulsion, während sie bei 1000 rpm gerührt wurde, über eine Zeitspanne von 1 Minute unter Verwendung einer Spritzenpumpe zugesetzt.

[0086] Das Gemisch wurde anschließend unter Rühren bei 400 rpm zu den 2,0 kg des gefiltertes Dow Corning® 244 Fluid hinzugegeben, um die Mikrokügelchen zu härten. Das Rühren wurde über 90 Minuten fortgesetzt.

[0087] Die Mikrokügelchen wurden gesammelt, getrocknet, und die Partikelgrößenverteilung wurde mit einem Malvern Particle Sizer 2600 ermittelt. Die Partikelgrößenverteilung wurde dann gemessen. Die Probe hatte einen volumengemittelten Durchmesser von 32,5 µm, 10% der Mikrokügelchen waren unter 14,7 µm, und 90% der Mikrokügelchen waren unter 54,8 µm.

Beispiel 2: Analyse von in Mikrokügelchen eingebrachtem GM-CSF unter Verwendung der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0088] GM-CSF wurde zuerst unter Verwendung von Essigsäure, Methylenchlorid und phosphatgepufferter Kochsalzlösung aus Mikrokügelchen extrahiert. Eine Kontrollprobe, bestehend aus leeren Mikrokügelchen mit frisch zugesetztem Stamm-GM-CSF, wurde gleichzeitig extrahiert. Die Extrakte wurden anschließend mit RP-HPLC hinsichtlich der Glykoformenverteilung ausgewertet.

[0089] Glykosylierte Varianten von rekombinantem humanen (rhu) GM-CSF werden unter Verwendung der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gemessen. Die Säule ist eine C18-Säule (4,6 mm × 25 cm), 10 µm, 300 Å, von Vydac. Die Glykoformen von GM-CSF können bei diesem Verfahren unter Verwendung eines Gradienten der mobilen Phase von 25 bis 65% 0,1% Trifluoressigsäure (TFA)/Acetonitril in 0,1% TFA/Wasser mit konstantem 200 mM NaCl getrennt werden.

[0090] Die Ergebnisse zeigen, dass sich die GM-CSF Glykoformenverteilung der Kontrollprobe infolge des Extraktionsprotokolls nicht verändert und das RP-HPLC-Profil von in Mikrokügelchen eingebrachtem GM-CSF unverändert bleibt.

Beispiel 3: Freisetzungskinetik von GM-CSF aus Mikrokügelchenzubereitungen

[0091] Die Freisetzungskinetik von GM-CSF-Mikrokügelchen wurde unter Verwendung der nachstehenden Verfahren analysiert. Mikrokügelchenchargen wurden in ihren Originalbehältern bei 2–8°C gelagert. Die Freisetzungsuntersuchungen in vitro wurden innerhalb weniger Tage der Herstellung begonnen. Die Untersuchungen wurden in doppelter Ausführung für das Screening und in dreifacher Ausführung für eine erhöhte Sicherheit bei Genauigkeit und Präzision aufgebaut. Der Freisetzungspuffer war phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, 12 mM Natriumphosphat, 3,7 mM Kaliumphosphat, 150 mM Natriumchlorid, pH-Wert 7,0, filtriert durch 0,22 µm), die 0,02% Natriumazid als Konservierungsstoff enthielt, obwohl empfohlen wird, das Azid wegzulassen und die Freisetzungsuntersuchung so aseptisch wie möglich zu handhaben, wenn die Bioaktivitätsanalyse des freigesetzten GM-CSF geplant wird. Die Sammelzeitabstände in einer Untersuchung können Zeiten bei 2, 6, 24, 48, 72 Stunden, 5, 7, 10 und 14 Tagen einschließen.

[0092] Zum Aufbau eines Freisetzungstests in vitro wurden ungefähr 50 bis 75 mg Mikrokügelchen in dem Teflonzwischenstück von 9 mm Innendurchmesser × 13 mm Außendurchmesser × 5 mm, welches sich innerhalb des Teflonmantels der Vorrichtung befindet, angeordnet. Das Zwischenstück wurde an beiden Enden mit Sieben aus rostfreiem Stahl von 13 mm Durchmesser, 10 µm Maschenweite, welche den Umlauf des Freisetzungspuffer durch die Mikrokügelchen zulassen, verankert.

[0093] Die befüllte Vorrichtung wurde in ein weites 30-ml-Polypropyleneströhrchen mit 6 ml Freisetzungspuffer gebracht. Die offenen Röhrchen, die die befüllte Vorrichtung und den Freisetzungspuffer enthielten, wurden mit lockeren Kappen oder Kimwipes®, gesichert mit Gummibändern, abgedeckt und in einen Vakuumexsikkator gegeben. Das Aussetzen dem Vakuum für ungefähr 2 Stunden unterstützt das Entfernen jeglicher eingeschlossener Luftblasen und fördert das anfängliche Benetzen der Mikrokügelchen. Die Röhrchen wurden anschließend verschlossen und auf einem Orbitalschüttler bei 100 rpm bei 37°C inkubiert.

[0094] Bei geeigneten Zeitabständen wurde der Freisetzungspuffer durch Dekantieren in vorgewogene, beschriftete 15-ml-Polypropyleneströhrchen zurückgewonnen. Das erhaltene Volumen wurde auf Gewichtsbasis bestimmt (ml = g, ca.) Die Vorrichtung, mit Zusatz eines frischen Freisetzungspuffers (6 ml), wurde dann in den

Orbitalschüttler bei 37°C zurückgeführt.

[0095] Die Freisetzungspuren der Mikrokügelchen wurden mit dem Bio-Rad-Gesamtproteinassay ausgewertet, um die Freisetzung von GM-CSF zu quantifizieren. Es kann ein Gesamtproteinassay verwendet werden, da kein anderes Protein vorhanden ist.

[0096] Die Ergebnisse der Analyse der Freisetzungskinetik sind in den [Fig. 1B](#) und [Fig. 3A](#) dargestellt. Die in Beispiel 1 hergestellten Proben "B4", "O4" und "V4" zeigen, dass PLGA-Mikrokügelchen hergestellt werden können, um GM-CSF über einen Zeitraum von ungefähr 6 Tagen kontinuierlich freizusetzen. Die Freisetzung ist über diese Zeit linear und nähert sich der nullten Ordnung an. Der GM-CSF wird außerdem mit im Wesentlichen vollständiger Erhaltung der Bioaktivität freigesetzt, wie [Fig. 3B](#) zeigt (angegeben ist die Standardabweichung des Bioassays, der freigesetzte GM-CSF kann als vollständig aktiv betrachtet werden). Diese Beispiele zeigen außerdem, dass das Verfahren zur Herstellung von Mikrokügelchen äußerst reproduzierbar ist, wie durch die sehr ähnlichen GM-CSF-Freisetzungsprofile, erzeugt aus den drei Zubereitungen, bewiesen.

Beispiel 4: Freisetzungsprofil in vivo von hu-GM-CSF in einem murinen Modell A. Chargen-Nr. 9402-94, Probe "O"

[0097] Die Mikrokügelchen wurden wie folgt aseptisch hergestellt.

[0098] Glasgeräte, Rührerwellen und -köpfe und Behälter aus rostfreiem Stahl wurden vor der Verwendung autoklaviert. 4,0 kg Dow Corning® 244 Fluid (Octamethylcyclotetrasiloxan) wurden durch einen 0,22-µm-Filter "Millipak™ 40" in den Härtingsbehälter filtriert. Ungefähr 100 g Dow Corning® 360 Fluid (Polydimethylsiloxan, 350 mm²/s) wurden bei 160°C 80 Minuten in einem mit Aluminiumfolie abgedeckten Becherglas erhitzt, dann auf Raumtemperatur abgekühlt.

[0099] Ein Anteil von 40 g einer 10%igen Poly(glucolid-co-D,L-lactid)Lösung in Methylenchlorid wurde für die Mikroinkapselung durch einen 0,22-µm-Polyvinylidenfluoridfilter filtriert. Das Polymer wies eine inhärente Viskosität von 0,43 dl/g, wie in 0,5% (w/v) Hexafluorisopropanollösung bei 30°C bestimmt, und ein Verhältnis von Glykolid zu Lactid von 45 : 55 auf. Es wurde mit Glykolsäure als dem Initiator und Zinn(II)-chlorid-Dihydrat als dem Katalysator hergestellt. Es zeigte sich mit C13-NMR und Löslichkeitsmessungen, dass die Verteilung von Lactoyl- und Glykoylgruppen in dem Copolymer zufällig war. Der Restlactidgehalt wurde durch Vakuumstripung verringert.

