SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

# ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 31.07.1998

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 197 33 651.1

(32) Dátum priority: 04.08.1997

(33) Krajina priority: DE

(40) Dátum zverejnenia: 11.07.2000

(86) Číslo PCT: PCT/EP98/04803, 31.07.1998

(21) Číslo dokumentu:

**150-2000**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7] :

**A 61K 9/00**
A 61K 38/28

(71) Prihlasovateľ: Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim am Rhein, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Lamche Herbert, Alland, AT;
Meade Christopher John Montague, Bingen am Rhein, DE;
Zierenberg Bernd, Bingen am Rheim, DE;
Reimholz Ralph Christian, Wiesbaden, DE;

(74) Zástupca: Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Vodný aerosólový prípravok na aplikáciu inhaláciou a spôsob vytvárania aerosólov na inhalačnú aplikáciu aerosólového prípravku**

(57) Anotácia:
Vodný aerosólový prípravok obsahuje biologicky aktívne makromolekuly na vytváranie inhalovateľných aerosólov bez hnacieho plynu. Je opísaný spôsob vytvárania aerosólov na inhalačnú aplikáciu aerosólového prípravku, v ktorom sa v rozprašovači bez hnacieho plynu rozpráši terapeuticky účinné množstvo aerosólového prípravku, odmerané v meracej komore a pod vysokým tlakom medzi 10 MPa a 50 MPa cez najmenej jednu dýzu s hydraulickým priemerom 1 až 12 mikrometrov na inhalovateľné kvapôčky so strednou veľkosťou častíc menšou než 10 mikrometrov v priebehu času medzi jednou a dvoma sekundami.

PV 150-2000



# Vodný aerosólový prípravok na aplikáciu inhaláciou a spôsob vytvárania aerosólov na inhalačnú aplikáciu aerosólového prípravku

## Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu vytvárania aerosólov na aplikáciu proteínov a iných biologicky aktívnych makromolekúl inhaláciou, ako aj vodných prípravkov na vytváranie takýchto aerosólov, najmä sa vynález týka vodných prípravkov vysoko koncentrovaných roztokov inzulínu na inhalačnú aplikáciu na liečenie cukrovky.

## Doterajší stav techniky

Použitie liečiv vo forme inhalovateľných aerosólov je známe už dlho. Takéto aerosóly slúžia nielen na liečenie ochorení dýchacích ciest, ako je astma; používajú sa aj vtedy, keď majú pľúca alebo nosné sliznice slúžiť ako resorpčný orgán. Takto sa často dajú vytvoriť tak vysoké hladiny účinnej látky v krvi, že sa dajú liečiť aj choroby v iných oblastiach tela. Inhalovateľné aerosóly môžu slúžiť aj ako očkovacie látky.

Na vytváranie aerosólov sa v praxi používajú viaceré spôsoby. Buď sa suspenzie alebo roztoky účinných látok rozprašujú pomocou hnacích plynov, alebo sa účinné látky vo forme mikronizovaných práškov rozvíria vo vdychovanom vzduchu, alebo sa napokon vodné roztoky rozprášia pomocou rozprašovačov.

Pri molekulách so zložitou štruktúrou, ako napríklad pri interferónoch, však rozprašovanie vodných roztokov môže ľahko viesť k rušivému zníženiu aktivity účinnej látky, pravdepodobne v dôsledku strihových síl a zahriatia. Predpokladá sa, že v tomto procese hrá úlohu napríklad tvorba menej aktívnych proteínových agregátov. A. Y. Ip a kol. opísali vo svojom článku „Stability of recombinant consensus interferon to air-jet and ultrasonic nebulisation" (Stabilita rekombinantného konsenzus interferónu pri rozprašovaní v prúde vzduchu a ultrazvukom), J. Pharm. Sci. 84, 1210-1214, 1995, príklady vzniku interferónových agregátov po rozprašovaní ultrazvukom alebo dýzou s nastávajúcou stratou biologickej aktivity

interferónu. Aj keď poškodenie biomolekuly (biologicky aktívnej makromolekuly) nie je úplné, tu opísané zníženie aktivity je dôležité, lebo spôsobuje zvýšenú spotrebu prípadne drahej biomolekuly a dávkovanie aktívneho liečiva na jeden zdvih sa stane nepresným. Toto zníženie aktivity molekúl so zložitou štruktúrou počas tvorby aerosólu sa neobmedzuje len na interferóny, ale v menšej alebo väčšej miere k nemu dochádza aj pri aerosolizácii iných proteínov (pozri napríklad Niven a kol., Pharm. Res. 12, 53-59, 1995) a biomolekúl.

Popri technickej príprave aerosólu, ktorý obsahuje biomolekulu, je nevyhnutný druhý krok, aby sa biomolekuly v pľúcach absorbovali. Pľúca dospelého človeka ponúkajú veľkú absorpčnú plochu, ale táto vykazuje aj viaceré prekážky pre pľúcnu absorpciu biomolekúl. Po vdýchnutí cez nos alebo ústa vchádza vzduch s aerosólom, ktorý nesie, do priedušnice a potom cez stále menšie priedušky a priedušničky do alveol. Alveoly majú oveľa väčšiu plochu než priedušnica, priedušky a priedušničky spolu. Sú hlavnou absorpčnou zónou nielen pre kyslík, ale aj pre biologicky aktívne makromolekuly. Aby sa dostali zo vzduchu do krvného riečišťa, molekuly musia prejsť cez alveolárny epitel, kapilárny endotel a lymfu obsahujúci intersticiálny priestor medzi týmito dvoma bunkovými vrstvami. To sa môže uskutočniť aktívnymi alebo pasívnymi transportnými procesmi. Bunky v týchto dvoch bunkových vrstvách ležia tesne vedľa seba, takže väčšina veľkých biologických makromolekúl (ako napríklad proteíny) bude túto prekážku prekonávať pomalšie než menšie molekuly. Proces prechodu cez alveolárny epitel a kapilárny endotel prebieha v konkurencii s inými biologickými procesmi, ktoré vedú k poškodeniu biomolekuly. Bronchoalveolárna tekutina obsahuje exoproteázy (pozri napríklad Wall D. A. a Lanutti A. T., „High levels of exopeptidase activity are present in rat and canine bronchoalveolar lavage fluid" (Vysoké hladiny exopeptidázovej aktivity sú prítomné v bronchoalveolárnej výplachovej tekutine u krýs a psov"), Int. J. Pharm. 97, 171-181, 1993). Obsahuje tiež makrofágy, ktoré eliminujú inhalované proteínové častice prostredníctvom fagocytózy. Tieto makrofágy migrujú k základni bronchiálneho stromu, odkiaľ sa dostávajú z pľúc prostredníctvom mechanizmu čistenia sliznice. Môžu potom migrovať do miazgovodu. Ďalej môže aerosolizovaný proteín ovplyvniť fyziológiu makrofágov, napríklad interferóny môžu aktivovať

alveolárne makrofágy. Migrácia aktivovaných makrofágov predstavuje ďalší mechanizmus pre rozširovanie systémového účinku inhalovaného proteínu. Zložitosť tohto procesu znamená, že výsledky pokusov s aerosólmi s jedným typom proteínu sa len obmedzene dajú prenášať na iný typ proteínu. Malé rozdiely medzi interferónmi môžu mať napríklad výrazný vplyv na ich citlivosť voči degradačným mechanizmom v pľúcach (pozri Bocci a kol., „Pulmonary catabolism of interferons: alveolar absorption of $^{125}$I labelled human interferon alpha is accompanied by partial loss of biological activity" (Pľúcny katabolizmus interferónov: alveolárna absorpcia $^{125}$I-značkovaného ľudského interferónu alfa je spojená s čiastočnou stratou biologickej aktivity", Antiviral Research 4, 211-220, 1984).

Proteíny a iné biologické makromolekuly sa síce v zásade dajú rozprašovať, ale toto rozprašovanie sa spravidla deje so stratou aktivity. Úlohou tohto vynálezu je dať k dispozícii spôsob vytvárania inhalovateľných aerosólov, ktorým sa dajú rozprašovať biologicky aktívne makromolekuly, najmä proteíny, bez podstatných strát aktivity.

Nová generácia rozprašovačov bez hnacieho plynu je opísaná v US patente 5 497 944, na ktorého obsah týmto odkazujeme. Zvláštnou výhodou tam opísaných rozprašovačov je to, že sa nepoužívajú hnacie plyny, najmä fluór-chlór-uhľovodíky

Ďalej rozvinutá forma uskutočnenia tam opísaných rozprašovačov je zverejnená v PCT/EP96/04351 = WO 97/12687. V súvislosti s predloženým vynálezom výslovne odkazujeme na tam opísaný obrázok 6 (Respimat®), ako aj na k nemu patriace časti opisu uvedenej prihlášky. Tam opísaný rozprašovač sa môže výhodne použiť na vytváranie inhalovateľných aerosólov podľa tohto vynálezu biologicky aktívnych makromolekúl. Opísaný rozprašovač sa môže použiť najmä na inhalačnú aplikáciu inzulínu. V dôsledku jeho vhodnej veľkosti môže pacient toto zariadenie vždy nosiť so sebou. Pri tam opísanom rozprašovači sa roztoky definovaného objemu (výhodne asi 15 mikrolitrov) s obsahom účinnej látky rozprašujú cez malé dýzy s použitím vysokých tlakov, takže vznikajú inhalovateľné aerosóly so strednou veľkosťou častíc medzi 3 a 10 mikrometrami. Na inhalačnú aplikáciu inzulínu sú vhodné rozprašovače, ktoré môžu rozprášiť medzi 10 a 50 mikrolitrami aerosólového prípravku na jedno použitie na inhalovateľné kvapôčky.

