



F1000097444B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGNINGSSKRIFT

97444

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 27 12 1996

(51) Kv.1k.6 - Int.c1.6

A 61K 9/16, 9/72

(21) Patentihakemus - Patentansökning

895555

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

21.11.89

(24) Alkupäivä - Löpdag

20.05.88

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

21.11.89

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad

13.09.96

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/GB88/00396

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

22.05.87 GB 8712176 P

(71) Hakija - Sökande

1. Danbiosyst UK Limited, Unit 24, Heathcoat Building, Highfields Science Park,
University Boulevard, Nottingham, United Kingdom, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Illum, Lisbeth, 19 Cavendish Crescent North, The Park, Nottingham NG7 1BA,
United Kingdom, (GB)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä lääkkeenantojärjestelmän valmistamiseksi
Förfarande för framställning av ett läkemedelsavgivande system

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Lääkkeenantojärjestelmä, joka käsittää suuren joukon mikropalloshiukkasia, jotka sisältävät vaikuttavan lääkkeen ja pinta-aktiivisen aineen liittyneenä kuhunkin hiukkaseen, jolla pinta-aktiivisella aineella on ominaisuus parantaa aktiivisen lääkkeen ottoa.

Läkemedelsförmedlingssystem omfattande en pluralitet mikrosfärpartiklar innehållande ett aktivt läkemedel och innehållande ett ytaktivt ämne associerat med var och en av partiklarna, vilket ytaktiva material har egenskapen att förbättra mottagning av det aktiva läkemedlet.

Menetelmä lääkkeenantojärjestelmän valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av ett läkemedelsavgivande system

5 Keksintö koskee menetelmää limakalvon läpi tapahtuvaan antoon tarkoitettun lääkkeenantojärjestelmän valmistamiseksi, joka järjestelmä parantaa aktiivisen lääkeaineen vastaanottoa, erityisesti suurimolekyylipainoisten materiaalien, erityisesti nenäontelosta.

10

Viitataan teknisiin julkaisuihin ja muihin tämän alueen julkaisuihin, jotka esitetään selitysmielessä.

EP-patenttihakemuksissa 023359 ja 122023 kuvataan jauhemainen
15 farmaseuttinen valmiste annettavaksi nenän limakalvoon, ja menetelmiä sen antoon. Farmaseuttinen valmiste mahdollistaa polypeptidien ja niiden johdannaisten tehokkaan absorboitumisen nenän limakalvon läpi. Samoin US-patenttijulkaisussa 4250163 kuvataan menetelmä lääkkeen antamiseksi nenän limakalvoon,
20 jossa edullisella valmisteella on limakalvoon adheesio-ominaisuuksia. EP-patenttihakemuksessa 123831 kuvataan bioyhteensopivien vesiliukoisten amfifiilisten steroidien, jotka eivät ole luonnollisia sappisuoloja, kyky lisätä lääkkeen läpäisemistä kehon pintojen läpi, käsittäen nenän. DE-patenttijulkaisussa 2620446 kuvataan insuliinin vesiliuosformulaatio nasaaliseen antoon, joka formulaatio sisältää läpiseemisen parantajan, joka on amfoteeristen, anionisten tai ei-ionisten pinta-aktiivisten aineiden, saponiinin, sappisuolojen tai surfaktiinin muodossa. EP-patenttihakemus 230264 kuvaa nasaalisen
25 vesiliuoslääkkeenantojärjestelmän rokotteisiin, jotka sisältävät suurimolekyylipainoisen lääkkeen, geelinmuodostusaineen (esimerkiksi hydroksietyyliselluloosa) ja joissain tapauksissa muita lisäaineita (esimerkiksi pinta-aktiivisia aineita, glyserolia tai polyetyleeniglykolia).

35

Mikään edellä olevista patenttijulkaisuista ja -hakemuksista ei kuvaa mikropallosten käyttöä nasaaliseen antoon, eikä mikropallosten ja vastaanottoa parantavan aineen tai muiden apu-

aineiden yhdistelmää, jonka voisi olettaa antavan paremman biosaatavuuden.

5 Nasaaliseen käyttöön tarkoitettu mikropallosvalmiste on kuvattu patenttijulkaisussa PCT/GB86/00721, mutta tämä koskee kuitenkin materiaaleja, joilla on ioninvaihto-ominaisuuksia, ja jotka ovat yhdelle ainoalle spesifiselle lääkkeelle, natriumkromoglykaatille paikalliseen vaikutukseen paremminkin, kuin antoon yleisverenkiertoon.

10

Nykyisin on ehdotettu nenää vaihtoehtoisena antoreittinä systeemissä verenkierrrossa vaikuttaville lääkkeille. Erityisesti kiinnitetään huomiota bioteknologian tuotteisiin, nimittäin peptideihin ja proteiineihin. Muita esitettyjä lääkkeitä ovat
15 oraalisesti huonosti absorboituvat lääkkeet tai lääkkeet, jotka metaboloituvat täysin joko ruoansulatuskanavassa itsessään tai maksan first pass -metaboliolla.