[0100] 0,664 ml einer GM-CSF-Lösung (etwa 63,1 mg/ml in 100 mM Tris-Puffer, filtriert durch einen 0,2-µm-Filter) wurden zu den 40 g der filtrierten Polymerlösung gegeben, mit einem Homogenisator unter Verwendung eines 20-mm-Kopfes 60 Sekunden bei 10.000 rpm gerührt, um eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) zu erzeugen. 36 ml des wärmebehandelten Dow Corning® 360 Fluid wurden der W/O-Emulsion zugesetzt, und das Gemisch wurde 90 Sekunden bei 5000 rpm homogenisiert. Das Gemisch wurde dann zu den 4,0 kg des filtrierten Dow Corning® 244 Fluid unter Rühren bei 500 rpm gegeben, um die Mikrokügelchen zu härten. Das Rühren wurde über 1 Stunde fortgesetzt. Die Mikrokügelchen wurden gesammelt, getrocknet, und die Partikelgrößenverteilung wurde wie vorstehend beschrieben analysiert. Die Probe hatte einen volumengemittelten Durchmesser von 56,0 µm, 10% der Mikrokügelchen waren unter 26,3 µm, 90% der Mikrokügelchen waren unter 91,6 µm.

[0101] Die Mikrokügelchen wurden zuerst auf das Freisetzungsverhalten in vitro analysiert, um eine kontinuierliche Freisetzung von hu-GM-CSF über einen Zeitraum von mehr als 7 Tagen zu gewährleisten ([Fig. 2A](#)). Die Mikrokügelchen wurden anschließend gewogen und in 3-cm³-Spritzen mit 50 mg Mikrokügelchen/Spritze gefüllt. Der Injektionsträger für die Mikrokügelchen war eine wässrige Lösung von Methylcellulose niedrigen Viskositätsgrades, die 3% (w/w) Methylcellulose, 0,1 Tween 80 und 4% Mannit enthielt (Endosmolalität = 292 mOsm/kg). Fläschchen wurden mit jeweils 1 g der steril filtrierten Injektionsträgerlösung gefüllt. Für die Injektion wurde eine 18-Gauge-Nadel an einer leeren 3-cm³-Spritze befestigt und zum Aufziehen von 0,5–0,6 ml Injektionsträger verwendet. Die Nadel wurde dann von der Spritze entfernt, und die den Träger enthaltende Spritze wurde an einer Mikrokügelchen enthaltenden Spritze über ein "Spritzenverbindungsstück" befestigt. Das Mischen wurde durch 25-maliges Hin- und Herschieben der Spritzen in jeder Richtung ausgeführt. Die leere Spritze und das Spritzenverbindungsstück wurden anschließend entfernt. Eine 22-Gauge-Nadel wurde dann an der Spritze mit suspendierten Mikrokügelchen für die Injektion befestigt.

Freisetzungsuntersuchungen bei Mäusen

[0102] Freisetzungsuntersuchungen wurden bei Mäusen wie folgt durchgeführt. Männliche B6-Mäuse (6 Wochen alt) wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) erhalten und über weitere 10 Wochen vor Beginn der Untersuchung in der Tierlaboreinrichtung von Immunex untergebracht. Siebzehn Gruppen von Mäusen wurden in der Untersuchung verwendet, wobei drei Mäuse pro Gruppe verwendet wurden. Für die Testgruppe wurden 50 mg Mikrokügelchen, die 500 µg hu-GM-CSF enthielten (1 Gew.-%), in 0,5 ml des Methylcellulose-Injektionsträgers subkutan injiziert. Die diese Injektionen erhaltenden Gruppen von Mäusen wurden in Zeitabständen von 1, 2, 6, 24 Stunden, 3, 5, 7 und 9 Tagen geopfert. Als negative Kontrollgruppe wurde eine Gruppe von Mäusen ohne Verabreichung von hu-GM-CSF in irgendeiner Form geopfert. Als letzter Kontrollgruppe wurde ein Bolus von hu-GM-CSF in einer Dosis von entweder 500 oder 50 µg hu-GM-CSF subkutan injiziert. Die 500-µg-Dosis entsprach der gesamten, in einer 50-mg-Injektion von Mikrokügelchen enthaltenen Menge an hu-GM-CSF, und die 50-µg-Dosis entsprach einer Annäherung an die durch 50 mg Mikrokügelchen über einen Zeitraum von 1 Tag in vitro freigesetzten Menge an hu-GM-CSF. Gruppen von Mäusen, die Bolusinjektionen erhielten, wurden in Intervallen von 1, 2, 6 und 24 h nach der Injektion geopfert.

[0103] Dem Opfern der Mäuse folgend, wurden Blutproben gewonnen und bei 4°C koagulieren gelassen. Die Blutseren wurden anschließend geerntet, und das Koagulat wurde verworfen. Zurückbleibende Zellreste wurden durch Zentrifugieren entfernt, und die Serumproben wurden dann bis zur weiteren Analyse bei -70°C eingefroren.

Tabelle 1

Übersicht der Untersuchung der Mikrokügelchenfreisetzung in vivo		
Gruppe	Beschreibung	Zeit des Opfern nach Injektion
1	keine Injektion, negative Kontrollgruppe	0 h
2	Bolusinjektion von 500 µg hu-GM-CSF	1 h
3	Bolusinjektion von 50 µg hu-GM-CSF	1 h
4	50 mg Mikrokügelchen injiziert	1 h
5	Bolusinjektion von 500 µg hu-GM-CSF	2 h
6	Bolusinjektion von 50 µg hu-GM-CSF	2 h
7	50 mg Mikrokügelchen injiziert	2 h
8	Bolusinjektion von 500 µg hu-GM-CSF	6 h
9	Bolusinjektion von 50 µg hu-GM-CSF	6 h
10	50 mg Mikrokügelchen injiziert	6 h
11	Bolusinjektion von 500 µg hu-GM-CSF	24 h
12	Bolusinjektion von 50 µg hu-GM-CSF	24 h
13	50 mg Mikrokügelchen injiziert	24 h
14	50 mg Mikrokügelchen injiziert	72 h (3 d)
15	50 mg Mikrokügelchen injiziert	120 h (5 d)
16	50 mg Mikrokügelchen injiziert	168 h (7 d)
17	50 mg Mikrokügelchen injiziert	216 h (9 d)

[0104] Die Serumproben wurden aufgetaut und mit ELISA zur Bestimmung der Konzentrationen an hu-GM-CSF analysiert. Der Enzymimmunoassay (EIA) für GM-CSF ist ein Assay, der entwickelt wurde, um die Spiegel an rekombinantem humanen (rhu) GM-CSF in einer unbekannten Probe quantitativ zu erfassen. Ein muriner monoklonaler Anti-GM-CSF-Antikörper wird auf einer Polystyrolplatte mit 96 Vertiefungen über Nacht adsorbiert. Nach dem Waschen werden eine Standardkurve und Proben auf die Platte gegeben und inkubiert. Die Platte wird gewaschen, um jeglichen Überschuss an nicht aufgenommenem rhu-GM-CSF zu entfernen. Ein polyklonaler Antikörper gegen rhu-GM-CSF wird dann jeder Vertiefung zugesetzt und inkubiert. Die Platte wird gewaschen, um jeglichen ungebundenen polyklonalen Antikörper zu entfernen, und eine Lösung, die Esel-anti-Schaf-IgG-Antikörper, konjugiert an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP), enthält, wird in jede Vertiefung gegeben. Der Inkubation folgend, wird die Platte gewaschen, um jeglichen Überschuss des an HRP gebundenen Antikörpers, welcher nicht an die vorhandenen Schaf-Antikörper gebunden hat, zu entfernen. Eine Entwicklerlösung, die das chromogene Substrat für das HRP-Konjugat enthält, wird anschließend zu der Platte gegeben. Die Farbentwicklung ist der Menge an vorhandenem HRP-Konjugat direkt proportional. Die abgelesenen Messwerte der optischen Dichte bei der korrekten Wellenlänge ergeben für jede Vertiefung Zahlenwerte. Diese Vertiefungen können mit den Werten der Standardkurve verglichen werden, was die quantitative Bestimmung der Spiegel an rhu-GM-CSF erlaubt. Ein monoklonaler Anti-GM-CSF-Antikörper kann von Im-

munex erhalten werden. Ein HRP-Konjugat vom Esel-anti-Schaf-IgG-Antikörper wird von Jackson Immunoresearch Laboratories bezogen.