Zvláštny význam na vytváranie aerosólov podľa tohto vynálezu má použitie rozprašovača, opísaného vo vyššie uvedenom patente, resp. patentovej prihláške, na rozprašovanie roztokov s obsahom účinnej látky, ktoré obsahujú proteíny alebo iné biologicky aktívne makromolekuly, bez hnacieho plynu.

Tam zverejnený, ľahko ovládateľný rozprašovač (aerosólový rozprašovač, veľkosť asi 10 cm) pozostáva v podstate z horného dielu puzdra, puzdra čerpadla, dýzy, blokovacieho napínača, puzdra pružiny, pružiny a zásobnej nádržky, pričom ďalej obsahuje:

- puzdro čerpadla, ktoré je pripevnené v hornom diele puzdra a ktoré nesie na jednom svojom konci dýzové teleso s dýzou, resp. dýzovou zostavou,
- dutý piest s ventilovým telesom,
- hnanú prírubu, v ktorej je pripevnený dutý piest a ktorá sa nachádza v hornom diele puzdra,
- blokovací napínač, ktorý sa nachádza v hornom diele puzdra,
- puzdro pružiny s pružinou, ktorá sa v ňom nachádza, ktoré je otočne uložené na hornom diele puzdra prostredníctvom otočného uloženia,
- spodný diel puzdra, ktorý je v axiálnom smere nasadený na puzdro pružiny.

Dutý piest s ventilovým telesom WO 97/12687 zodpovedá jednému zo zverejnených zariadení. Čiastočne zasahuje do valca puzdra čerpadla a je vo valci usporiadaný axiálne posuvne. Odkazujeme najmä na obr. 1 až 4 – najmä na obr. 3 – a k nemu prislúchajúce časti opisu. Dutý piest s ventilovým telesom vyvíja na svojej vysokotlakovej strane v okamihu uvoľnenia pružiny tlak na tekutinu, teda odmerané množstvo roztoku účinnej látky, od 5 do 60 MPa (asi 50 až 600 bar), výhodne 10 až 60 MPa (asi 100 až 600 bar).

Ventilové teleso je výhodne umiestnené na konci dutého valca, ktorý je privrátený k dýzovému telesu.

Dýza v dýzovom telese je výhodne mikroštrukturovaná, t. j. je vyrobená mikrotechnikou. Mikroštrukturované dýzové telesá sú zverejnené napríklad vo WO-94/07607; týmto odkazujeme na obsah tohto spisu.

Dýzové teleso pozostáva napríklad z dvoch navzájom pevne spojených platní zo skla a/alebo kremíka, z ktorých najmenej jedna platňa vykazuje jeden

alebo viaceré mikroštrukturované kanály, ktoré spájajú vstupnú stranu dýzy s výstupnou stranou dýzy. Na výstupnej strane dýzy je umiestnený najmenej jeden okrúhly alebo neokrúhly otvor, ktorého priemer je menší alebo rovný 10 μm.

Smery prúdov z dýz v dýzovom telese môžu prebiehať navzájom rovnobežne alebo šikmo k sebe. Pri dýzovom telese s najmenej dvoma dýzovými otvormi na výstupnej strane môžu byť smery prúdov pod vzájomným uhlom od 20 do 160 stupňov, výhodne pod uhlom 60 až 150 stupňov. Smery prúdov sa stretajú v okolí dýzových otvorov.

Blokovací napínač obsahuje pružinu, výhodne valcovú skrutkovú tlačnú pružinu, ako zásobník mechanickej energie. Pružina pôsobí na hnanú prírubu ako skokový prvok, ktorého pohyb je určený polohou blokovacieho člena. Dráha hnanej príruby je presne obmedzená horným a spodným dorazom. Pružina sa výhodne napne cez silu prenášajúci prevod, napríklad cez skrutkový posuvný prevod, vonkajším krútiacim momentom, ktorý sa vyvíja pri otáčaní horného dielu puzdra voči puzdru pružiny v spodnom diele puzdra. V tomto prípade obsahuje horný diel puzdra a hnaná príruba jedno alebo viacchodový klinový prevod.

Blokovací člen so zasúvajúcimi sa blokovacími plochami je prstencovo usporiadaný okolo hnanej príruby. Pozostáva napríklad z radiálne elasticky deformovateľného krúžka z plastu alebo kovu. Krúžok je svojou rovinou usporiadaný kolmo na os rozprašovača. Po napnutí pružiny sa blokovacie plochy blokovacieho člena posunú do dráhy hnanej príruby a zabránia uvoľneniu pružiny. Blokovací člen sa uvoľní pomocou tlačidla. Uvoľňovacie tlačidlo je spojené alebo viazané s blokovacím členom. Na uvoľnenie blokovacieho napínača sa uvoľňovacie tlačidlo posunie rovnobežne s rovinou krúžka, a síce výhodne do rozprašovača; pritom sa deformovateľný krúžok zdeformuje vo svojej rovine. Konštrukčné detaily blokovacieho napínača sú opísané vo WO 97/20590.

Spodný diel puzdra sa v axiálnom smere posunie cez puzdro pružiny a zakryje ložisko, pohon vretena a zásobnú nádržku pre tekutinu.

Pri ovládaní rozprašovača sa horný diel puzdra otočí voči spodnému dielu puzdra, pričom spodný diel puzdra potiahne so sebou puzdro pružiny. Pritom sa pružina cez skrutkový posuvný prevod stlačí a napne a blokovacie zariadenie

samočinne zaskočí. Uhol otočenia je výhodne celočíselným zlomkom 360 stupňov, napríklad 180 stupňov. Súčasne s napnutím pružiny sa hnaný diel v hornom diele puzdra posunie o predpísanú dráhu, dutý piest sa vnútri valca v puzdre čerpadla stiahne späť, čím sa čiastočné množstvo tekutiny nasaje zo zásobnej nádržky do vysokotlakového priestoru pred dýzou.

Do rozprašovača sa môžu prípadne za sebou vsunúť a použiť viaceré vymeniteľné zásobné nádržky, obsahujúce tekutinu, ktorá sa má rozprášiť. Zásobná nádržka obsahuje vodný aerosólový prípravok podľa tohto vynálezu.

Proces rozprašovania sa začne ľahkým stlačením uvoľňovacieho tlačidla. Pritom blokovacie zariadenie uvoľní cestu hnanému dielu. Napnutá pružina zasunie piest do valca puzdra čerpadla. Tekutina vystúpi z dýzy rozprašovača v rozprášenej forme.

Ďalšie konštrukčné detaily sú zverejnené v PCT prihláškach WO 97/12683 a WO 97/20590, na ktorých obsah tu týmto odkazujeme.

Konštrukčné diely rozprašovača (aerosólového rozprašovača) sú z materiálu, ktorý je zodpovedajúco vhodný z hľadiska ich funkcie. Puzdro rozprašovača a – pokiaľ to ich funkcia dovoľuje – aj iné diely sú výhodne vyrobené z plastu, napríklad vstrekovacím odlievaním. Na medicínske účely sa používajú fyziologicky neškodné materiály.

Rozprašovač, opísaný vo WO 97/12687, sa napríklad používa na vytváranie medicínskych aerosólov bez hnacieho plynu. Tým sa dá vytvoriť inhalovateľný aerosól so strednou veľkosťou kvapôčok asi 5 µm.

Na obr. 4a/b, ktoré sú totožné s obr. 6a/b z WO 97/12687, je znázornený aerosólový rozprašovač (Respimat®), s ktorým sa dajú výhodne inhalovať vodné aerosólové prípravky podľa tohto vynálezu.

Obr. 4a znázorňuje pozdĺžny rez rozprašovačom pri napnutej pružine, obr. 4b znázorňuje pozdĺžny rez rozprašovačom pri uvoľnenej pružine.