Nasaalisella annolla katsotaan olevan mahdollisuuksia seuraavista seikoista johtuen:

1. nenässä on epiteelipinnalla olevan mikronukan johdosta lääkkeen absorptiota varten suuri pinta-ala;
2. epiteelikudoksen alainen kerros on tiheästi suonitettu;
3. laskimoveri nenästä kulkeutuu suoraan systeemiseen verenkiertoon, ja siten vältetään maksan first pass -metaboliasta johtuva lääkkeen menetys.

Nyt on tutkittu laajan lääkejoukon biosaatavuus nasaalista reittiä. Toiset lääkkeet tuntuvat absorboituvan tehokkaasti,
30 ja niillä on laskimonsisäiseen antoon verrattava biosaatavuus. Useimmilla lääkkeillä on kuitenkin huono biosaatavuus intranasaalista annettuna, mutta poikkeuksia esiintyy. Luonnollinen steroidi progesteroni on hyvin tehoton oraalisesti annettaessa. Nasaalisesti annettuna se absorboituu tehokkaasti, ja sillä
35 on laskimonsisäisellä ruiskeella saatavaan verrattava biosaatavuus; huippukonsentraatio ilmenee noin 6 min kuluttua. Julkaistujen tietojen mukaan oraalisesti annetun progesteronin biosaatavuus on luokkaa 1,2 % laskimonsisäiseen antoon verrattuna (1). Toinen esimerkki on β -salpaaja propranololi. Tämä

lääke metaboloituu oraalisesti annettuna laajalti maksassa ja mahdollisesti suolen seinämässä. Kun lääke annetaan intranasalisesti yksinkertaisena liuoksena, ovat plasmatasot samat kuin laskimonsisäisellä annolla saavutettavat (2).

5

Insuliini, jonka intranasaalista antoa on paljon tutkittu, voidaan antaa nenän membraanin läpi, mutta absorptioteho on tavallisesti noin 5 % annetusta annoksesta. Absorptiota voidaan parantaa niin kutsuttuja absorptionparantajia käyttämällä. Esimerkiksi tutkimuksessa, jonka suoritti Salzman, annettiin insuliinia pinta-aktiivisen aineen, Laureth 9:n, läsnäollessa (3). Selvän annoksesta riippuvan suhteen lisäksi saatiin myös nopeasti ilmennyt huipputaso. Intranasaalisesti annetun insuliinin voimakkuus oli noin 1/10 laskimonsisäisesti annetun insuliinin voimakkuudesta. Selvästi, jos insuliini voidaan antaa potilaille turvallisesti ja luotettavasti nasaalisella annolla, voisi tällaisella järjestelmällä olla mahdollisuuksia antoon aterioiden yhteydessä tyypin 1 sokeritaudissa.

20 Chien ja Chan (4) ovat koonneet yhteenvedon absorptiokapasiteeteista joukolle nasaalisesti annettuja lääkkeitä. Huomautettakoon, että suuren molekyylipainon omaavat aineet, esimerkiksi peptidit ja proteiinit absorboituvat tavallisesti huonosti nasaalista reittiä. Huomautettakoon myös, että useimmilla yhdisteistä, sekä suuren että pienen absorptiotehon omaavilla, huipputaso plasmassa oli noin 30 min sisällä. Siten absorptio on laajuudestaan riippumatta nopeaa, muttei erityisen pitkävaikutteista. Tämä ilmaisee, että lääke voi joko olla poistunut absorptiokohdasta, tai jos se on riittävän pysymätön, olla hajonnut ennen kuin edelleen absorboitumista voi tapahtua.

Tekijöitä, jotka vaikuttavat lääkkeen absorptioon nenästä systeemiseen verenkiertoon

35 Nasaalisuuhkeiden nopeaa puhdistumaa nenästä mahdollisilta absorptiopinnoilta voidaan pitää lääkkeiden menetykseen vaikuttavana päätekijänä. Lisäksi peptidien ja proteiinien tapauksessa lääkkeen entsyymaattisella hajoamisella ja molekyylin koolla voi myös olla merkitystä alhaisiin biosaatavuuksiin.

Useimmiten nasaalisessa annossa on yritetty ratkaista lääkkeen tehottomasta absorptiosta riippuva ongelma käyttämällä absorp-
tionparantajia, esimerkiksi sappisuolojen tai pinta-aktiivis-
ten aineiden muodossa modifioimaan nenän limakalvon ominai-
5 suuksia lisäämään täten vastaanottoa. Tyypillinen esimerkki on
tutkimus, jonka ovat kuvanneet Hanson et al. (5) peptidi lohien
kalsitoniinin nasaalisesta annosta. Tässä kävi selvästi ilmi,
että plasman kalsitoniinipitoisuudessa voi tapahtua selvä kas-
vu, kun lääke annetaan yhdistelmänä pinta-aktiivisen aineen
10 kanssa. Ilman parantajaa plasmassa ilmeni siten vain pieni
määrä kalsitoniinia kun AUC parantajan kanssa puolestaan kas-
voi 10-kertaiseksi. Samoin on sappisuolan (natriumdeoksiko-
laatti) määrien lisäämisen merkittävä vaikutus insuliinin ab-
sorptioon hyvin kuvattu: Gordon ja muut (6).