[0105] Die Serumproben wurden außerdem mit dem Zellproliferationsassay TF-1 auf die Bioaktivität analysiert. Der TF-1-Bioassay wird verwendet, um das Vorhandensein und die Menge an humanem GM-CSF nachzuweisen. Der TF-1-Bioassay verwendet eine humane Erythroleukämie-Zelllinie, TF-1, um die Anwesenheit von hu-GM-CSF, hu-IL-3 oder rhu-PIXY321 in Untersuchungsproben festzustellen. Diese Zellen sind im Wachstum von hu-GM-CSF abhängig und werden in einem mit hu-GM-CSF ergänzten Medium gehalten. Der Zusatz von hu-GM-CSF, hu-IL-3 oder rhu-PIXY321 zu diesen Zellen stimuliert eine dosisabhängige Proliferation, was die quantitative Bestimmung von hu-GM-CSF, hu-IL-3 oder rhu-PIXY321 in Untersuchungsproben beim Vergleich mit einem Standard mit bekannter Konzentration an hu-GM-CSF, hu-IL-3 oder rhu-PIXY321 zulässt.

[0106] Das Ausmaß der Proliferation wird durch "Pulsen" jeder Mikrovertiefung mit tritiiertem Thymidin (^3H -TdR) über 4 Stunden bei 37°C gemessen. Proliferierende TF-1-Zellen werden (^3H -TdR), welches dem Medium zugesetzt wird, in ihre DNA einbauen, wenn sie sich teilen. Die Zellen aus jeder Vertiefung werden dann auf ein Glasfaserfilterpapier, welches den markierten GM-CSF einfängt, geerntet. Die Menge des auf jedem Filterpapier eingefangenen ^3H -TdR wird dann auf einem Beta-Zähler gezählt. Die Anzahl der Counts pro Minute (cpm) für jede Vertiefung ist dem Ausmaß der Proliferation durch die aktivierten TF-1-Zellen als Antwort auf hu-GM-CSF, hu-IL-3 oder rhu-PIXY321 direkt proportional. Die resultierenden Counts pro Minute sind der Menge an GM-CSF, die die Zellkolonie stimuliert hat, direkt proportional.

[0107] Um die Bioaktivität von GM-CSF in den Freisetzungspuben zu bestimmen, werden alle Proben auf 0,2 ng GM-CSF/ml verdünnt und der Analyse unterzogen. Die resultierenden Aktivitäten, ausgedrückt als Einheiten/ml, werden mit der Aktivität einer unbehandelten Stammprobe von GM-CSF, die gleichzeitig analysiert wird, verglichen. Theoretisch sollten alle Proben ungefähr 100% Aktivität im Verhältnis zur Stammprobe aufweisen. Zwischen den Assays können die Kontrollwerte ungefähr 20 bis 25% abweichen, ein nicht ungewöhnliches Präzisionsniveau bei auf Zellwachstum basierenden Assays.

[0108] Der prozentuale Anteil der zu jedem Zeitpunkt beibehaltenen spezifischen Aktivität wurde durch Dividieren der zu jedem Zeitpunkt gemessenen spezifischen Aktivität durch die spezifische Aktivität von Stamm-hu-GM-CSF derselben Charge, welches nicht in Mikrokügelchen eingebracht worden war, ermittelt.

[0109] Die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchung sind in [Fig. 2A](#) dargestellt, welche ein Diagramm der Freisetzungskinetik in vitro ist, das die Freisetzung über einen Zeitraum von etwa zehn Tagen zeigt. [Fig. 2B](#) ist ein Diagramm der Spiegel an hu-GM-CSF des zirkulierenden Mausserums (bestimmt mit ELISA) als Funktion der Zeit. Sowohl die 500- μg - als auch die 50- μg -Bolusinjektionen wurden aus Mausserum schnell geklärt. Infolge der raschen Abnahme von nachweisbarem hu-GM-CSF in Mausserum konnte nur eine grobe Schätzung der Halbwertszeit der β -Eliminierung vorgenommen werden ($t_{1/2\beta} = 1,57 \text{ h}$); diese Schätzung stimmt jedoch genau mit vorher berichteten Halbwertszeiten für in einem Mausmodell zirkulierenden hu-GM-CSF überein. Serumspiegel an hu-GM-CSF in den Mäusen, welche Mikrokügelchen erhielten, fielen in den ersten 6 Stunden nach der Injektion rasch ab (von 218 auf 35 ng/ml) und blieben dann über die restlichen 9 Tage der Untersuchung relativ konstant. Vermutlich würde angesichts des Freisetzungsprofils in vitro für diese Charge von Mikrokügelchen (ungefähr 30% Freisetzung nach 9 Tagen) hu-GM-CSF aus den Mikrokügelchen über den Zeitraum von 9 Tagen hinaus, als die Untersuchung in vivo beendet wurde, freigesetzt werden.

[0110] Wie [Fig. 2C](#) zeigt, wurden die Freisetzungsdaten in vivo mit den Freisetzungsdaten in vitro wie folgt verglichen: (1) die Freisetzungsdaten in vitro wurden zuerst mathematisch modelliert, um eine Potenzreihe anzupassen; (2) ein theoretisches Serumkonzentrationsprofil von hu-GM-CSF in vivo wurde anschließend durch Erstellen einer Massenbilanz in einem Einkammermodell berechnet (d. h. die Konzentration an hu-GM-CSF in der Maus zu jeder Zeit ist gleich der zu einem früheren Zeitpunkt bereits in der Maus vorhandenen Konzentration an hu-GM-CSF plus der Menge des aus den Mikrokügelchen über diesen Zeitraum freigesetzten hu-GM-CSF minus der Menge des durch normale physiologische Clearance-mechanismen über denselben Zeitraum geklärten hu-GM-CSF). Der resultierende Vergleich der Serumkonzentration, basierend auf der Freisetzung in vitro, und den tatsächlichen Serumspiegeln an hu-GM-CSF in vivo ist in [Fig. 2C](#) dargestellt. Wie diese Figur zeigt, waren die tatsächlichen Serumspiegel an hu-GM-CSF in vivo geringer als die durch die Freisetzung in vitro vorausgesagten, die Profile hatten jedoch eine ähnliche Form und waren bei den Werten zu späteren Zeitpunkten außergewöhnlich dicht beieinander.

[0111] Die Bioaktivität des von Mikrokügelchen in vivo freigesetzten hu-GM-CSF wurde mit dem TF-1-Bioas-

say eingeschätzt. Der prozentuale Anteil der spezifischen Bioaktivität veränderte sich von einem Höchstwert von 67% bei 1 Stunde und ging allmählich auf einen Tiefstwert von 33% nach 9 Tagen zurück.

Beispiel 5: Freisetzung von humanem GM-CSF aus Mikrokügelchen in einem Primatenmodell

[0112] Mikrokügelchen mit hu-GM-CSF wurden für die Injektion in vivo in einem Rhesusaffenmodell (Chargen-Nr. 9490-168, Probe "V4") hergestellt. Die Mikrokügelchen wurden zuerst in vitro auf den Proteingehalt (1,48% (w/w) mit Aminosäureanalyse), die Freisetzungskinetik (siehe [Fig. 3A](#)) und die Bioaktivität des freigesetzten Stoffes mit dem TF-1-Bioassay (siehe [Fig. 1B](#) und [Fig. 3B](#)) beurteilt. Basierend auf dem Freisetzungsprofil in vitro, wurden die Mikrokügelchen so ausgewogen, dass die Primaten ungefähr 25 µg/kg/Tag über 7 Tage erhalten würden. Die Spritzen wurden mit Mikrokügelchen gefüllt, welche 5% zusätzlich für das bei der Injektion anzutreffende Restvolumen (50 µl Restvolumen auf 1 cm³ Tuberkulinspritze) enthielten. Drei Primaten erhielten Injektionen mit GM-CSF enthaltenden Mikrokügelchen. Ein Primat erhielt Placebomikrokügelchen, welche keine Mikrokügelchen enthielten. Die in jeden der Primaten injizierte Menge an Mikrokügelchen betrug 39,4 mg; 35,5 mg; 42,1 mg bzw. 36,8 mg für Tiere von 3,2 kg; 2,9 kg; 3,4 kg bzw. 3,0 kg.

[0113] Der Injektionsträger für die Mikrokügelchen war eine wässrige Lösung von Methylcellulose niedrigen Viskositätsgrades, die 3% (w/w) Methylcellulose, 0,1% Tween 80 und 4% Mannit enthielt.

[0114] Serumproben wurden an den Tagen 3 und 1 vor der Injektion, am Tag der Injektion und täglich an den der Injektion folgenden 10 Tagen gesammelt und auf die Anzahl der weißen Blutkörperchen (WBC), die absolute Neutrophilenzahl (ANC) und die Thrombozytenzahl analysiert. Die täglichen Blutzellenzahlen sind in [Fig. 3C](#) dargestellt.

[0115] Die WBCs und ANCs waren an den Tagen 1 bis einschließlich 4 bei jedem der Tiere, die GM-CSF enthaltende Mikrokügelchen erhielten, deutlich erhöht. Keine Änderungen in den Blutzellenzahlen wurden für den Primaten gemessen, der die Placeboinjektion erhielt.