Horný diel 51 obsahuje puzdro 52 čerpadla, na ktorého konci je umiestnený držiak 53 pre dýzu rozprašovača. V držiaku sa nachádza dýzové teleso 54 a filter 55. Dutý piest 57, ktorý je pripevnený v hnanej prírube 56 blokovacieho napínača,

čiastočne zasahuje do valca puzdra čerpadla. Dutý piest nesie na svojom konci ventilové teleso 58. Dutý piest je utesnený pomocou tesnenia 59. Vnútri horného dielu puzdra sa nachádza doraz 60, ku ktorému prilieha hnaná príruba pri uvoľnenej pružine. Pri hnanej prírube sa nachádza doraz 61, ku ktorému prilieha hnaná príruba pri napnutej pružine. Po napnutí pružiny sa blokovací člen 62 vsunie medzi doraz 61 a podperu 63 v hornom diele puzdra. Uvoľňovacie tlačidlo 64 je v spojení s blokovacím členom. Horný diel puzdra končí v náustku 65 a je uzavretý nasaditeľným ochranným viečkom 66.

Puzdro 67 pružiny s tlačnou pružinou 68 je pomocou zaskakovacieho palca 69 a otočného uloženia otočne uložený na hornom diele puzdra. Cez puzdro pružiny je nasunutý spodný diel 70 puzdra. Vnútri puzdra pružiny sa nachádza vymeniteľná zásobná nádržka 71 pre tekutinu 72, ktorá sa má rozprašovať. Zásobná nádržka je uzavretá zátkou 73, cez ktorú do zásobnej nádržky zasahuje dutý piest a svojím koncom sa ponára do tekutiny (zásoby roztoku účinnej látky).

Na plášťovej ploche puzdra pružiny je umiestnené vreteno 74 mechanického počítadla. Na konci vretena, ktorý je privrátený k hornému dielu puzdra, sa nachádza hnaný pastorok 75. Na vretene je umiestnený jazdec 76.

Vyššie opísaný aerosólový rozprašovač je vhodný na rozprašovanie aerosólových prípravkov podľa tohto vynálezu na aerosól, ktorý je vhodný na inhalovanie.

Účinnosť rozprašovacieho prístroja sa dá testovať v *in vitro* systéme, v ktorom sa rozprašuje proteínový roztok a hmla sa zachytáva v takzvanej „pasci" (pozri obr. 1). Aktivita proteínu v aerosólovej nádobke a sa porovnáva s aktivitou v zachytenej tekutine b, napríklad pomocou imunitného testu alebo pomocou testu na biologickú účinnosť proteínu. Tento pokus umožňuje posúdiť stupeň poškodenia proteínu rozprašovaním. Druhým parametrom kvality aerosólu je takzvaný inhalovateľný podiel, ktorý je tu definovaný ako podiel kvapôčok hmly so stredným mediánovým priemerom (MMAD) menším než 5,8 μm. Inhalovateľný podiel sa dá merať pomocou „Andersenovho impaktora". Pre dobrú absorpciu proteínu je dôležité nielen dosiahnuť rozprášenie bez podstatnej straty aktivity, ale vytvoriť aerosól s dobrým (asi 60 %) inhalovateľným podielom. Aerosóly s MMAD menším

než 5,8 μm sú výrazne vhodnejšie na dosiahnutie alveol, kde sú ich šance na to, aby boli absorbované, výrazne väčšie. Účinnosť rozprašovacieho prístroja sa dá testovať aj v *in vivo* systéme, pričom v tomto prípade hrajú úlohu faktory, ako je citlivosť na pľúcne proteázy. Ako príklad *in vivo* testovacieho systému sa môže psovi podať hmla, ktorá obsahuje proteín, cez tracheálny tubus. Vo vhodných časových odstupoch sa odoberú vzorky krvi a potom sa odmeria hladina proteínu v plazme imunologickými alebo biologickými metódami.

Vhodné rozprašovače sú opísané v už vyššie uvedených US patentovom spise 5 497 944 a WO 97/12687, najmä ako na obr. 6a/b (teraz 4a/b). Výhodná zostava dýz na rozprašovanie vodných aerosólových prípravkov biologicky aktívnych makromolekúl podľa tohto vynálezu je znázornená na obr. 8 uvedeného US patentového spisu.

Prekvapujúco sa zistilo, že vyššie opísaný aerosólový rozprašovač bez hnacieho plynu, ktorý rozpráši vopred stanovené množstvo – napríklad 15 mikrolitrov – aerosólového prípravku pod vysokým tlakom medzi 10 MPa a 50 MPa (100 a 500 bar) cez prinajmenšom jednu dýzu s hydraulickým priemerom 1 až 12 mikrometrov, takže vzniknú inhalovateľné kvapôčky so strednou veľkosťou častíc menšou než 10 mikrometrov, je dobre vhodný na rozprašovanie tekutých aerosólových prípravkov proteínov a iných makromolekúl, pretože môže rozprašovať širokú paletu proteínov bez významných strát aktivity. Výhodná pritom je zostava dýz, ako je uvedená na obr. 8 vyššie uvedeného US patentového spisu.

Zvlášť prekvapujúca je schopnosť aerosólových rozprašovačov s týmto druhom konštrukcie rozprašovať interferóny, ktoré sa ináč dajú rozprašovať len so značnou stratou aktivity. Ďalej je prekvapujúca zvlášť vysoká aktivita interferónu Omega po rozprášení týmto prístrojom, a to nielen pri *in vitro*, ale aj pri *in vivo* pokusoch.

Ďalšou výhodou nárokovaného spôsobu je jeho prekvapujúca vlastnosť, že môže rozprašovať aj vysoko koncentrované roztoky biologicky aktívnych makromolekúl bez podstatnej straty aktivity. Použitie vysoko koncentrovaných roztokov umožní použitie prístroja, ktorý je dostatočne malý na to, aby sa trvalo mohol pohodlne nosiť vo vrecku saka alebo v príručnej kabelke. Aerosólový rozprašovač,

zverejnený na obr. 4, spĺňa tieto predpoklady a umožňuje rozprašovanie vysoko koncentrovaných roztokov biologicky aktívnych molekúl.

Takéto prístroje sú napríklad zvlášť vhodné na to, aby diabetikom umožnili inhalačné samoošetrenie inzulínom. Výhodné sú vysoko koncentrované roztoky s koncentráciou od 20 do 90 mg/ml inzulínu, výhodnejšie sú roztoky s 30 až 60 mg/ml inzulínu a zvlášť výhodné sú roztoky inzulínu s 33 až 40 mg/ml inzulínu. Podľa veľkosti nádržky aerosólového rozprašovača, ktorá je k dispozícii, sú roztoky, ktoré obsahujú inzulín v koncentrácii väčšej než 25 mg/ml, výhodne väčšej než 30 mg/ml, vhodné, aby sa s ručným prístrojom, aký predstavuje vyššie opísané zariadenie, dalo inhalovať terapeuticky účinné množstvo inzulínu. Inhalačná aplikácia inzulínu umožňuje rýchly nástup účinku účinnej látky, takže pacient si napríklad môže sám aplikovať preň potrebné množstvo krátko pred jedlom. Malá veľkosť Respimat®-u napríklad umožňuje, aby pacient nosil prístroj stále pri sebe.

Respimat® (obr. 6 vo WO 97/12687) má dávkovaciu komoru s konštantným objemom, ktorá pacientovi umožňuje, aby si pre seba potrebnú dávku inzulínu určil počtom zdvihov (puffs) a inhaloval. Popri počte zdvihov je dávkovanie inzulínu určené koncentráciou inzulínového roztoku v zásobnej nádržke 72. Môže byť napríklad medzi 25 a 90 mg/ml, výhodné sú koncentrovanejšie roztoky od asi 30 mg/ml a viac.

Spôsoby prípravy vysoko koncentrovaných inzulínových roztokov sú napríklad opísané vo WO-prihláškach 83/00288 (PCT/DK82/00068) a 83/03054 (PCT/DK83/00024), na obsah ktorých týmto odkazujeme.

Aerosólové prípravky podľa tohto vynálezu, obsahujúce inzulín, ktoré sa aplikujú vyššie opísaným zariadením, by nemali prekročiť dynamickú viskozitu $1600.10^{-6}$ Pa.s, aby inhalovateľný podiel vytvorenej hmly neklesol pod prijateľnú hodnotu. Výhodné sú inzulínové roztoky, ktoré vykazujú hraničnú viskozitu do $1200.10^{-6}$ Pa.s (Pascal-sekunda). Ak je to potrebné, namiesto vody sa ako rozpúšťadlá môžu použiť zmesi rozpúšťadiel, aby sa viskozita roztoku liečiva znížila. To sa môže uskutočniť napríklad pridaním etanolu. Podiel etanolu vo vodnej formulácii môže byť napríklad 50 %, výhodný je podiel 30 %.

Aerosólový prípravok vykazuje výhodne viskozitu do $1600.10^{-6}$ Pa.s, pričom oblasť od 900 do $1100.10^{-6}$ Pa.s je zvlášť výhodná.

Výhodné sú ďalej aerosólové prípravky, ktorých vodné roztoky vykazujú viskozitu medzi 900 a $1600.10^{-6}$ Pa.s, pričom vodné roztoky s viskozitou v oblasti od 950 do $1300.10^{-6}$ Pa.s sú zvlášť výhodné.