15

Nasaalisesti kontrolloidusti vapauttavat järjestelmät
Illum et al. (7) valitsivat mikropalloset, jotka on valmistet-
tu materiaaleista, joiden tiedetään turpoavan kontaktissa ve-
den kanssa muodostaen geelimäisen kerroksen, jolla on hyvät
20 biotarttumisominaisuudet. Ne voisivat nenän limakalvoon tart-
tumisestaan johtuen siten hyvinkin modifioida puhdistumaa. Va-
litut materiaalit käsittävät albumiinin, tärkkelyksen ja io-
ninvaihtomateriaalin DEAE-Sephadex, ja mikropallosten koko on
ollut halkaisijaltaan luokkaa 40 - 60 μm .

25

Merkittyjen mikropallosten puhdistumaa on tutkittu vapaaehtoi-
silla ihmisillä tavanomaista gammatuikelaskuria käyttäen (7).
Mikropalloset leimattiin tecnetium-99m:llä ja lisättiin nenään
jauhemuodossa nasaalista insufflaattoria käyttäen. Kontrolleil-
30 na käytettiin neste- ja jauhevalmisteita. Vapaaehtoisten nenän
asento pidettiin samana gammakameran kollimaattorilla erityi-
sesti suunniteltua matriisia käyttäen. Tuikepyyhkäisykuvat
otettiin sopivin aikaväleihin, ja kiinnostavat alueet muodostui-
vat kertymisalueiden ympärille nenäontelossa. Aika/aktiivi-
35 suusprofiilit osoittivat selvästi, että nasaalisuihke- ja jau-
hevalmisteiden puhdistuma-ajat olivat aika nopeita (50-% puh-
distuma ($T_{50\%}$) 15 min). Vastakohtana tälle on mikropallosilla
paljon pidemmät puhdistuma-ajat. 3 h kuluttua noin 50 % albu-
miini- ja tärkkelysmikropallosista ja 60 % DEAE-Sephadex-mik-

ropallosista oli edelleen antokohdassa. Puhdistuman puoliintumisajaksi tästä alkuperäisestä DEAE-Sephadex-mikropallostien kertymispaikasta laskettiin noin 4 h:ksi. Nykyisin tämän keksinnön hakijat tutkivat, antavatko nämä mikropallosjärjestelmät parantuneen biosaatavuuden valituille lääkeaineille, käsittäen peptidit ja proteiinit. Hakijat olettavat, että pienentynyt puhdistumanopeus ja mahdollinen pysymättömien lääkkeiden suojaus entsyymeillä pilkkoutumista vastaan lisää absorptiotehoa merkittävästi.

10

Kontrolloidusti vapauttavien järjestelmien suhteen on mielenkiintoista havaita, että Nagai ja kollegat (8) ovat onnistuneet lisäämään insuliinin absorptiota nasaalisen annon jälkeen koirilla geelilytyvää valmistetta käyttäen. Insuliini sekoitettiin selluloosamateriaalin ja Carbopol 934:n (polyakryylihap-
15 po) kanssa ja annettiin jauhevalmisteena. Samoin, Morimoto ja kollegat (9) käyttivät nasaaligeeliä (jälleen polyakryylihap-
po) insuliinin ja kalsitoniinin antojärjestelmänä rotilla. Saatiin merkittävä plasman glukoositasojen aleneminen normaaliin valmisteeseen verrattuna, mikä ilmaisee kasvaneen absorp-
20 tiotehon.

Lääkkeen annon suurin ongelma on suurimolekyylipainoisten materiaalien, kuten proteiinien ja peptidien absorption tehok-
25 kuus biologisten kalvojen läpi. Tavallisesti keho ei ota vastaan tällaisia molekyylejä ruoansulatusreittein, posken limakalvoon, peräsuolen limakalvoon, emättimen limakalvoon tai intranasaalisena järjestelmänä annettuna.

30 Kuten edellä mainittiin ja kuten Chien ja Chang (4) ovat osoittaneet viimeaikaisissa insuliinikokeissa, voidaan tällaisten yhdisteiden absorptiota lisätä, mikäli yhdisteet annetaan yhdessä nk. absorptionparantajan kanssa. Näihin absorptionparannusmateriaaleihin on kuulunut ei-ionisia pinta-aktiivisia aineita kuten myös erilaisia sappisuolajohdannaisia. Li-
35 sääntynyt membraanien läpäisevyys tämän tyyppisten pinta-aktiivisten materiaalien läsnäollessa ei ole ennalta odottamatonta, tosiasiaa vatsatautialan kirjallisuudessa tunnetaan suuri joukko sellaisia absorption edistäjiä (katsausta varten

katso Davis et al. 910). Tällaiset materiaalit eivät kuitenkaan membraaneja ärsyttävistä vaikutuksistaan johtuen sovellu farmakologisten aineiden pitkäaikaiseen antoon. Tämä ei käsitä ainoastaan pinta-aktiivisten ei-ionisia muunnoksia vaan myös
5 sappisuoloja ja sappisuolajohdannaisia (esim. fusidiinihappo).

Tämän keksinnön tarkoituksena on saada aikaan lääkkeenantojärjestelmä, joka parantaa suurimolekyylipainoisten materiaalien antoa.