[0116] Dieses Beispiel zeigt, dass rekombinanter humaner GM-CSF, freigesetzt in vivo aus PLGA-Mikrokügelchen, zum Auslösen einer biologischen Reaktion in einem nicht-humanen Primatenmodell imstande ist.

[0117] Eine bei den Affen zu ersehende stark lokalisierte, entzündliche Reaktion war durch eine stark lokalisierte Schwellung (Beule von 1–2 cm Durchmesser) an der Injektionsstelle als Folge der Aktivierung von Neutrophilen, Makrophagen, dendritischen Zellen und Monozyten gekennzeichnet.

Beispiel 6: Freisetzung von GM-CSF aus einem PLGA-Gel

[0118] Eine 20%ige Lösung von PLGA (Verhältnis von Lactid zu Glykolid 50 : 50, intrinsische Viskosität (IV) von 0,38 dl/g) wurde durch Erwärmen von 2 g PLGA in 8 g Glycerintriacetat (Triacetin) 30 Minuten bei 70°C erwärmt. Lyophilisierter GM-CSF wurde der PLGA-Lösung zu 10 mg/ml zugesetzt und diese beschallt, um das Mischen abzuschließen. Schraubfläschchen (5 ml) wurden mit 3 ml PBS gefüllt, und ungefähr 250 µg der PLGA/GM-CSF-Lösung (mit ungefähr 2,5 mg GM-CSF) wurden jedem Fläschchen durch Pipettieren zugegeben. Die Fläschchen wurden bei 37°C über 6 Tage leicht geschüttelt. Die injizierte Lösung bildete nach der Injektion in die PBS ein Gel. In Zeitabständen von 4 h, 8 h, 1 d, 3 d und 6 d wurden die Lösungen aus den Fläschchen abgezogen und mit einem Bio-Rad-Gesamtproteinassay auf den GM-CSF-Gehalt analysiert.

[0119] Die Freisetzungskinetik des Proteins ist in [Fig. 4](#) dargestellt und zeigt über einen Zeitraum von etwa sechs Tagen eine Kinetik erster Ordnung.

Beispiel 7: Herstellung von Mikrokügelchen unter Verwendung eines W/O/W-Methanol-Extraktionsverfahrens (Chargen-Nr. 14254-138)

[0120] Das einkapselnde Polymer war ein Gemisch von 70 : 20 : 10 aus 1) einem Poly(glykolid-co-D,L-lactid) mit einem Verhältnis von Glykolid zu Lactid von 50 : 50 und einer inhärenten Viskosität von 0,33 dl/g, wie in einer 0,1% (w/v) Chloroformlösung bei 25°C ermittelt, (Polymer I), 2) einem Poly(L-lactid) mit einem mittleren Molekulargewicht von 1786, wie durch Endgruppentitration bestimmt, (Polymer II), und 3) einem Poly(D,L-lactid) mit einem mittleren Molekulargewicht von 1938, wie durch Endgruppentitration ermittelt, (Polymer III). Die Polymere wurden vor der Verwendung umgefällt. Die einkapselnde Polymerlösung wurde durch Zusetzen von 1,40 g Polymer I, 0,40 g Polymer II und 0,20 g Polymer III zu 8,00 g Methylenchlorid und Rühren des Gemischs, bis die Polymere gelöst waren, hergestellt.

[0121] Eine 5%ige wässrige Lösung von Polyvinylalkohol (PVA) wurde durch Hinzufügen von 20,00 g PVA von geringem Molekulargewicht (MW = 31.000–50.000, 87–89% hydrolysiert) zu 380 g deionisiertem Wasser und Rühren unter Erwärmen (auf ungefähr 70°C), bis der PVA gelöst ist, hergestellt. Die Lösung wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur durch einen 0,2-µm-Filter filtriert.

[0122] 0,389 ml einer GM-CSF-Lösung (etwa 87,3 mg/ml in 100 mM Tris-Puffer) wurden zu 8,50 g der einkapselnden Polymerlösung in einem 30-ml-Becherglas gegeben, und es wurde mit einem 20-mm-Kopf 60 Sekunden bei 6000 rpm homogenisiert, um eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) zu erzeugen.

[0123] Die vorstehende Emulsion wurde in einem Behälter aus rostfreiem Stahl zu 400 g der 5%igen PVA-Lösung hinzugefügt, während sie mit einem Homogenisator unter Verwendung eines 20-mm-Kopfes bei 6000 rpm gerührt wurde, um eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion (W/O/W-Emulsion) zu erzeugen. Die insgesamt vergangene Zeit betrug 1 Minute.

[0124] Der die W/O/W-Emulsion enthaltende Behälter wurde unter einen mit einem "Dispergierer mit hoher Scherung" ausgestatteten Mischer gestellt und bei 400 rpm gerührt. 400 g Methanol wurden der W/O/W-Emulsion über eine Zeitspanne von 45 Minuten zugesetzt, um das Methylenchlorid aus den Mikrokügelchen zu extrahieren. Das Rühren wurde nach dem Methanolzusatz über weitere 45 Minuten fortgesetzt.

[0125] Die Mikrokügelchen wurden gesammelt, getrocknet, und die Partikelgrößenverteilung wurde wie vorstehend beschrieben ermittelt.

[0126] Die Probe hatte einen volumengemittelten Durchmesser von 24,1 µm, 10% der Mikrokügelchen waren unter 10,8 µm, und 90% der Mikrokügelchen waren unter 42,3 µm.

Beispiel 8: Mikrokügelchenherstellung unter Verwendung eines W/O/W-Methanol-Extraktionsverfahrens (Chargen-Nr. 14254-160)

[0127] Das einkapselnde Polymer war ein Gemisch von 80 : 10 : 10 aus 1) einem Poly(glykolid-co-D,L-lactid) mit einem Verhältnis von Glykolid zu Lactid von 50 : 50 und einer inhärenten Viskosität von 0,33 dl/g, wie in einer 0,1% (w/v) Chloroformlösung bei 25°C ermittelt, (Polymer I), 2) einem Poly(L-lactid) mit einem mittleren Molekulargewicht von 1786, wie durch Endgruppentitration bestimmt, (Polymer II), und 3) einem Poly(D,L-lactid) mit einem mittleren Molekulargewicht von 1938, wie durch Endgruppentitration ermittelt, (Polymer III). Die Polymere wurden vor der Verwendung umgefällt. Die einkapselnde Polymerlösung wurde durch Zusetzen von 1,60 g Polymer I, 0,20 g Polymer II und 0,20 g Polymer III zu 8,00 g Methylenchlorid und Rühren des Gemischs, bis die Polymere gelöst waren, hergestellt.

[0128] Eine 5%ige wässrige Lösung von Polyvinylalkohol (PVA) wurde durch Hinzufügen von 20,00 g PVA von geringem Molekulargewicht (MW = 31.000–50.000, 87–89% hydrolysiert) zu 380 g deionisiertem Wasser und Rühren unter Erwärmen (auf ungefähr 70°C), bis der PVA gelöst ist, hergestellt. Die Lösung wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur durch einen 0,2-µm-Filter filtriert.

[0129] 0,389 ml einer GM-CSF-Lösung (etwa 87,3 mg/ml in 100 mM Tris-Puffer) wurden zu 8,50 g der einkapselnden Polymerlösung in einem 30-ml-Becherglas gegeben, und es wurde mit einem 20-mm-Kopf 60 Sekunden bei 6000 rpm homogenisiert, um eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) zu erzeugen.

[0130] Die vorstehende Emulsion wurde in einem Behälter aus rostfreiem Stahl zu 400 g der 5%igen PVA-Lösung hinzugefügt, während sie mit einem Homogenisator unter Verwendung eines 20-mm-Kopfes bei 6000 rpm gerührt wurde, um eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion (W/O/W-Emulsion) zu erzeugen. Die insgesamt vergangene Zeit betrug 1 Minute.

[0131] Der die W/O/W-Emulsion enthaltende Behälter wurde unter einen mit einem "Dispergierer mit hoher Scherung" ausgestatteten Mischer gestellt und bei 400 rpm gerührt. 400 g Methanol wurden anschließend bei einer konstanten Geschwindigkeit über eine Zeitspanne von 5 Minuten in die W/O/W-Emulsion gepumpt, um das Methylenchlorid aus den Mikrokügelchen zu extrahieren. Das Rühren wurde nach dem Methanolzusatz über weitere 85 Minuten fortgesetzt.

[0132] Die Mikrokügelchen wurden gesammelt, getrocknet, und die Partikelgrößenverteilung wurde wie vorstehend beschrieben ermittelt.

[0133] Die Probe hatte einen volumengemittelten Durchmesser von 26,1 µm, 10% der Mikrokügelchen waren unter 11,6 µm, und 90% der Mikrokügelchen waren unter 46,7 µm.