Ďalšou úlohou predloženého vynálezu je navrhnúť vhodný aerosólový prípravok, ktorý je vhodný na použitie v nárokovanom spôsobe.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je vodný aerosólový prípravok na aplikáciu inhaláciou vo forme vodných roztokov, ktoré obsahujú ako účinnú látku biologicky aktívne makromolekuly, najmä proteín alebo peptid, v množstve medzi 3 mg/ml a 100 mg/ml, výhodne medzi 25 a 100 mg/ml.

Prekvapujúco sa ukázalo, že spôsobom podľa tohto vynálezu, sa dajú rozprašovať aj vysoko viskózne roztoky makromolekúl na inhalovateľné kvapôčky s vhodnou veľkosťou kvapôčok. To umožňuje aplikáciu väčších množstiev účinnej látky na jedno použitie a tým zvyšuje terapeutickú účinnosť makromolekúl pri inhalačnej terapii.

V spôsobe podľa tohto vynálezu sa môžu použiť vodné aerosólové prípravky, obsahujúce makromolekuly (napríklad albumín), až do viskozity $1600.10^{-6}$ Pa.s (merané pri 25 °C). Pri viskozite $1500.10^{-6}$ Pa.s sa ešte zistil inhalovateľný podiel 32 %.

Výhodné sú viskóznejšie roztoky makromolekúl, ktoré vykazujú viskozitu do $1100.10^{-6}$ Pa.s. Pri takýchto roztokoch sa dosiahne inhalovateľný podiel kvapôčok, obsahujúcich účinnú látku, asi 60 %. Uvedené hraničné viskozity sa určili Ostwaldovým viskozimetrom metódou, ktorá je známa z literatúry. Na porovnanie je viskozita vody $894.10^{-6}$ Pa.s (merané pri 25 °C).

Na ilustráciu výhod spôsobu podľa tohto vynálezu v ďalšom opíšeme *in vitro* a *in vivo* pokusy s roztokom interferónu Omega.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obr. 1 je znázornený aerosolový rozprašovač Respimat®.

Na obr. 2 sú znázornené merania interferónu Omega (a) s imunitným testom (ELISA) alebo (b) s biologickým testom (antivírusová aktivita) pes č. 95-1467.

Na obr. 3 je znázornený graf uvoľňovania neopterínu v plazme po podaní aerosólu alebo i. v. interferónu Omega – pes č. 95-1467.

Obr. 4a znázorňuje pozdĺžny rez rozprašovačom (Respimat®) pri napnutej pružine, obr. 4b znázorňuje pozdĺžny rez rozprašovačom (Respimat®) pri uvoľnenej pružine.

Na obr. 5 je znázornený graf, ktorý znázorňuje množstvo glukózy v krvi po podaní inzulínu Respimat-om – pes č. 95-1479.

Príklady uskutočnenia vynálezu

*In vitro* pokusy s Respimat®-om a interferónom Omega

Tieto pokusy sa robili v prístroji Respimat® znázornenom na obr. 1, ktorý pozostáva zo zásobnej nádržky a na tekutinu, z pasci c, spekanej sklenenej frity e a spojovacieho kusa d. Zásobná nádržka a prístroja Respimat sa naplnila roztokom s 5 mg/ml interferónu Omega (formulované v 50 mM citranu trojsodného, 150 mM NaCl, pH 5,5). Prístroj sa aktivoval a rozprášil sa objem asi 12,9 µl (jeden zdvih) v prúde vzduchu 28 l/min.. Rozprášený roztok b sa zachytil v pasci (obr. 1). Interferón Omega sa v roztoku v zásobnej nádržke a v roztoku, zachytenom v pasci, stanovil pomocou ELISA a biologicky, inhibíciou poškodenia buniek A549, infikovaných encefalomyocarditis vírusom. Imunologické stanovenie interferónu je pomerne jednoduché. Publikované pokusy s rozprášenými proteínmi sa vo viacerých prípadoch obmedzujú na imunologické merania. Dodatočné biologické merania sú však veľmi dôležité, pretože sú zvlášť citlivou a terapeuticky významnou metódou kvantifikovania poškodenia proteínov. Nedávajú vždy rovnaké výsledky ako

fyzikálnochemické alebo imunologické metódy, pretože molekula môže stratiť biologické schopnosti bez toho, aby sa jej väzba na protilátky zmenila.

V troch pokusoch sa, vztiahnuté na východiskový roztok, opätovne zistilo 84 %, 77 % a 98 % imunologicky identifikovateľného interferónu v roztoku b z pasce. Biologické merania s tými istými roztokmi poskytli 54 %, 47 % a 81 % opätovne zisteného biologicky identifikovateľného interferónu v prípade roztoku z pasce. Tento veľmi vysoký podiel ukazuje, že rozprašovanie pomocou prístroja Respimat naruší len malú časť aktivity interferónu. Hmla z prístroja Respimat, ako sme vyššie opísali, sa zaviedla aj do Andersenovho impaktora pomocou prúdu vzduchu (28 l/min.). Meral sa podiel častíc s veľkosťou menšou než 5,8 µm („inhalovateľný podiel"). Inhalovateľný podiel zodpovedal 70 % (imunologické merania). Proteíny, ako interferóny, sa často formulujú s albumínom z ľudského séra, aby sa poskytla ďalšia ochrana pre citlivé interferóny. Testovala sa tiež jedna formulácia ako vyššie, ale s dodatočným albumínom z ľudského séra (0,5 %). V troch pokusoch sa, taktiež vztiahnuté na východiskový roztok, opätovne získalo 83 %, 83 % a 79 % imunologicky identifikovateľného interferónu v roztoku b z pasce. Biologické merania s tými istými roztokmi poskytli 60 %, 54 % a 66 % biologicky aktívneho interferónu v roztoku z pasce. Inhalovateľný podiel (imunologické merania) bol 67 %. V ďalšej várke sa koncentrovaný roztok interferónu Omega s koncentráciou 53 mg/ml naplnil do zásobnej nádržky prístroja Respimat a následne sa rozprášil. V štyroch pokusoch sa, vztiahnuté na východiskový roztok, opätovne zistilo 100 %, 60 %, 68 % a 72 % imunologicky identifikovateľného interferónu v roztoku b z pasce. Biologické merania s tými istými roztokmi poskytli 95 %, 98 %, 61 % a 83 % opätovne zisteného, biologicky identifikovateľného interferónu v roztoku z pasce. Tieto vysoké opätovné nálezy ukazujú, že pomocou prístroja Respimat sa dajú rozprašovať aj koncentrované proteínové roztoky bez toho, aby dochádzalo k nadmerným stratám aktivity interferónu.

*In vivo* pokusy s Respimat®-om a interferónom Omega

Interferón Omega sa inhalačne a intravenózne aplikoval tomu istému psovi. Imunologicky a biologicky sa merali hladiny interferónu v krvi v rozličných časových okamihoch. Ďalej sa merala hladina neopterínu v krvi. Neopterín je marker aktivácie imunity; uvoľňujú ho makrofágy po podráždení interferónom (pozri Fuchs a kol., „Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions" (Neopterín, biochemické a klinické použitie ako markera pre bunkové imunitné reakcie"), Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 101, 1-6, 1993). Meranie hladiny neopterínu slúži na kvantifikovanie účinnosti interferónu.

Aplikácia interferónu psovi sa uskutočnila pod pentobarbitalovou narkózou po predchádzajúcom podaní základných sedatív. Zviera sa intubovalo a zaviedlo sa umelé dýchanie (objemovo kontrolované dýchanie: minútový objem 4 l/min., frekvencia 10 zdvihov/min.). Podalo sa celkove 20 zdvihov z prístroja Respimat. Každý zdvih sa aplikoval na začiatku vdychu. Po fáze vdychu bola 5-sekundová prestávka pred výdychom. Pred nasledujúcou aplikáciou interferónu Omega sa zvieraťu umožnili dva dýchacie cykly bez ovplyvnenia. Krv na sérum a heparínovú plazmu sa odobrala pred aplikáciou interferónu a v rôznych časových okamihoch až do 14 dní po aplikácii interferónu. Interferón Omega sa v heparínovej plazme stanovil imunologicky pomocou ELISA a biologicky inhibíciou poškodenia buniek A549, infikovaných encefalomyocarditis vírusom. Neopterín v sére sa stanovil imunologicky. Obr. 2 znázorňuje imunologicky (obr. 2a) a biologicky (obr. 2b) namerané hladiny interferónu Omega po dávke 20 zdvihov interferónu Omega z prístroja Respimat. Prekvapujúco sa po inhalačnom podaní namerala veľmi vysoká hladina neopterínu v sére. V *in vitro* pokuse zodpovedalo vynesené množstvo roztoku po jednom zdvihu prístroja Respimat v priemere 12,8 mg/zdvih. Preto sa dá očakávať, že pri roztoku s 5 mg/ml sa 20 zdvihmi Respimatu dodá asi 1,28 mg interferónu. Merania neopterínu po podaní tohto množstva poskytli výrazne vyššie a dlhšie trvajúce hladiny než merania neopterínu po podaní 0,32 mg interferónu i. v.. Tento výsledok ilustruje obr. 3. Vysoké hladiny neopterínu slúžia ako dôkaz, že aplikácia interferónu Respimatom môže viesť k dobrej biologickej účinnosti.