10

Siten tämä keksintö koskee menetelmää limakalvon läpi tapahtuvaan antoon tarkoitettun lääkkeenantojärjestelmän valmistamiseksi, joka järjestelmä käsittää suuren joukon mikropalloshiukkasia, jotka sisältävät vaikuttavan lääkkeen ja kuhunkin
15 mikropalloshiukkaseen liittyneen aineen, jolla on ominaisuus lisätä vaikuttavan lääkkeen biosaatavuutta limakalvon lävitse. Tämä lääkkeenantojärjestelmä valmistetaan menetelmällä, joka käsittää seuraavat vaiheet:

- i) valmistetaan mikropalloshiukkasia,
- 20 ii) vaikuttava lääke ja aine sisällytetään mikropallosten valmistuksen aikana tai lääke ja aine sorboidaan mikropallosten sisään tai päälle niiden valmistuksen jälkeen, ja
- iii) mahdollisesti pakastekuivataan vaiheesta ii) saatu tuote.

25

Hiukkaset annetaan edullisesti biotarttumisominaisuuksia omaavan jauheen muodossa suihkeena.

Pinta-aktiivisella aineella ei pitäisi olla kroonisia toksisuusongelmia, koska in vivo pinta-aktiivisen aineen pitäisi
30 olla ärsyttämätön ja/tai metaboloitua nopeasti tavalliseksi solun osaksi, jolla ei ole merkittävää ärsytysvaikutusta.

Edullinen pinta-aktiivinen materiaali on lysolesitiini ja muut lysofosfatidyyliyhdisteet, kuten lysofosfatidyylietanoliini,
35 ni, lysofosfatidihappo ja vastaavat. Sopiva konsentraatio on 0,02 - 10 %.

Tämän keksinnön suoritusmuotoja kuvataan nyt esimerkinomaisesti viitaten oheisiin piirroksiin, joissa:

kuva 1 kuvaa graafisessa muodossa luonnollisen pinta-aktiivisen aineen käytön vaikutusta lääkkeen vastaanottoon ensimmäisessä kokeessa;

kuva 2 kuvaa graafisessa muodossa luonnollisen pinta-aktiivisen aineen käytön vaikutusta, ja antoa mikropallosten muodossa;

kuva 3 kuvaa graafisessa muodossa luonnollisen pinta-aktiivisen aineen käytön vaikutusta rottatutkimuskokeessa;

kuva 4 kuvaa plasmaglukoositasoa kaneilla intranasaalisen Zn-insuliinin annon jälkeen;

kuva 5 kuvaa plasmaglukoositasoa kaneilla intranasaalisen Na-insuliinin annon jälkeen;

20

kuva 6 kuvaa plasmaglukoositasoja eri muodoissa annetuilla insuliinin intranasaalisilla annoilla;

kuvassa 7 esitetään vastaavat plasman insuliinitasojen käyrät;

kuvassa 8 esitetään arvot rottakokeista, joissa annettiin hGH:ta intranasaalisti; ja

kuvas-
30 kuvassa 9 esitetään arvot lammaskokeista, joissa hGH annettiin intranasaalisti.

Lysofosfatidit muodostuvat fosfolipidien hydrolyysillä. Tällaiset aineet ovat pinta-aktiivisia, ja muodostavat misellirakenteita. Tämän keksinnön mukaisesti aktiiviseen lääkkeeseen lisätään lysolesitiiniä ja muita lysofosfatideja vaikuttamaan lääkkeen annossa mahdollisena absorptio-
35 parantajana. Lysofosfatidyylikoliini muuttaa membraanien läpäisevyyttä ja

mahdollistaa lisääntyneen proteiinien ja peptidien, käsittäen esimerkiksi insuliinin, ihmisen kasvuhormonin ja muiden bioteknologian ja rekombinantti-DNA-menetelmien tuotteiden vastaanoton. Annon jälkeen limakalvon sisäkettoverhon solut 5 muuttavat lysofosfatidit eheiksi fosfatideiksi, jotka ovat tavallisia solukomponentteja (katso de Vries et al. (11)). (Myös lysolesitiiniä itseään esiintyy hyvin pieninä määrinä solumembraaneissa (12)). Tämä lysofosfatidien nopea ja tehokas muuntuminen täydelliseksi fosfatidirakenteeksi johtaa 10 huomattavasti vähentyneisiin ärsytys- tai toksisuusvaikutuksiin.

Lääke, joka on annetaan limakalvon pinnalle ruoansulatuskanavassa, sukuelinreitillä tai nenässä, silmässä tai keuhkoissa, 15 voidaan antaa viskoosina liuoksena, suspensiona tai jauheena yhdessä lysolesitiinin kanssa, tai edullisemmin kolloidisina hiukkasina, jotka käsittävät mikropallosjärjestelmän. Etuna biotarttuvilla mikropallosjärjestelmillä lisättäessä limakalvopinnalle on, että tällaiset järjestelmät mahdollistaisivat 20 pitemmät kontaktiajanjaksot, erityisesti jos mikropalloset ovat hitaasti hajoavia. Tämä pätee erityisesti annettaessa nasaalisesti lääkkeitä, jotka on sisällytetty mikropallosiin, jotka on valmistettu luonnollisista materiaaleista, kuten albumiinista, gelatiinista, ja erityisesti tärkkelyksestä. 25 Joissain tapauksissa pitempi kontaktiaika yksinään saattaa antaa käyttöön riittävän parannuksen biologiseen saatavuuteen.