Beispiel 9: Herstellung von Mikrokügelchen, Chargen-Nr. 14259-100, (Hydrogel), mit einem W/O/W-Methanol-Extraktionsverfahren

[0134] Das einkapselnde Polymer war ein 67 : 23 : 10 Triblockpolymer aus Caprolacton, Trimethylcarbonat und Polyethylenoxid 8000. 3,27 g des Polymers wurden mit 18,53 g Methylenchlorid gemischt und gerührt, bis das Polymer gelöst war.

[0135] Eine 1%ige wässrige Lösung von Polyvinylalkohol (PVA) wurde durch Hinzufügen von 11,0 g PVA von geringem Molekulargewicht (MW = 31.000–50.000, 87–89% hydrolysiert) zu 1089,00 g deionisiertem Wasser und Rühren unter Erwärmen (auf ungefähr 70°C), bis der PVA gelöst ist, hergestellt. Die Lösung wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur durch einen 0,2-µm-Filter filtriert.

[0136] 0,174 ml einer GM-CSF-Lösung (auf 87,1 mg/ml in 100 mM Tris-Puffer) wurden zu einem Anteil der einkapselnden Polymerlösung von 10,00 g in einem 30-ml-Becherglas gegeben, und es wurde mit einem 20-mm-Kopf 60 Sekunden bei 6000 rpm homogenisiert, um eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) zu erzeugen.

[0137] Die vorstehende Emulsion wurde in einem Behälter aus rostfreiem Stahl zu einem Anteil der 1%igen PVA-Lösung von 500 g hinzugefügt, während sie mit einem Homogenisator unter Verwendung eines 20-mm-Kopfes bei 6000 rpm gerührt wurde, um eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion (W/O/W-Emulsion) zu erzeugen. Die insgesamt vergangene Zeit betrug 1 Minute.

[0138] Der die W/O/W-Emulsion enthaltende Behälter wurde unter einen mit einem "Dispergierer mit hoher Scherung" ausgestatteten Mischer gestellt und bei 400 rpm gerührt. 500 g Methanol wurden über eine Zeitspanne von 5 Minuten in die W/O/W-Emulsion gepumpt, um das Methylenchlorid aus den Mikrokügelchen zu extrahieren. Das Rühren wurde nach dem Methanolzusatz über weitere 55 Minuten fortgesetzt.

[0139] Die Mikrokügelchen wurden gesammelt, getrocknet, und die Partikelgrößenverteilung wurde mit einem Malvern Particle Sizer 2600 ermittelt. Ungefähr 50 mg der Mikrokügelchen wurden in etwa 10 ml Methanol suspendiert und 2 Minuten beschallt, um die Mikrokügelchen vollständig zu dispergieren. Einige Tropfen dieser Suspension wurden dann in die optische Zelle, welche Methanol enthielt, gegeben. Die Partikelgrößenverteilung wurde anschließend gemessen. Die Probe hatte einen volumengemittelten Durchmesser von 68,3 µm, 10% der Mikrokügelchen waren unter 14,3 µm, und 90% der Mikrokügelchen waren unter 177,3 µm.

Beispiel 10: Extraktion von GM-CSF aus Mikrokügelchen für die Bestimmung der Bioaktivität in vitro

[0140] Dieses Verfahren des Extrahierens des Proteins aus den Mikrokügelchen ist sowohl quantitativ als auch nicht destruktiv und kann deshalb verwendet werden, um die Integrität des eingebrachten Proteins festzustellen. Ungefähr 20 mg Mikrokügelchen (Chargen L3, M3, N3, K3, J3 und E3), hergestellt mit dem in Beispiel 1 beschriebenen Phasentrennungsverfahren, wurden in ein 2-ml-Eppendorf-Röhrchen eingewogen. 500 µl Eisessig wurden dann zugesetzt, und die Röhrchen wurden verschlossen und periodisch gevortext, um die Mikrokügelchen vollständig zu lösen. 500 µl Methylenchlorid wurden anschließend zugegeben, und die Röhrchen wurden verschlossen und für etwa 5 Minuten periodisch gevortext. Zum Schluss wurden 500 µl PBS zugefügt, und noch einmal wurden die Röhrchen verschlossen und für etwa 2 Minuten ununterbrochen gevortext. Die verschlossenen Röhrchen wurden als Nächstes in einer Mikrofuge 2 Minuten bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert, um die saubere Trennung der wässrigen und organischen Phase zu erleichtern. Die Extinktion der oberen wässrigen, den GM-CSF enthaltenden Schicht (1 ml) bei 280 nm wurde bestimmt, und die Konzentration an GM-CSF in mg/ml wurde durch Dividieren der Extinktion durch den Extinktionskoeffizienten von 1,08 berechnet. Die Proben wurden anschließend dem TF-1-Bioassay unterzogen, um die Bioaktivität des GM-CSF zu bestimmen.

[0141] [Fig. 5](#) zeigt die Bioaktivität des aus den Mikrokügelchen extrahierten GM-CSF in Prozent. Die Kontrollprobe ist eine wässrige GM-CSF-Probe, die dasselbe Extraktionsverfahren durchlaufen hat. Diese Ergebnisse zeigen, dass der aus den Mikrokügelchen extrahierte GM-CSF die gesamte Bioaktivität behalten hat.

Beispiel 11: Herstellung von PLGA-Mikrokügelchen und Abbauprofile von PLGA

[0142] Mikrokügelchen, die 100% Cytac, PLGA mit einer intrinsischen Viskosität (IV) von 0,7 dl/g, 100% PLA R104 und ein Gemisch von 80 : 20 des/der PLGA : PLA enthielten, wurden durch das Verfahren der Härtung mit Siliconöl hergestellt. Proben jeder von diesen Mikrokügelchen wurden in PBS über Zeiträume von 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 28, 42 und 56 Tagen bei 37°C inkubiert. Der Inkubation folgend, wurden die Mikrokügelchen in Tetrahydrofuran (THF) gelöst, wodurch 1- bis 2%ige Lösungen (Gewicht Mikrokügelchen/Volumen THF) hergestellt wurden. Die Proben wurden anschließend mit Gelpermeationschromatographie (GPC) unter Verwendung eines Waters-HPLC-Systems mit einer Styragel-HR-4E-Säule (Waters), welches den ganzen GPC-Durchlauf hindurch auf 30°C gehalten wurde, analysiert. Polystyrolstandards eines engen Molekulargewichtsbereichs wurden verwendet, um die Säule zu kalibrieren. Das Gewichts- und Zahlenmittel des Molekulargewichts der abgebauten PLGA-Polymere wurden mit der GPC-Millennium-Software (Waters) ermittelt. Nachstehende [Fig. 6](#) veranschaulicht das Gewichtsmittel des Molekulargewichts jeder Mikrokügelchenformulierung als Funktion der Inkubationszeit. Anzumerken ist, dass der Abbau der aus 100 Cytac, PLGA mit 0,7 IV, über einen Inkubationszeitraum von 14 Tagen unvollständig war, während das Gemisch von 80 : 20 von Cytac 0,7 IV/R104 im Wesentlichen abgebaut wurde. In diesem Beispiel wirkte die PLA R104 als Abbaubeschleuniger für die Mikrokügelchen.

[0143] Abwandlungen und Variationen der hierin beschriebenen Zusammensetzungen und Verfahren zur Herstellung und Verwendung werden den Fachleuten aus der vorangehenden Beschreibung naheliegend sein. Derartige Abwandlungen und Variationen sind dazu bestimmt, zum Umfang der angefügten Ansprüche zu gehören.

Patentansprüche

1. Mikropartikel umfassend GM-CSF dispergiert in synthetischen, polymeren Mikropartikeln, gebildet aus einer Mischung aus zwei oder mehr bioabbaubaren synthetischen Polymeren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyhydroxysäuren, Polyanhydriden, Polyorthoestern, Polyphosphazenen und Copolymeren derselben, bietend eine anhaltende Freisetzung unter physiologischen Bedingungen.
2. Mikropartikel nach Anspruch 1, wobei zumindest eines der Polymere ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Polyhydroxysäuren, Polyanhydriden, Polyorthoestern und Kombinationen derselben.
3. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei zumindest eines der Polymere bioadhäsiv ist.
4. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei zumindest eines der Polymere ein Chemoattraktor für weiße Zellen ist.
5. Mikropartikel nach Anspruch 2, wobei zumindest eines der Polymere ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Polymilchsäure, Polyglykolsäure und Copolymeren derselben.
6. Mikropartikel nach Anspruch 5, wobei die Polymere Polylaktid-Co-Glykolid-Copolymere sind und durchschnittliche Molekulargewichte ausgewählt aus solchen zwischen 1000 und 20.000 D, zwischen 20.000 und 35.000 D und zwischen 35.000 und 70.000 D besitzen.
7. Mikropartikel nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das GM-CSF freigesetzt wird über einen Zeitraum von zwischen drei und sieben Tagen.
8. Mikropartikel nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Freisetzung einer Freisetzung nullter oder erster Ordnung angenähert ist.
9. Mikropartikel nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei mehr als 60% des GM-CSF biologisch aktiv ist.
10. Mikropartikel nach einem der vorherigen Ansprüche, ferner umfassend Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Stabilisatoren, Komplexierungsmitteln, Porenbildnern, Abbaubeschleunigern, Säurebindemitteln und Basenbindemitteln.
11. Mikropartikel umfassend eine Mischung aus drei oder mehr Polymeren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polymilchsäure, Polyglykolsäure und Poly(milchsäure-glykolsäure)-Copolymeren mit unter-

schiedlichen Molekulargewichten, in denen eine freizusetzende Verbindung dispergiert ist.