Výhody prístroja Respimat na rozprašovanie biologicky aktívnych makromolekúl sa neobmedzujú len na interferóny, ako ukazuje druhý príklad.

*In vitro* pokusy s Respimat®-om a mangánsuperoxiddismutázou

Prístroj na rozprašovanie testovacej látky a k tomu prislúchajúca pasca boli také, ako je znázornené na obr. 1. V tomto pokuse sa zásobná nádržka a prístroja Respimat naplnila 3,3 mg/ml mangánsuperoxiddismutázou (MnSOD) vo fosfátom pufrovanom soľnom roztoku (PBS). Prístroj sa aktivoval a objem asi 13 µl (jeden zdvih) sa rozprášil v prúde vzduchu 28 l/min.. Presné rozprášené množstvo sa stanovilo gravimetricky (merania v troch po sebe nasledujúcich pokusoch: 12,8, 13,7 a 14,3 mg). Rozprášený roztok sa zachytil v pasci b. Obsah tejto pasce bol 20 ml PBS. Dodatočne sa pridali 2 ml 5% albumínu z hovädzieho séra, aby sa proteíny v pasci stabilizovali. MnSOD sa stanovila v roztoku zo zásobnej nádržky a v roztoku, zachytenom v pasci, imunologicky pomocou ELISA a enzymaticky znížením množstva superoxidu po xantín/xantín-oxidázovej reakcii. V troch pokusoch sa nameralo 78 %, 89 % a 83 % imunologicky identifikovateľnej MnSOD rozprášeného roztoku v roztoku b z pasce. Po rozprášení sa nezistila žiadna merateľná strata enzymatickej aktivity. Inhalovateľný podiel (imunologické merania) bol 61 %.

V nasledujúcom príklade opíšeme prípravu aerosólového prípravku podľa tohto vynálezu, ktorý obsahuje ako účinnú látku inzulín.

Príprava inzulínového roztoku a plnenie rozprašovača

175 mg kryštalického inzulínu (sodná soľ) z dobytka (zodpovedajúce 4462,6 I.U. podľa údajov výrobcu) sa rozpustilo v 3,5 ml sterilnej, vyčistenej vody (Seralpur®-voda). Potom sa za ľahkého miešania pridalo 8,5 µl *m*-krezolu (zodpovedajúce 8,65 mg) a 7,53 mg fenolu, rozpusteného v 100 µl sterilnej, vyčistenej vody. K tomuto roztoku sa pridalo 365 µl 5 mg/ml roztoku $ZnCl_2$ (zodpovedajúce hmotnostnému podielu 0,5 % zinku, vztiahnuté na použité množstvo inzulínu) a pH hodnota sa nastavila na 7,4 pomocou 0,2 N NaOH. Objem zmesi sa doplnil na 5 ml sterilnou, vyčistenou vodou a prefiltroval sa cez sterilný

Milipore filter (veľkosť pórov 0,22 μm). 4,5 ml tohto aerosólového prípravku sa previedlo do zásobnej nádržky (72 na obr. 4) aerosólového rozprašovača (Respimat). Nádržka sa zatvorila viečkom a vložila sa do zariadenia.

Takto vyrobený aerosólový prípravok vykazuje koncentráciu asi 35 mg/ml inzulínu, pričom viskozita tohto roztoku je asi $1020.10^{-6}$ Pa.s.

*In vivo* pokus s Respimat®-om a vysoko koncentrovaným roztokom inzulínu

Aplikácia inzulínu u psa sa uskutočnila pod pentobarbitalovou narkózou po predchádzajúcom podaní základných sedatív. Zviera sa intubovalo a zaviedlo sa umelé dýchanie ako predtým. Podalo sa celkove 6 zdvihov inzulínového roztoku z prístroja Respimat. Každý zdvih sa aplikoval na začiatku vdychu. Medzi fázou vdychu a výdychom bola prestávka 5 sekúnd. Pred nasledujúcou aplikáciou inzulínu sa zvieraťu umožnili dva dýchacie cykly bez ovplyvnenia. Krv sa odobrala 1 hodinu pred aplikáciou, súčasne s aplikáciou a v rôznych časových okamihoch potom v priebehu 8 hodín. Hladina glukózy v krvi sa merala v čerstvej krvi metódou autorov Trasch, Koller a Tritschler (Klein. Chem. 30, 969, 1984) pomocou prístroja Refletron® (Boehringer Mannheim). Prekvapujúco sa aj s týmto vysoko koncentrovaným roztokom inzulínu zistila dobrá biologická účinnosť (pokles hladiny glukózy v krvi po inhalačnom podaní inzulínu). Obr. 5 ilustruje tento výsledok.

Vodné aerosólové prípravky podľa tohto vynálezu môžu, ak je to potrebné, popri účinnej látke a vode obsahovať ďalšie rozpúšťadlá – ako napríklad etanol. Množstvo etanolu bude v závislosti od vlastností rozpustnosti účinných látok obmedzené tým, že pri príliš vysokých koncentráciách môže účinná látka z aerosólového prípravku vypadávať. Prísady na stabilizovanie roztoku, ako napríklad farmakologicky neškodné konzervačné prostriedky, ako napríklad etanol, fenol, krezol alebo parabén, farmakologicky prijateľné kyseliny, zásady alebo pufre na nastavenie pH hodnoty, alebo povrchovoaktívne látky, sú možné. Okrem toho je na stabilizovanie roztoku alebo na zlepšenie kvality aerosólu možné pridať prísady na tvorbu chelátov kovov – ako napríklad EDTA. Na zlepšenie rozpustnosti a/alebo

stability účinnej látky v aerosólovom prípravku sa môžu pridať aminokyseliny, ako je kyselina asparágová, kyselina glutámová (asparagín, glutamín) a najmä prolín.

Naviac k interferónom, superoxiddismutáze a inzulínu nasledujúce účinné látky stelesňujú výhodné účinné látky prípravku liečiva podľa tohto vynálezu:

antisense oligonukleotidy,

orexíny,

erytropoetín,

tumornekrotický faktor alfa,

tumornekrotický faktor beta,

G-CSF („Faktor stimulujúci granulocytové kolónie),

GM-CSF („Faktor stimulujúci granulocytové makrofágové kolónie),

anexín,

kalcitonín,

leptín,

parathormón,

fragment parathormónu,

interleukíny, ako napríklad interleukín 2, interleukín 10, interleukín 12,

rozpustná ICAM („Medzibunková adhézna molekula),

somatostatín,

somatotropín,

tPA („Aktivátor tkanivového plazminogénu),

TNK-tPA,

s tumormi asociované antigény (ako peptid, proteín alebo ako DNA),

peptidové bradykinínové antagonisty,

urodilatín,

GHRH (Hormón, uvoľňujúci rastový hormón),

CRF (Faktor, uvoľňujúci kortikotropín),

EMAP II,

heparín,

rozpustné interleukínové receptory, ako je sIL-1 receptor,

očkovacie látky, ako je vakcína proti hepatitíde alebo vakcína proti osýpkam,

PV 150-2000



# PATENTOVÉ NÁROKY

1. Vodný aerosólový prípravok na aplikáciu inhaláciou, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že v koncentrácii od 25 do 100 mg/ml obsahuje účinnú látku, ktorá je zvolená zo skupiny:

antisense oligonukleotidy,

orexíny,

erytropoetín,

tumornekrotický faktor alfa,

tumornekrotický faktor beta,

Faktor stimulujúci granulocytové kolónie - G-CSF

Faktor stimulujúci granulocytové makrofágové kolónie - GM-CSF

anexín,

kalcitonín,

leptín,

parathormón,

fragment parathormónu,

interleukíny, ako napríklad interleukín 2, interleukín 10, interleukín 12,

Medzibunková adhézna molekula - rozpustná ICAM

somatostatín,

somatotropín,

Tkanivový plazminogénový aktivátor - tPA

TNK-tPA,

s tumormi asociované antigény, napríklad peptid, proteín alebo ako DNA,

peptidové bradykinínové antagonisty,

urodilatín,

Hormón uvoľňujúci rastový hormón - GHRH

Faktor uvoľňujúci kortikotropín - CRF

EMAP II,

heparín,

rozpustné interleukínové receptory, ako je sIL-1 receptor,

očkovacie látky, ako je vakcína proti hepatitíde alebo vakcína proti osýpkam,
antisense polynukleotidy,
transkripčné faktory,
pričom koncentrácia faktora stimulujúceho granulocytové kolónie - G-CSF nie je 25 mg/ml.

2. Vodný aerosólový prípravok podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že účinnou látkou je inzulín.

3. Vodný aerosólový prípravok podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že účinnou látkou je inzulín v koncentrácii väčšej než 30 mg/ml.