Edullinen parannusmateriaali on munan tai soijan lesitiinistä 30 valmistettu lysofosfatidylikoliini. Voidaan käyttää muita lysofosfatidylikoliineja, joissa on erilaisia asyyliiryhmiä, kuten myös fosfatidylietanoliamiineista ja fosfatidihapoista valmistettuja lysoyhdisteitä, joilla on samanlaisia membraaneja modifioivia ominaisuuksia. Asyylikarnitiinit (esimerkiksi 35 si palmitoyyli-DL-karnitiinikloridi) ovat eräs vaihtoehto.

Muihin parannusaineisiin, jotka olisivat tämän keksinnön mukaisesti sopivia, kuuluvat kelatoivat aineet (EGTA, EDTA, al-

ginaatit), pinta-aktiiviset aineet (erityisesti ei-ioniset materiaalit), asyyliglyserolit, rasvahapot ja -suolat, tyloksapoli ja biologiset detergentit, jotka on lueteltu luettelossa SIGMA Catalog, 1988, s. 316 - 321. Myös aineet, jotka 5 modifioivat membraanin fluiditeettia ja läpäisevyyttä, olisivat sopivia, kuten enamiinit (esimerkiksi etyyliasetoasetatin fenyylialaniinienamiini), malonaatit (esimerkiksi dietyleenioksimetyleenimalonaatti), salisylaatit, sappisuolat ja -analogit ja fusidaatit. Sopivia konsentraatioita olisivat 10 konsentraatiot jopa 10-%.

Sama antosääntö lääkkeelle, joka on sisällytetty biotarttuvan mikropallosen sisälle tai päälle lisätyn farmaseuttisen apu- aineen kanssa, pätee järjestelmille, jotka sisältävät vai- 15 kuttavan lääkkeen ja mukolyyttisen aineen, peptidaasi-inhibiittoreita tai asiaankuulumattoman polypeptidialustan yksinään tai yhdistelmänä. Sopivia mukolyyttisiä aineita olisivat tiolia sisältävät yhdisteet, kuten N-asetyylikysteiniini ja sen johdannaiset. Peptidi-inhibiittoreita ovat aktinoniini, amatiini, 20 antiipaiini, bestatiini, klooriasetyyli-HOLeu-Ala-Gly-NH₂, diprotiini A ja B, ebelaktoni A ja B, E-64, leupeptiini, pepstatiini A, fisforamidoni, H-Thr-(t-Bu)-Phe-Pro-OH, aprotiini, kallikreiini-inh. 1, kymostationi, bentsamidiini, kymotrypsiini Ing. 11, trypsiini-inh. 111-0. Sopivia konsent- 25 raatioita olisivat konsentraatiot 0,01 - 5 %.

Mikropalloset ovat kooltaan välillä 10 ja 100 µm, ja ne valmistetaan bioyhteensopivasta materiaalista, joka geeliiytyy kontaktissa limakalvon pinnan kanssa. Tärkkelysmikropalloset 30 (tarvittaessa ristiliitetyt) ovat edullisia materiaaleja. Muita mikropallosia ovat gelatiini, albumiini, dekstraani ja kollageeni. Näiden mikropallosjärjestelmien valmistus on farmaseuttisessa kirjallisuudessa hyvin kuvattu (katso esimerkiksi Davis et al. (13)). Emulsio- ja kerrosrotusmenetelmät 35 ovat molemmat sopivia. Lopulliset mikropalloset voidaan modifioida kemiallisella ristiliittämisellä ja kuumennuskäsittelyllä. Vaikuttava aine voidaan sisällyttää mikropallosten sisälle niiden formuloinnin aikana tai sorboida järjestelmän

sisälle tai päälle valmistuksen jälkeen. Järjestelmän tehokkuutta voidaan kontrolloida mikropallosmatriisin fysikaalisella luonteella ja esimerkiksi ristiliittämisen laajuudella. Mikropalloskuljetusjärjestelmä voisi myös käsittää mikropallosia, jotka on valmistettu aktiivisesta peptidistä tai proteiinista itsestään, kuten insuliinimikropallosista.

Esimerkiksi tärkkelys/insuliini-järjestelmän valmistus suoritettiin lisäämällä pakastekuivattuja tärkkelysmikropallosia fosfaattipuskuriliuokseen (pH = 7,3), joka sisälsi insuliinin ja parannusjärjestelmän, sekoittamalla 1 h ja pakastekuivamalla kunnes saatiin kevyt jauhe. Tyypillinen insuliinin konsentraatio olisi 1 IU/mg mikropallostista ja tyypillinen parannusainejärjestelmän (esimerkiksi lysolesitiinin) konsentraatio 0,08 mg/mg mikropallostista. Mikropallosiin voidaan sisällyttää enemmän tai vähemmän lääkettä ja parannusainejärjestelmää.