12. Mikropartikel nach Anspruch 11, wobei die Polymere Poly(milchsäure-glykolsäure)-Copolymere mit unterschiedlichen Molekulargewichten sind.

13. Mikropartikel gemäß Anspruch 12, wobei die Polymere durchschnittliche Molekulargewichte von zwischen 1000 und 20.000 D, zwischen 20.000 und 35.000 D und zwischen 35.000 und 70.000 D besitzen.

14. Mikropartikel nach einem der vorherigen Ansprüche, umfassend ein bioadhäsives Polymer ausgewählt aus hydrophilen Polymeren, schnell bioerodierbaren Polymeren, Proteinen, Polysacchariden, Polyamiden, Polycarbonaten, Polyalkylenen, Polyalkylenglykolen, Polyalkylenoxiden, Polyalkylenterephthalaten, Polyvinylalkoholen, Polyvinylethern, Polyvinylestern, Polyvinylhaliden, Polyvinylpyrrolidon, Polyglykoliden, Polysiloxanen, Polyurethanen, Zellulosen einschließlich Alkylzellulose, Hydroxyalkylzellulosen, Zelluloseethern, Zelluloseestern, und Nitrozellulosen, Polymeren von Acryl- und Methacrylestern, Poly(lactid-co-glykolid), Poly-anhydriden, Polyorthoester-Mischungen und Copolymeren derselben.

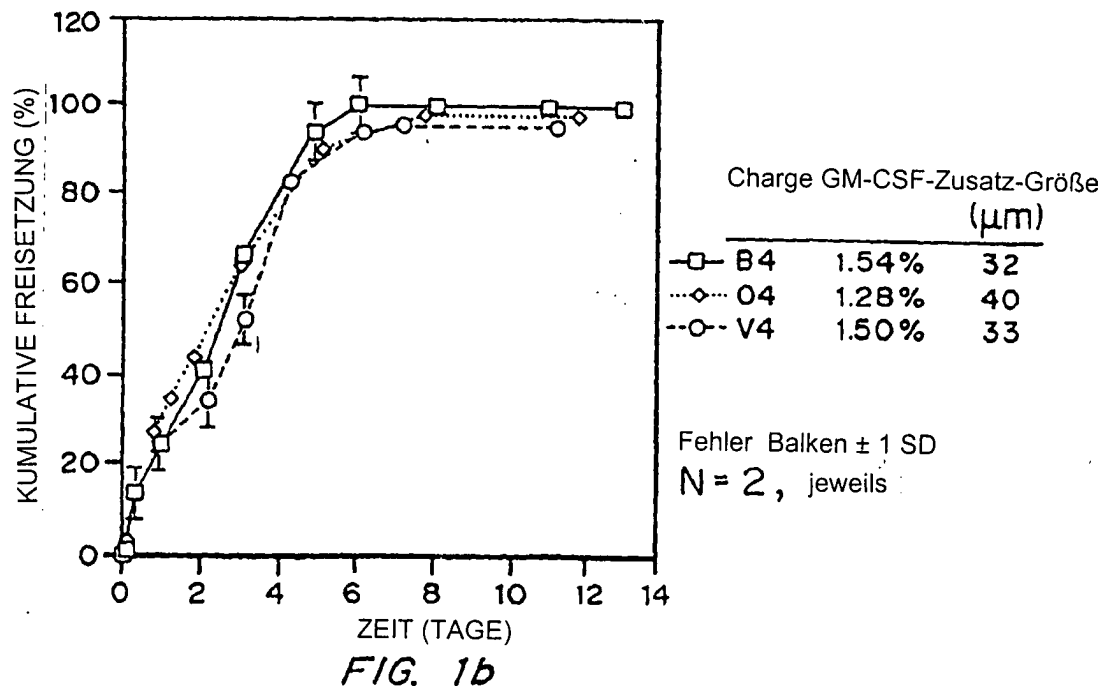
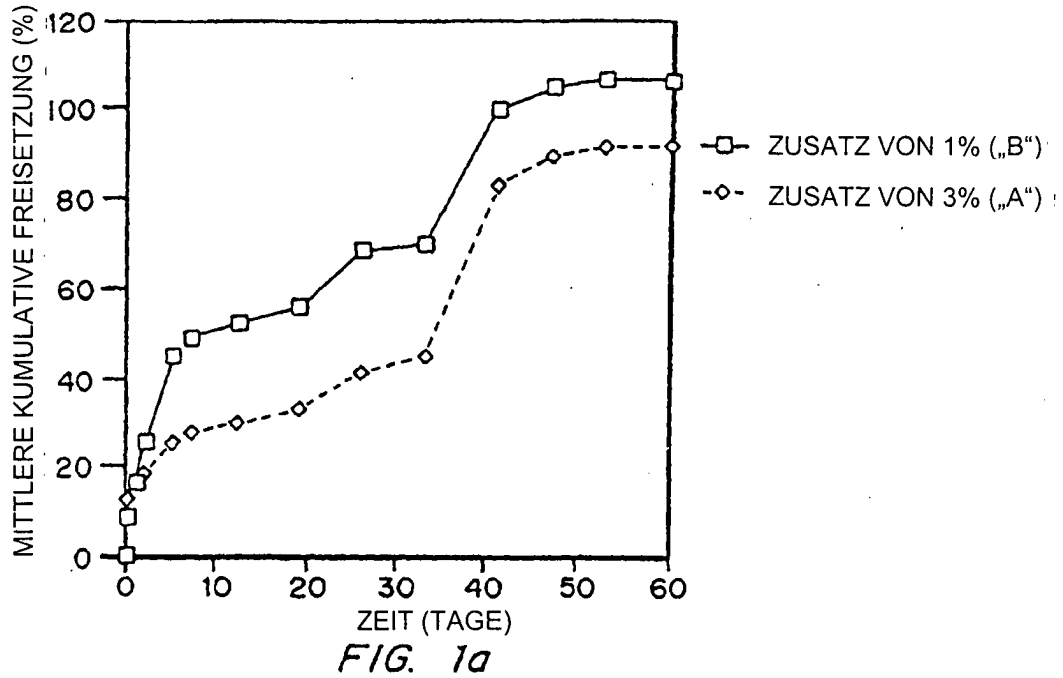
15. Mikropartikel umfassend GM-CSF dispergiert in synthetischen, polymeren Mikropartikeln gebildet aus einer Mischung aus zwei oder mehr bioabbaubaren, synthetischen Polymeren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyhydroxysäuren, Polyanhydriden, Polyorthoestern, Polyphosphazenen, und Copolymeren derselben, bietend eine anhaltende Freisetzung unter physiologischen Bedingungen, zur Verwendung in der Medizin.

16. Mikropartikel umfassend eine Mischung aus drei oder mehr Polymeren ausgewählt der Gruppe bestehend aus Polymilchsäure, Polyglykolsäure und Poly(milchsäure-glykolsäure)-Copolymeren mit unterschiedlichen Molekulargewichten, mit darin dispergierter freizusetzender Verbindung, zur Verwendung in der Medizin.