4. Vodný aerosólový prípravok podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že účinnou látkou je superoxiddismutáza.

5. Vodný aerosólový prípravok podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že účinnou látkou je interferón.

6. Vodný aerosólový prípravok podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že účinnou látkou je interferón Omega.

7. Vodný aerosólový prípravok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje jednu alebo viaceré pomocné látky zo skupiny, ktorú tvoria povrchovoaktívne látky, ako sú surfaktanty, emulgátory, stabilizátory, látky na zlepšenie permeácie a/alebo konzervačné látky.

8. Vodný aerosólový prípravok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje aminokyselinu.

9. Vodný aerosólový prípravok podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje prolín, kyselinu asparágovú alebo kyselinu glutámovú na zlepšenie rozpustnosti alebo stability účinnej látky.

10. Vodný aerosólový prípravok podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že pri 25 °C má viskozitu do $1600.10^{-6}$ Pa.s.

11. Vodný aerosólový prípravok podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že pri 25 °C má viskozitu medzi $900.10^{-6}$ a $1100.10^{-6}$ Pa.s.

12. Vodný aerosólový prípravok na inhalačnú aplikáciu, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že pri 25 °C má viskozitu medzi $900.10^{-6}$ a $1600.10^{-6}$ Pa.s a obsahuje účinnú látku, zvolenú zo skupiny, ktorú tvoria:

antisense oligonukleotidy,
orexíny,
erytropoetín,
tumornekrotický faktor alfa,
tumornekrotický faktor beta,
G-CSF,
GM-CSF,
anexín,
kalcitonín,
leptín,
parathormón,
fragment parathormónu,
interleukíny, ako napríklad interleukín 2, interleukín 10, interleukín 12,
rozpustná ICAM,
somatostatín,

somatotropín,

tPA,

TNK-tPA,

s tumormi asociované antigény ako napríklad peptid, proteín alebo ako DNA,

peptidové bradykinínové antagonisty,

urodilatín,

GHRH,

CRF,

EMAP II,

heparín,

rozpustné interleukínové receptory, ako je sIL-1 receptor,

očkovacie látky, ako je vakcína proti hepatitíde alebo vakcína proti osýpkam,

antisense polynukleotidy,

transkripčné faktory,

pričom koncentrácia G-CSF nie je 25 mg/ml.

13. Vodný aerosólový prípravok podľa nároku 12, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že pri 25 °C má viskozitu medzi $950.10^{-6}$ a $1300.10^{-6}$ Pa.s.

14. Vodný aerosólový prípravok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 12 alebo 13, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že účinnou látkou je inzulín.

15. Vodný aerosólový prípravok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 12 alebo 13, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že účinnou látkou je superoxiddismutáza.

16. Vodný aerosólový prípravok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 12 alebo 13, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že účinnou látkou je interferón.

17. Vodný aerosólový prípravok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 12 alebo 13, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že účinnou látkou je interferón Omega.

18. Spôsob vytvárania aerosólov na inhalačnú aplikáciu aerosólového prípravku podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 17, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že v rozprašovači bez hnacieho plynu sa rozpráši terapeuticky účinné množstvo aerosólového prípravku, odmerané v meracej komore a pod vysokým tlakom medzi 10 MPa a 50 MPa cez najmenej jednu dýzu s hydraulickým priemerom 1 až 12 mikrometrov na inhalovateľné kvapôčky so strednou veľkosťou častíc menšou než 10 mikrometrov v priebehu času medzi jednou a dvoma sekundami.

19. Spôsob podľa nároku 18, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že účinné množstvo jednotlivej dávky je medzi 10 a 20 mikrolitrami.

20. Spôsob podľa nároku 19, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že aerosólový rozprašovač má dve dýzy, ktoré sú nasmerované tak, aby sa oba prúdy stretli tak, že sa aerosólový prípravok rozpráši.

21. Spôsob rozprašovania inzulínu na liečenie cukrovky na aerosól, vhodný na inhalovanie, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa rozpráši 10 až 50 mikrolitrov roztoku, ktorý obsahuje medzi 20 mg/ml a 90 mg/ml inzulínu, s použitím rozprašovača v jedinom použití na inhalovateľné kvapôčky.

22. Spôsob podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa inhaluje medzi 10 a 20 mikrolitrami roztoku, ktorý obsahuje medzi 25 a 60 mg/ml inzulínu.

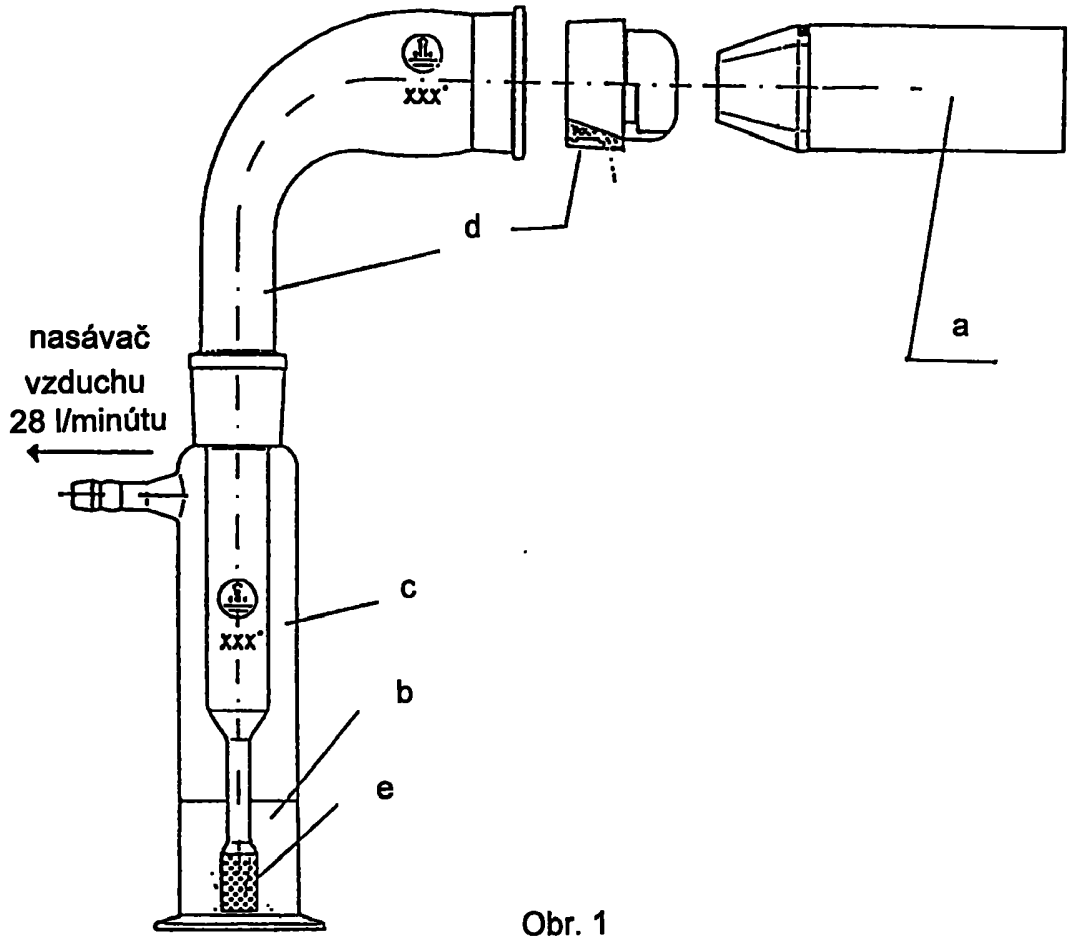
23. Použitie roztoku, ktorý obsahuje viac než 30 mg/ml inzulínu, na inhalačné liečenie cukrovky, na vytváranie aerosólu so strednou veľkosťou častíc pod 10 mikrometrov.

24. Použitie roztoku, ktorý obsahuje medzi 25 a 60 mg/ml inzulínu na inhalačné liečenie cukrovky, na vytváranie aerosólu so strednou veľkosťou častíc pod 10 mikrometrov.