Käyttämällä mikropallostien ja parannusaineiden yhdistelmää on havaittu, että biotarttuvilla mikropallosjärjestelmillä on kyky parantaa suuresti poolisten aineiden biosaatavuutta, kun ne annetaan yhdessä parannusainejärjestelmän kanssa. Tämä parannus on paljon suurempi, kuin parannus, joka voidaan saavuttaa parannusaineella sinänsä. Tämän parannusainevaikutuksen potensoinnin uskotaan johtuvan lääkkeenantojärjestelmän pitemmästä viipymisajasta nenäontelossa. Teorian on havaittu pätevän erilaisille lääkkeille, kuten gentamiinille, insuliinille ja kasvuhormonille. Näihin tutkimuksiin valittu parannusaine oli lysofosfatidyylikoliini (edellä kuvattu). Teoria toimisi yhtä hyvin muille parannusainejärjestelmille (katso luetteloa muualta) ja muille lääkkeille, kuten:

insuliini (heksameerinen/dimeerinen/monomeerinen muoto)
glukagoni
kasvuhormoni (somatotropiini)
35 polypeptidit tai niiden johdannaiset (edullisesti molekyyli-paino noin 1000 - 300000)
kalsitoniinit ja niiden synteettiset modifikaatiot
enkefaliinit

- interferonit (erityisesti interferoni α -2 tavallisten vilustumisten hoitoon)
- LHRH ja analogit (nafareliini, busereliini, Zolidex)
- GHRH (kasvuhormonia vapauttava hormoni)
- 5 sekretiini
- nifedipiini
- bradykiniiniantagonistit
- GRF (kasvua vapauttava tekijä)
- THF
- 10 TRH (tyrotropiinia vapauttava hormoni)
- ACTH-analogit
- IGF (insuliinityypiset kasvutekijät)
- CGRP (kalsitonigeeniin liittyvä peptidi)
- atrialinen natriureettinen peptidi
- 15 vasopressiini ja analogit (DDAVP, lypressiini)
- antibiootit
- metoklopramidi
- migreenin käsittely (dihydroergotamiini, ergometriini, ergotamiini, pitsotsiini)
- 20 nasaaliset rokotteet (erityisesti AIDS-rokotteet)
- tekijä VIII

Antibiootit ja antimikrobiaaliset aineet, kuten tetrasyklinihydrokloridi, leukomysiini, penisilliini, penisilliinijoh-

25 dannaiset ja erytromysiini, kemoterapeuttiset aineet, kuten sulfatiatsoli ja nitrofuratsoni; paikallispuudutteet, kuten bentsokaiini; vasokonstriktorit, kuten fenyylliefriinihydrokloridi, tetrahydrotsoliinihydrokloridi, nafatsoliininitraatti, oksimetatsoliinihydrokloridi ja tramatsoliinihydroklori-

30 di; sydänlääkkeet, kuten digitalis ja digoksiini; vasodilatoivat lääkeaineet, kuten nitroglyseriini ja papaveriinihydrokloridi; antiseptiset aineet, kuten klooriheksidiinihydrokloridi, heksyyliresorsinoli, dekvaliniumkloridi ja etakriidiini; entsyymit, kuten lysotsymikloridi, dekstranaasi; luumetaboliaa kontrolloivat aineet, kuten vitamiini D₃ ja aktiivinen vitamiini D₃; sukupuolihormonit; verenpainetta alentavat lääkkeet; rauhoittavat lääkkeet; ja syöpälääkkeet.

Steroidiset tulehduksenvastaiset aineet, kuten hydrokortisoni, prednisoni, flutikasoni, predonisoloni, triamsinoloni, triamsinoloniasetonidi, deksametasoni, betametasoni. beklometasoni ja beklometasonidipropionaatti; ei-steroidiset anti-
 5 inflammatoriset aineet, kuten asetaminofeeni, aspiriini, aminopyriini, fenyylibutatsoni, mefenaamihappo, ibuprofeeni, diklofenaakkinatrium, indometasiini, kolkisiini ja probenesidi; entsyymaattiset anti-inflammatoriset aineet, kuten kymotrypsiini ja bromeliiniseratiopeptidaasi; antihistamiiniset ai-
 10 neet, kuten difenhydramiinihydrokloridi, kloorifeniramiinimaleaatti ja klemastiini; antiallergia-aineet (yskää vastustavat/ysköksiä irrottavat antiastmaattiset aineet, kuten natriumkromoglykaatti, kodeiinifosfaatti ja isoprottereolihydrokloridi.

15

Anto

Mikropalloset voidaan antaa nasaalista reittiä nasaali-insufflaattorilaitetta käyttäen. Esimerkkejä näistä on jo käytössä nasaaliseen antoon tarkoitetuissa kaupallisissa jauhe-
 20 järjestelmissä (esimerkiksi Fisonin Lomudal-järjestelmä). Farmaseuttisesta kirjallisuudesta löytyy esimerkkejä muista laitteista (katso esimerkiksi: Bell, A. Intranasal Delivery devices, in Drug Delivery Devices Fundamentals and Applications, Tyle P. (toim.), Dekker, New York, 1988).

25

Eläimillä suoritettut nasaaliset antokokeet

Seuraavat eläimillä (rotilla, kaneilla ja lampailla) suoritettut nasaaliset antotutkimukset suoritettiin keksinnön havainnollistamiseksi.

30

Gentamysiini:

Lääke gentamysiini valittiin mallitestiaineeksi. Tämä poolinen yhdistelmä tunnetaan huonosti absorboituvaksi nenään annettuna (katso esimerkiksi Duchateau et al. (17), ja biolo-
 35 gista saatavuutta voidaan parantaa lisätyillä sappisuoloilla.