17. Verwendung von Mikropartikel umfassend GM-CSF dispergiert in synthetischen, polymeren Mikropartikeln gebildet aus einer Mischung aus zwei oder mehr bioabbaubaren, synthetischen Polymeren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyhydroxysäuren, Polyanhydriden, Polyorthoestern, Polyphosphazenen und Copolymeren derselben, bietend eine anhaltende Freisetzung unter physiologischen Bedingungen, bei der Herstellung einer Medikaments zur Förderung der Proliferation und Differentiation hematopoietischer Vorläuferzellen.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



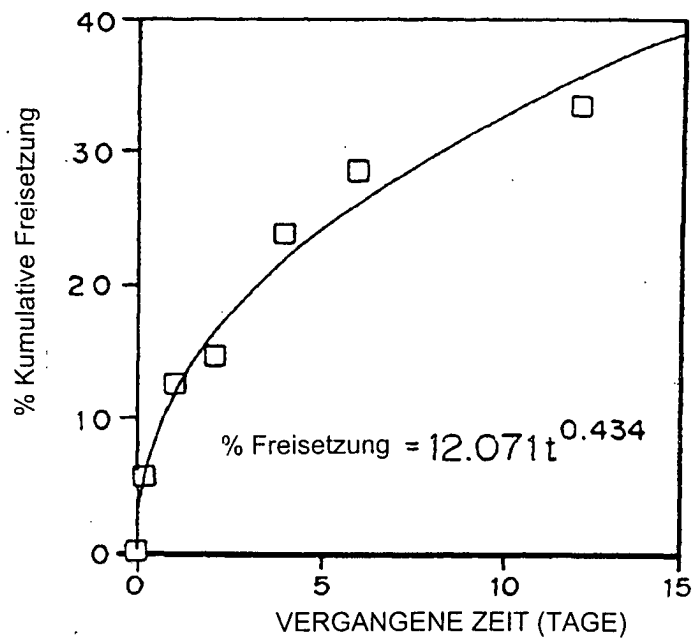


FIG. 2a

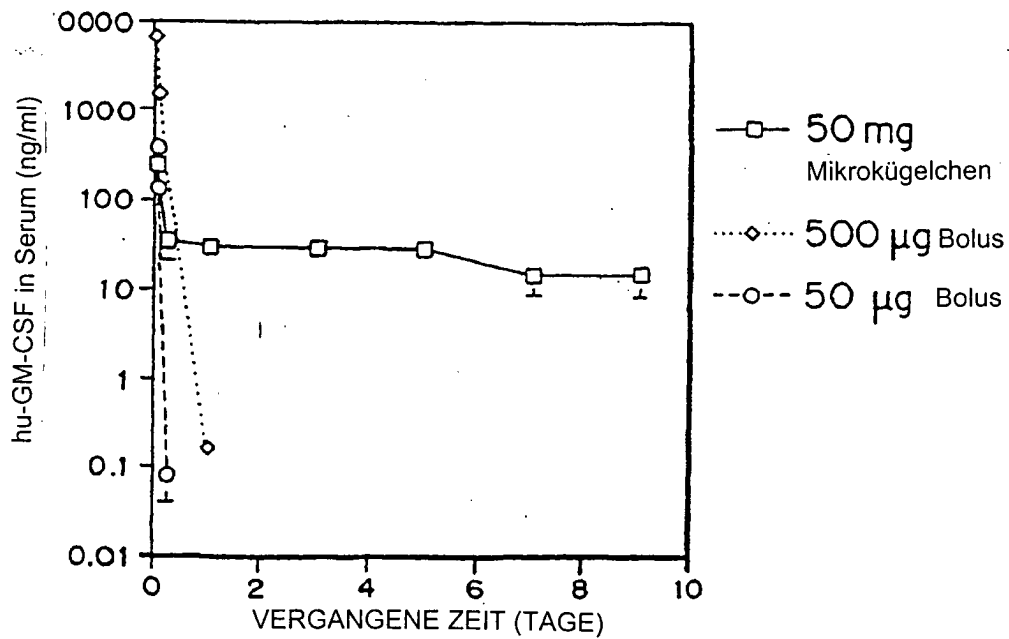


FIG. 2b

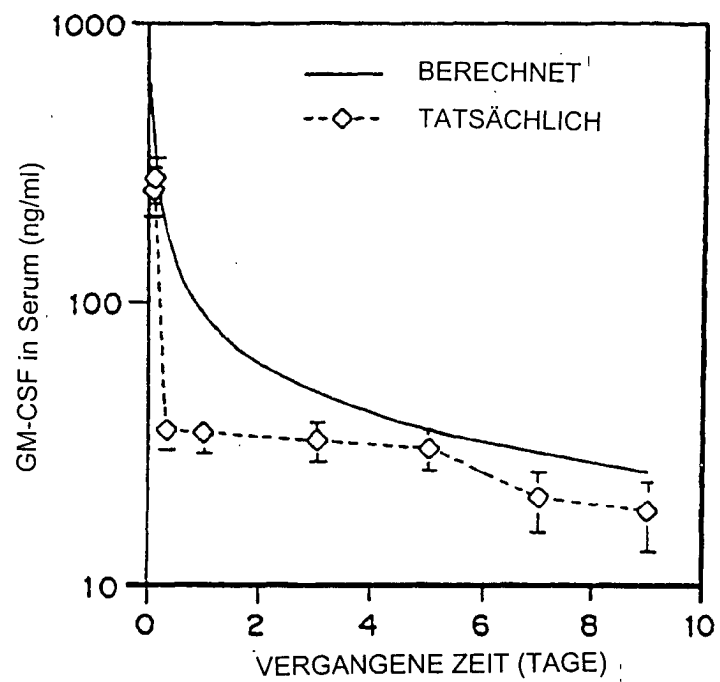


FIG. 2c

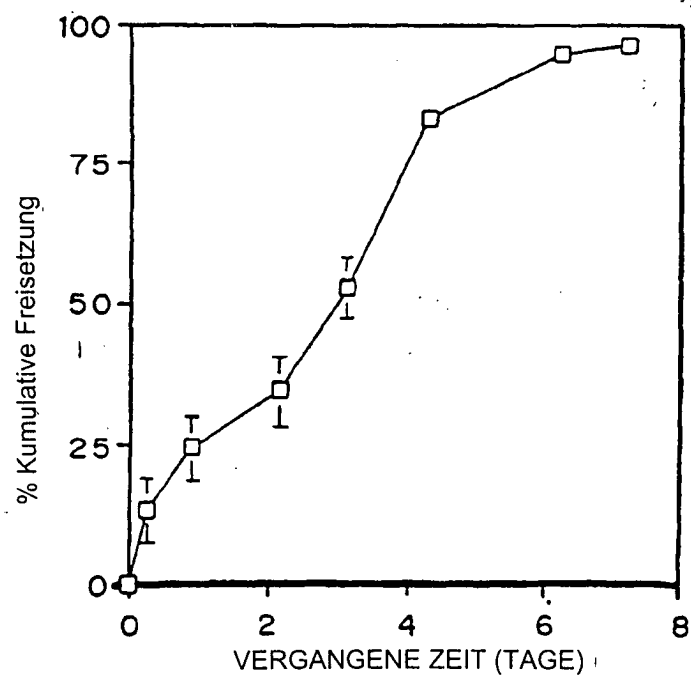


FIG. 3a

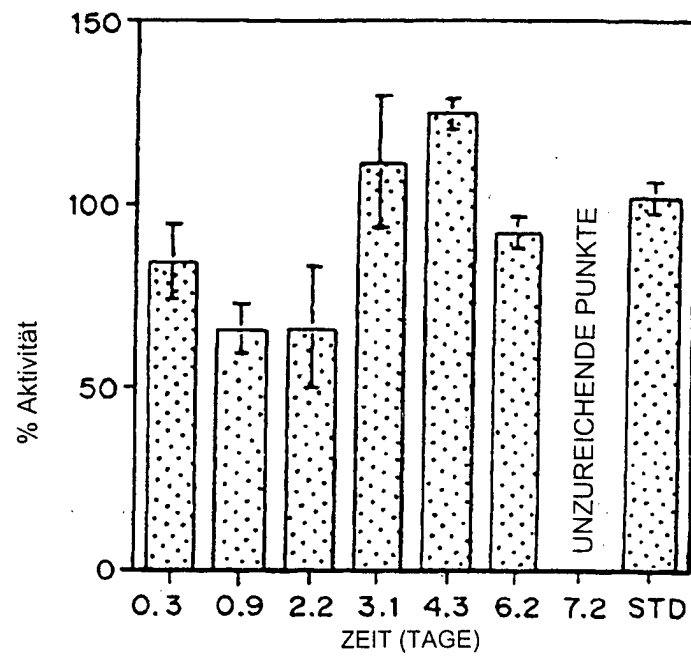


FIG. 3b

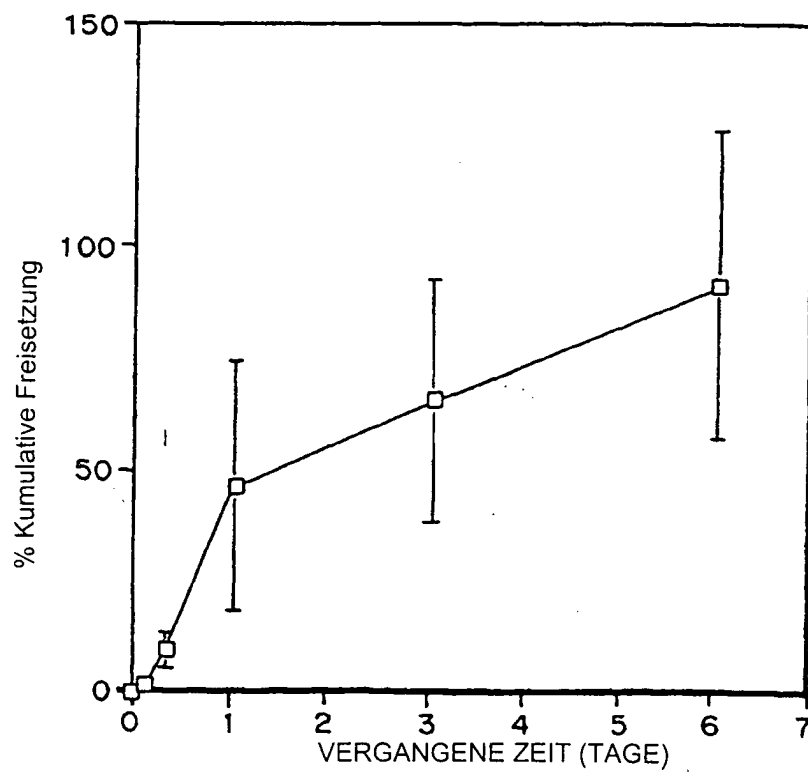


FIG. 4

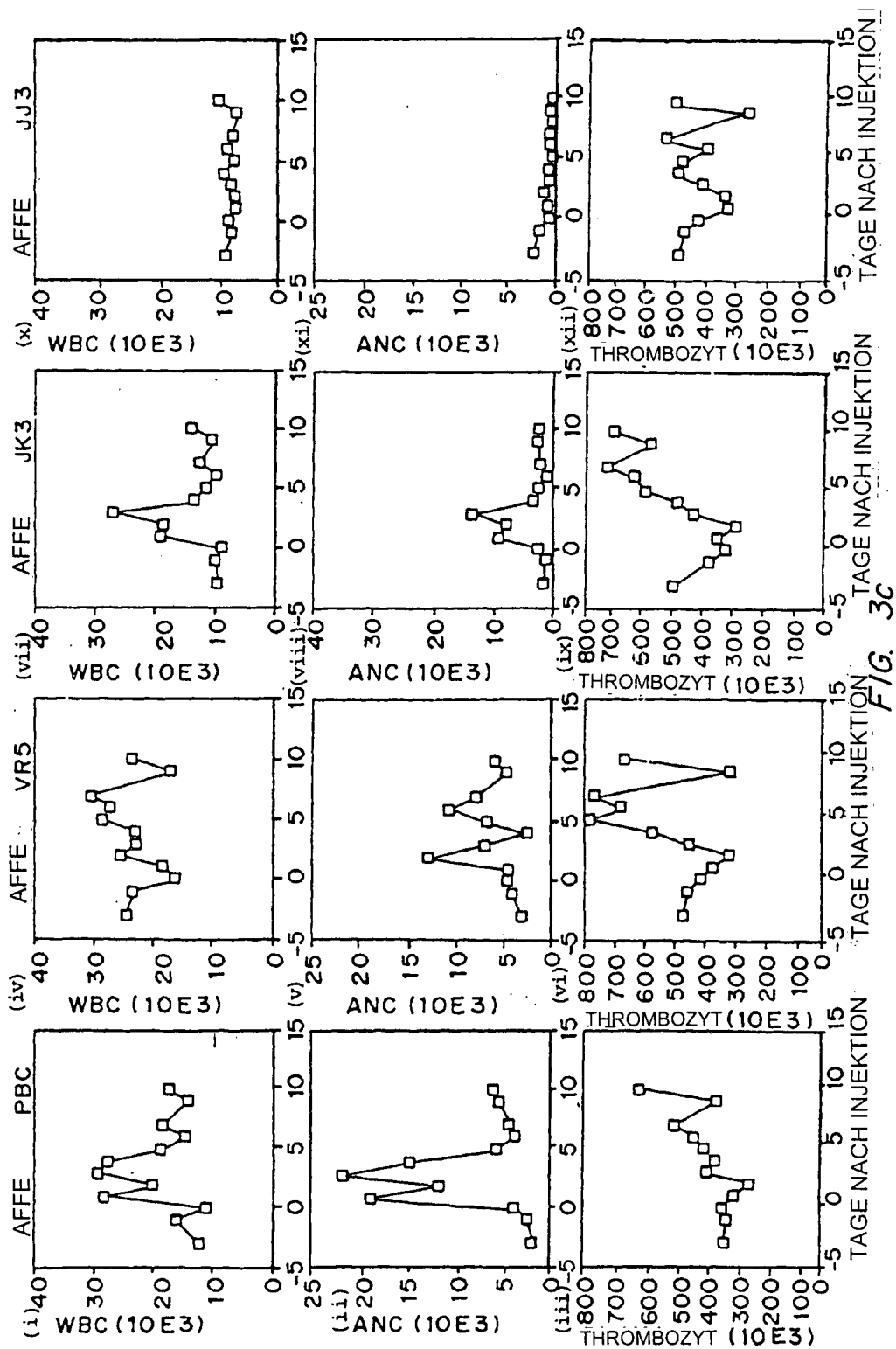


FIG. 3c

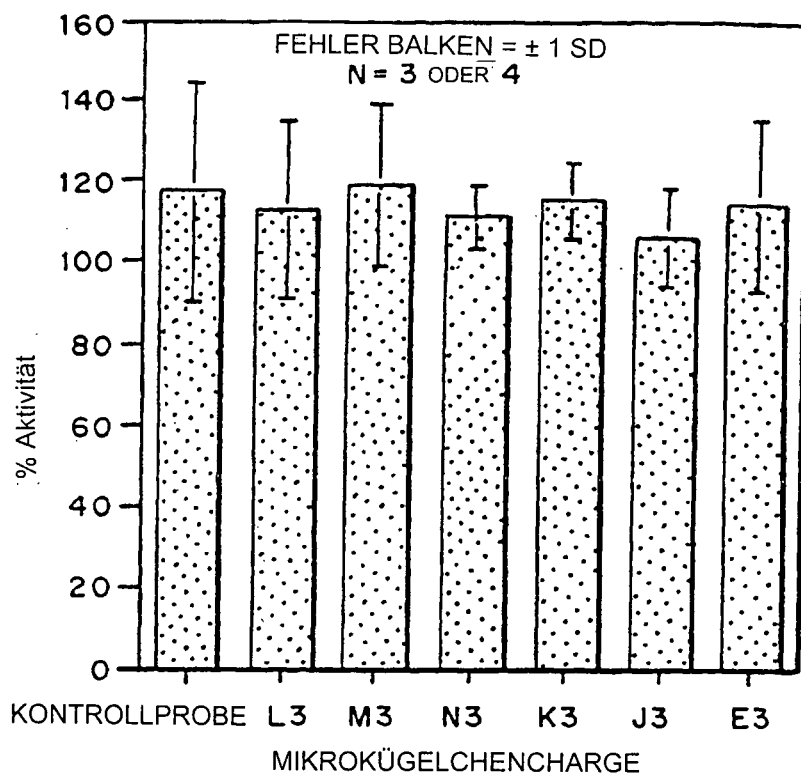


FIG. 5

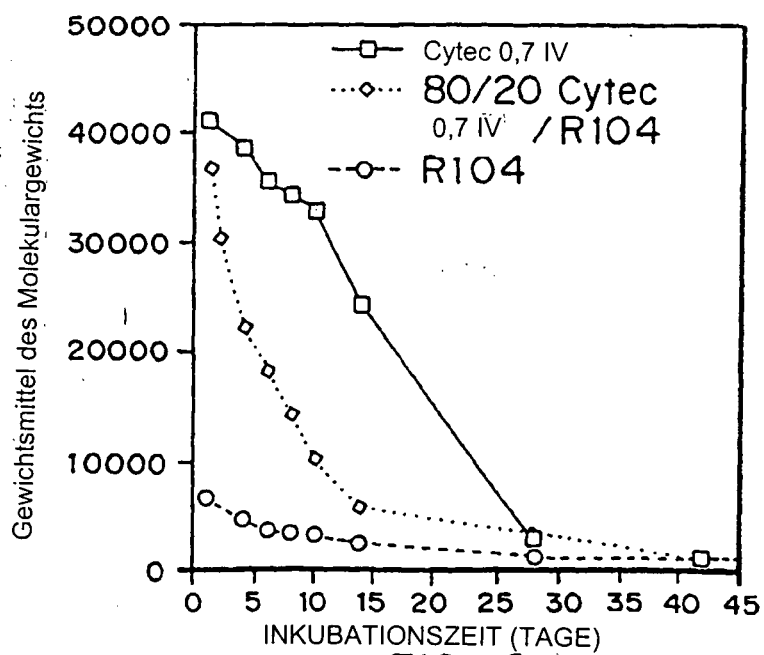


FIG. 6