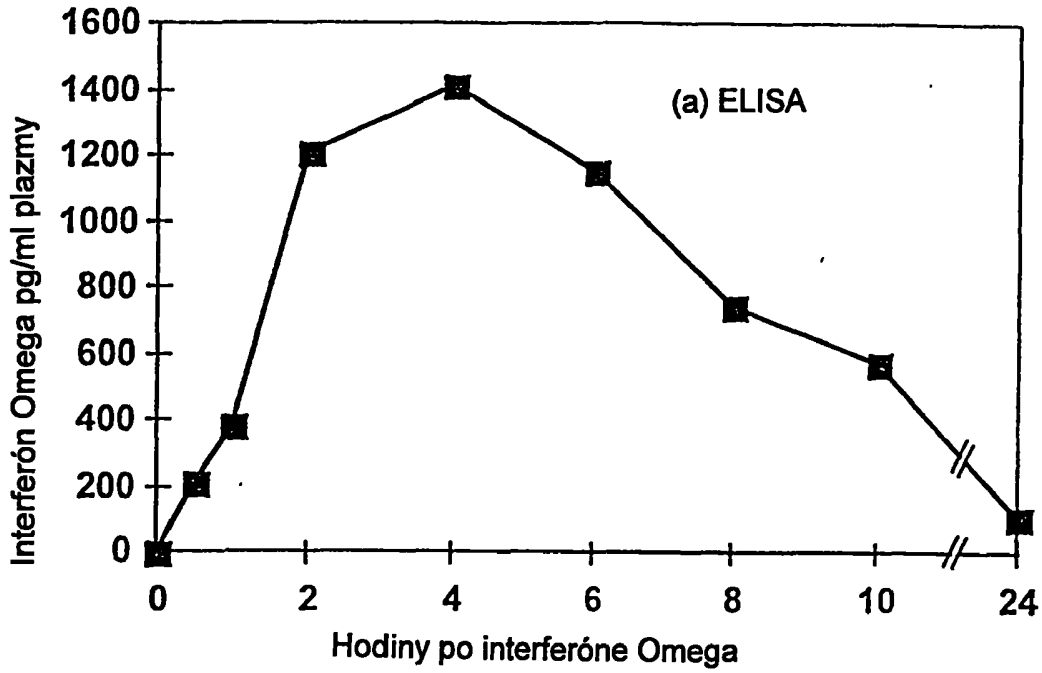
25. Použitie roztoku podľa nároku 23 alebo 24, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že aerosól sa vyrobí z 10 až 50 mikrolitrov, výhodne z 10 až 20 mikrolitrov roztoku s použitím aerosólového rozprašovača bez hnacieho plynu.

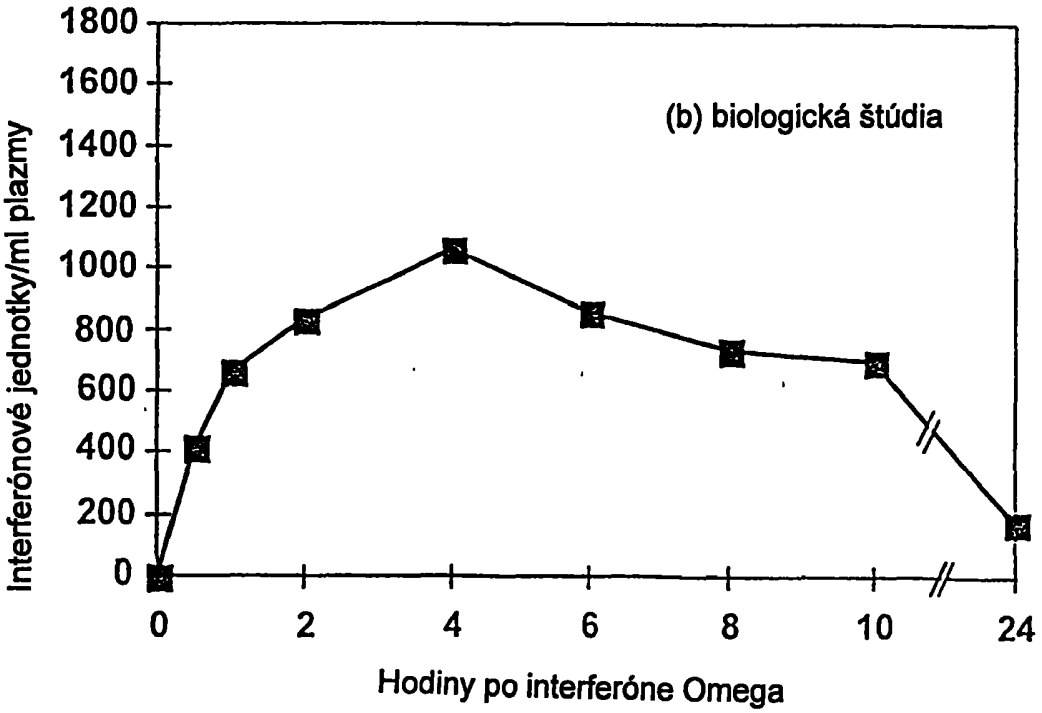
PV 150 - 200.