Rottatutkimukset

Käytettiin in situ-rottamalla, jonka on kuvannut Hirai et

al. (14), modifioituna Fisher et al.:in (15) tavalla. Koiraspuoliset Wistar-rotat, jotka painoivat noin 200 g, nukutettiin vatsaontelonsisäisellä pentobarbitoniruiskeella, 80 mg/kg (Sagatal, 60 mg/ml). Rottien henkitorviin tehtiin avanne, 5 ruokatorvi suljettiin, ja yhteinen päänvaltimo kanyloitiin.

Tilavuus gentamysiiniliuosta, joka sisälsi 0,5 % lääkettä lisätyn lysofosfatidyylikoliinin (LPC) (0,2 %) kanssa ja ilman, lisättiin nenäonteloon. Päänvaltimosta otettiin verinäytteet 10 hetkillä 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 ja 120 min lääkkeen annon jälkeen. Gentamysiinitasot määritettiin EMIT-menetelmällä (16). LPC-parannusaineen vaikutus esitetään kuvassa 1. Gentamysiiniliuoksen anto yksinään sai aikaan huonon biosaatavuuden, kun taas parannusainejärjestelmän lisäys sai aikaan 5-15 kertaisesti suuremman huipputasen. AUC oli 128 µg min/ml hetkellä t = 0, ja 557 µg min/ml hetkellä 120 min.

Lammastutkimukset

Ristisiitetyt (Suffolk ja Texel) lampaat jaettiin 3:n ja 2:n 20 ryhmiin. Lampaiden keskipaino oli noin 40 kg.

Eläimet eivät paastonneet ennen gentamysiinin antoa. Kunkin eläimen oikeaan kaulalaskimoon asetettiin kokeen ensimmäisenä päivänä paikalleenturpoava Viggo secalon universal-sentraalinen 25 laskimokatetri, sisähalkaisijaltaan 1,2 mm, jossa oli secalon universal-virtausventtiili, ja huuhdeltiin tarvittaessa aukipitämiseksi heparinisoidulla normaalisuolaliuoksella (50 IU/ml). Katetri poistettiin tutkimuksen lopussa. Lampaat nukutettiin intranasaalista antoa varten ketamiini-30 hydrokloridin IV-annoksella, 2 mg/kg annon aikaisen aivastuksen estämiseksi. Nukutus kesti noin 3 min. Myös eläimet, jotka saivat gentamysiiniä laskimonsisäisesti, nukutettiin.

Liuosten intranasaaliseen antoon lampaan sieraimen asetettiin 35 siniviivoitettu, 35-cm napakanyyli (koko 6 FG) ennalta määrättyyn 10-cm syvyyteen ennen liuoksen lisäystä 1-ml ruis-kusta. Jauhevalmisteiden antamiseksi 6,5-mm BOC henkitorvi-putkeen (punaista kumia, taivutettu) lisättiin jauhevalmis-

tetta, ja se asetettiin sitten lampaan sieraimen määrättyyn 6-cm syvyyteen ennen jauheen puhaltamista nenäonteloon.

Ensimmäinen lammasryhmä (n = 2) sai 0,25 ml gentamysiini-
5 liuosta (386 mg/ml) (5,0 mg/kg) kumpaankin sieraimen. Toinen
ryhmä (n = 3) sai kumpaankin sieraimen gentamysiiniliuosta
(386 mg/ml) (5,0 mg/kg), joka sisälsi 2 mg/ml LPC:tä. Kolmas
ryhmä (n = 3) sai 5,0 mg/kg gentamysiiniä ja 0,2 mg/kg
LPC:tä yhdistelmänä tärkkelysmikropallosten kanssa (1,9 mg
10 gentamysiiniä/mg tärkkelysmikropallosia). Viimeinen lammas-
ryhmä (n = 3) sai laskimonsisäisesti 2 mg/kg gentamysiiniä
liuoksena (40 mg/ml) kaulalaskimon kautta. Kaulalaskimon
kautta otettiin verinäytteitä (2-ml) hetkillä 0, 8, 16, 24,
32, 45, 60, 90, 120, 180 ja 240 min lääkkeen annosta. Seerumi
15 erotettiin sentrifugoimalla, ja näytteitä säilytettiin -20
°C:ssa odottamassa analyysiä. Mihinkään näytteistä ei lisätty
hepariinia. Gentamysiinitasot määritettiin EMIT-tekniikalla
(16).

20 Dramaattinen vaikutus havaittiin, kun gentamysiini plus pa-
rannusaine annetaan tärkkelysmikropallosvalmisteen muodossa,
veren huipputaso ollessa 6,3 µg/ml verrattuna gentamiini-
liuoksella saatuun huippuun 0,4 µg/ml. Mikropallosten plus
LPC-parannusaineen yhdistelmä antaa taso veressä/aika-profiili-
25 lin, joka on hyvin samanlainen kuin gentamysiiniä laskimon-
sisäisesti antamalla saatu (kuva 2).

Annetut annokset huomioon ottaen on intranasaalisesti yhdis-
telmänä LPC-parannusaineen ja geelilytyvän mikropallosjärjes-
30 telmän kanssa annetun gentamysiinin biosaatavuus 57,3 % ver-
rattuna gentamysiinin IV-annokseen.