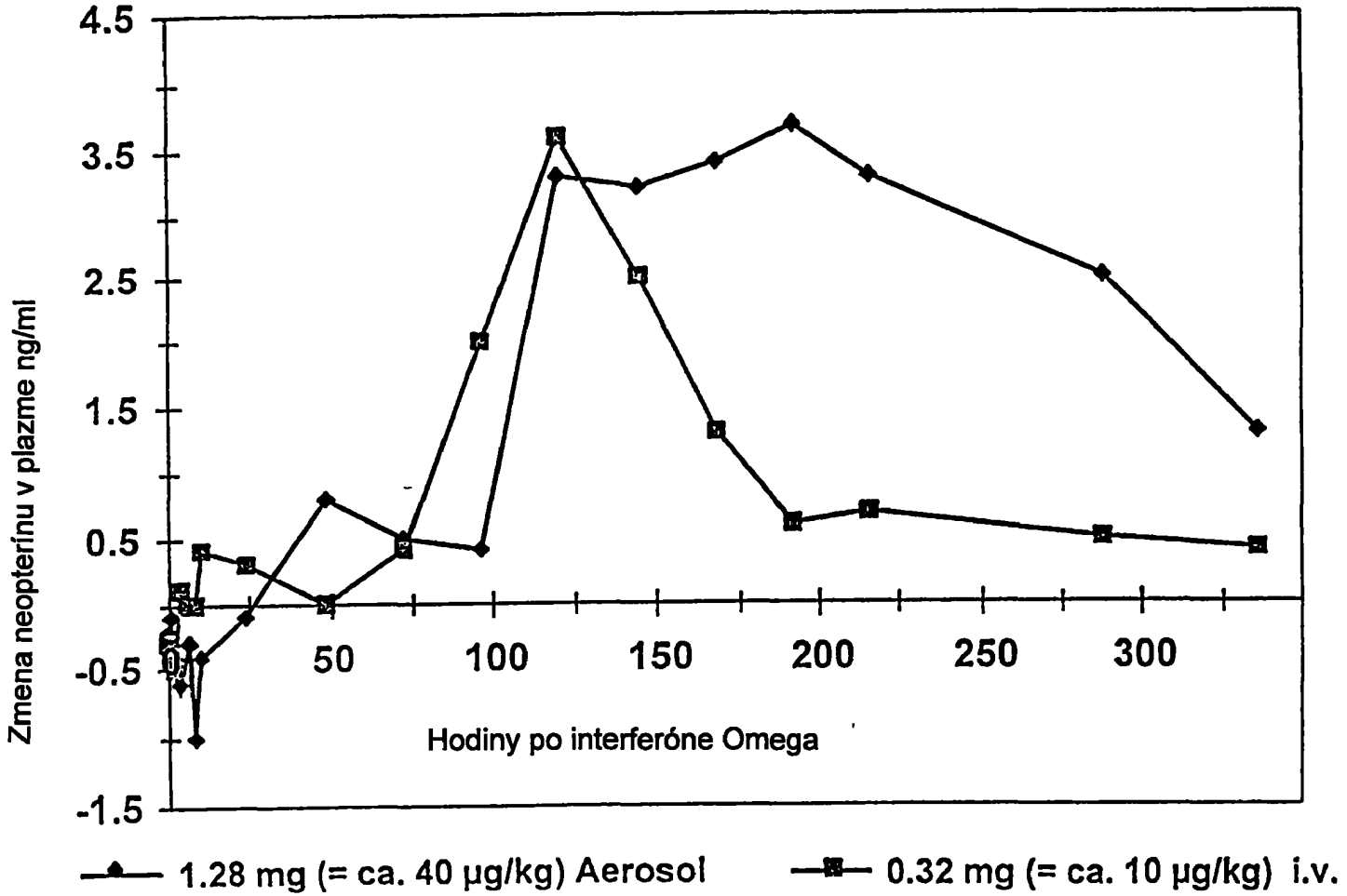



Obr. 1

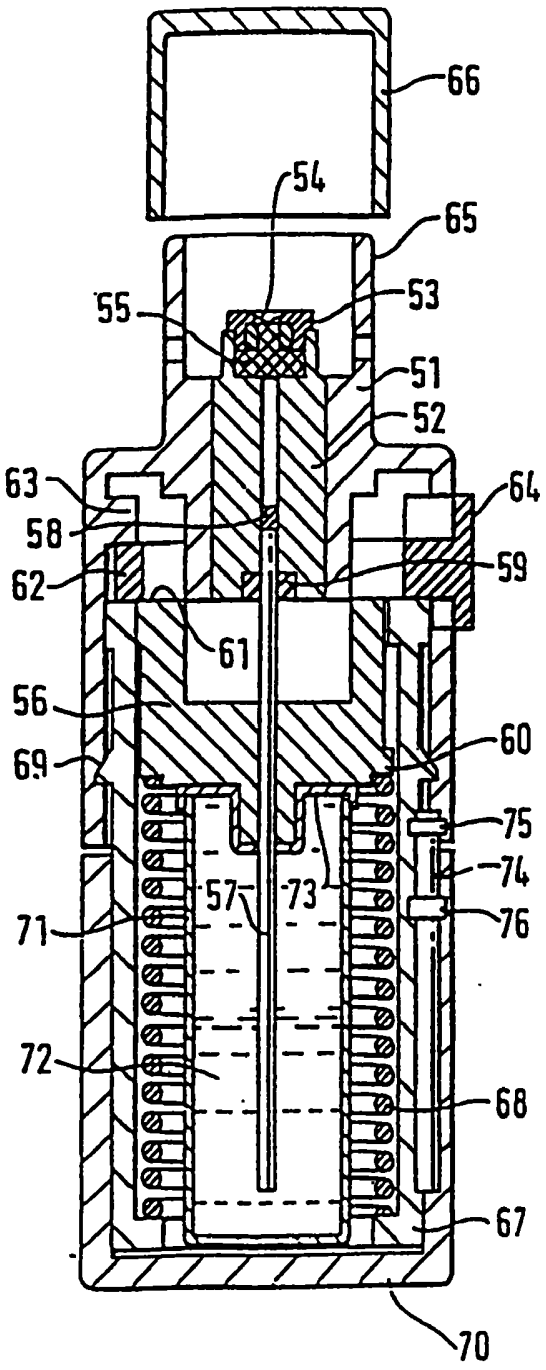

(a) ELISA
Interferón Omega pg/ml plazmy
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
24
Hodiny po interferóne Omega


(b) biologická štúdia
Interferónové jednotky/ml plazmy
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
24
Hodiny po interferóne Omega

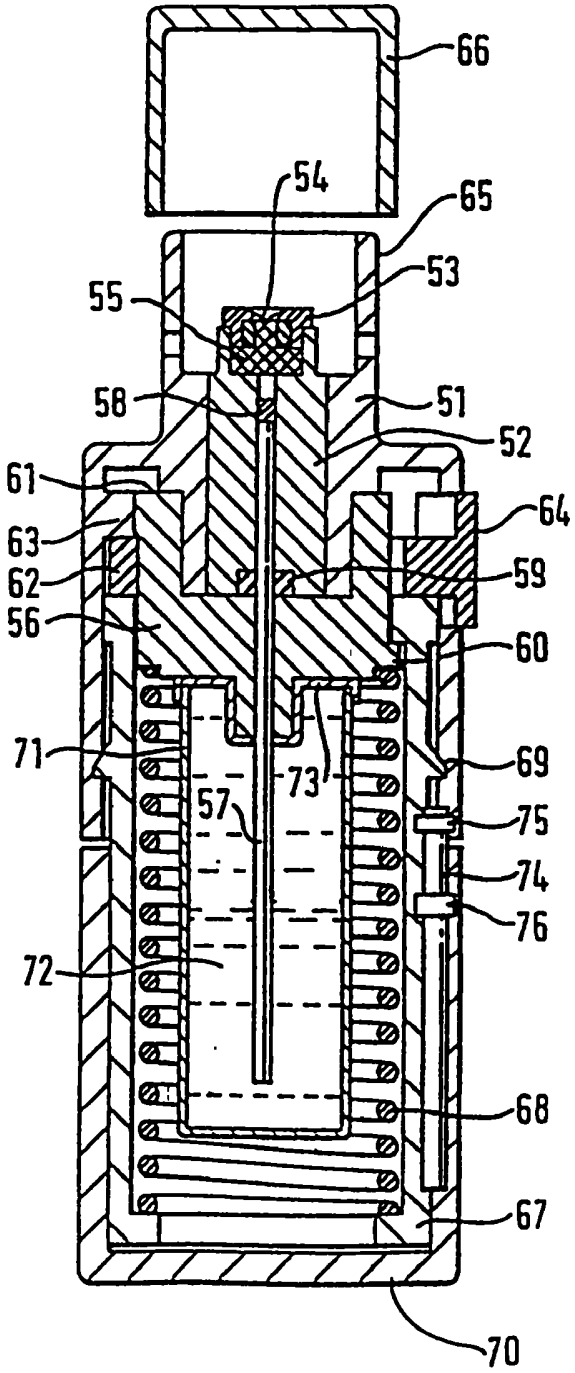
Obr. 2


4.5
3.5
2.5
1.5
0.5
-0.5
-1.5
50
100
150
200
250
300
Zmena neopterínu v plazme ng/ml
Hodiny po interferóne Omega
1.28 mg (= ca. 40 µg/kg) Aerosol
0.32 mg (= ca. 10 µg/kg) i.v.

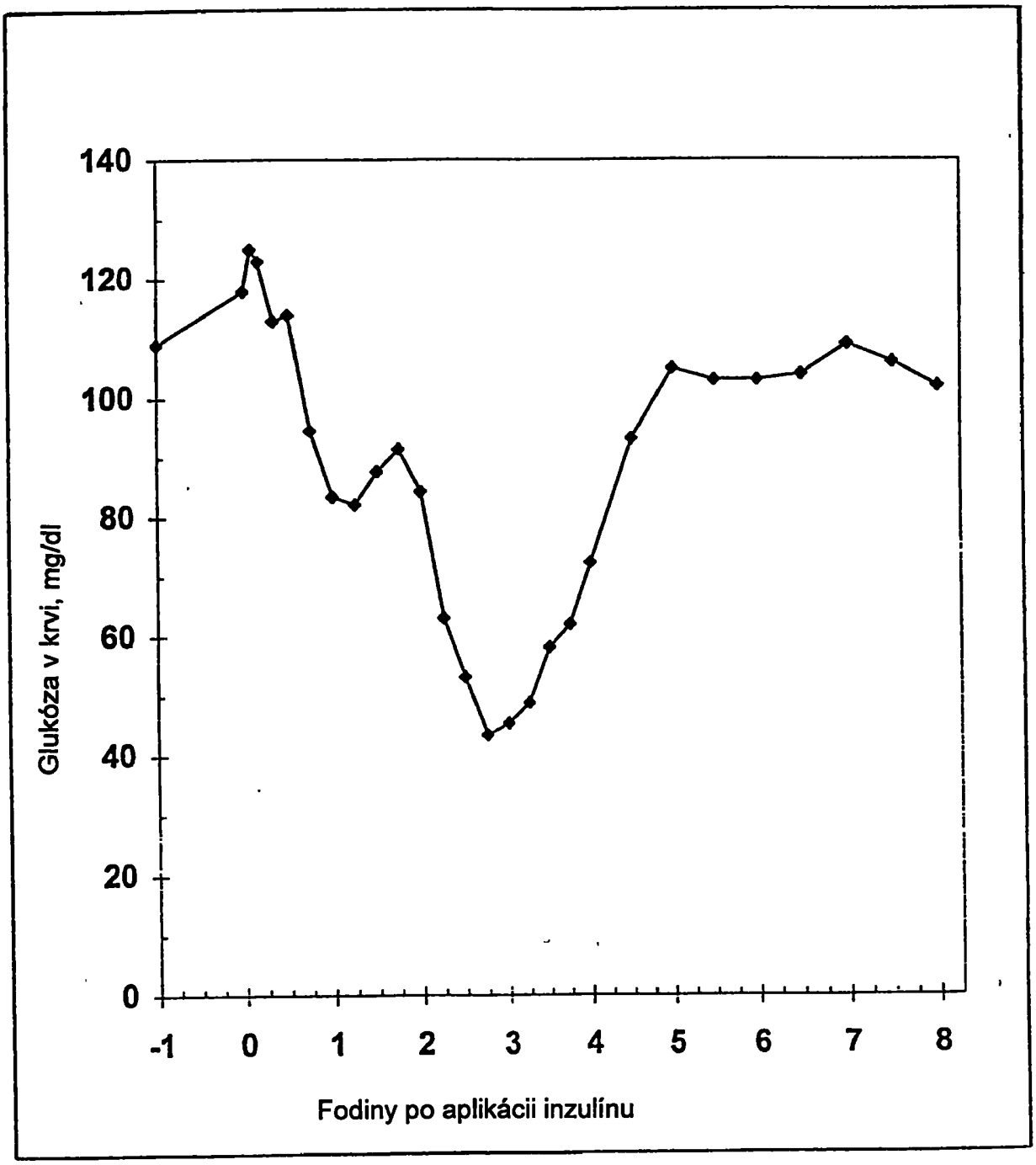
Obr. 3


66
54
65
55
53
51
52
63
64
58
59
62
61
56
60
69
75
74
57
73
71
76
72
68
67
70

Obr. 4a


66
54
65
53
55
58
51
52
61
64
63
59
62
56
60
71
69
73
57
75
74
76
72
68
67
70

Obr. 4b


140
120
100
80
60
40
20
0
Glukóza v krvi, mg/dl
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Fodiny po aplikácii inzulínu

Obr. 5