Insuliini

Glukoosin plasmatasot analysoitiin eläinkokeissa glukoosiok-
35 sidaasimenetelmällä. Plasman insuliinitasot määritettiin
kani- ja lammaskokeissa radioimmunomäärityksellä kaksoisvas-
ta-ainetekniikan avulla.

Rottakokeet:

Käytettiin Hirain in situ-rottamalla (Fisherin modifioimaa) insuliinin nasaalisen absorptioon tutkimiseksi yön yli paastonneilla koiraspuolisilla Wistar-rotilla, jotka painoivat 5 noin 150 g. Rotat nukutettiin vatsaontelonsisäisellä 0,25-ml pentobarbitoniruiskeella (60 mg/ml).

Valmistettiin puskuriin ($1/75$ M Na_2PO_4), pH 7,3, sinkki (Zn)-ihmisen insuliinin 250 IV/ml liuos. Joissain kokeissa valmis-
10 teeseen lisättiin 0,2 % LPC tai vertailun vuoksi 1 % glykodeksikolaattia (GDC) absorptioparannusaineeksi. Kokeet suoritettiin rinnakkaisnäyttein ($n = 4$). Nenäonteloon lisättiin 10 ul vastaten 16,67 IV/kg (2,5 IV/rotta). Otettiin verinäytteet (0,2 ml) 5-ml fluoridioksalaattiputkiin hetkillä 10, 6 ja 2
15 min ennen antoa ja hetkillä 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240 ja 300 min annon jälkeen. Veri korvattiin kaulalaskimon kautta annetulla suolaliuoksella.

Kuvassa 3 esitetään glukoositasot rotilla, jotka saivat intranasaaliset annokset Zn-insuliiniliuosta, Zn-insuliiniliuosta yhdistelmänä 0.2 % LPC:n kanssa tai Zn-insuliiniliuosta yhdistelmänä 1 % GDC:n kanssa. Tulokset osoittavat, että intranasaalisesti yksinkertaisena liuoksena annettu insuliini ei ole tehokas plasman glukoositason parantamiseen, kun taas parannusainejärjestelmä, kuten LPC saa mitatuissa plasmatasoissa aikaan nopean ja merkittävän laskun. LPC-parannusainejärjestelmällä konsentraatiossa 0.2 % tässä in situ-mallissa, jossa mikrokarvojen puhdistumamekanismi on heikentynyt, voidaan nähdä samanlainen vaikutus, kuin 1-% sappisuolalla.

30

Tutkimukset kaneilla:

Zn-insuliini- (pääosin heksameerimuodossa) tai Na-insuliini-
valmisteita (pääosin monomeeri/dimeeri-muodoissa) annettiin kaneille nasaalisesti joko vapaana insuliinina tai mikropal-
35 losantojärjestelmänä lysofosfatidyylikoliinin (LPC) kanssa parannusaineena. Kokeet suoritettiin rinnakkaismäärityksin ($n = 4$).

Tässä tutkimuksessa käytettiin paastoamattomia Uuden Seelan-

nin naaraspuolisia kaneja, joiden keskimääräinen paino oli 3.5 kg.

Puskuriin ($1/75$ M Na_2HPO_4), pH 7,3 - 7,4, valmistettiin 40 IU/ml Zn- tai Na- ihmisen insuliinin liuos. Joissain kokeissa lisättiin 0,2 % LPC:tä.

Eppendorf-pipettiä käyttäen lisättiin intranasaalisti yhteensä 200 μl liuosta. (100 μl kumpaankin sieraimeen) vastaten 10 noin 2,3 IU/kg.

Kaneille annettiin ihonalaisesti insuliinia 0,8 IU/kg 14 IU/ml-vesiliuoksesta tai 0,6 IU/kg 10 IU/ml-vesiliuoksesta.

15 Tärkkelysmikropallosten annos oli kiinteä 2,5 mg/kg, ja insuliinin annos oli kiinteä 2,5 IU/kg. LPC-annos oli 0,2 mg/kg. Kanien keskimääräinen paino oli 3,5 kg.

25 mg mikropallosia lisättiin pieneen lasipulloon, ja lisättiin 250 μl 100 IU/ml insuliiniliuosta (Na- tai -insuliini), ja sitten 2 mg LPC ja 250 μl tislattua vettä. Sitten mikropalloset saivat seistä 2 h huoneenlämpötilassa kosketuksissa insuliiniliuoksen kanssa ennen pakastekuivausta.

25 Noin 15 mg of pakastekuivattua jauhetta kustakin yksittäisestä pullosta täytettiin applikaattoriputkeen, ja tämä säilytettiin käyttöön asti kuivauslaitteessa.

Kanit saivat ehdotetun annoksen nenäonteloon ilman nukutusta. 30 Kutakin kania pidettiin selällään applikoinnin aikana ja 10 s sen jälkeen jotta varmistettaisiin jauhevalmisteen anto. Ääreiskorvalaskimosta otettiin verinäytteitä, 200 μl glukoosimääritystä, ja 2 ml insuliinimääritystä varten hetkillä 10 ja 5 min ennen antoa ja hetkellä 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 ja 35 180 min annon jälkeen. Insuliinianalyysiä varten otettua verta sekoitettiin varovasti 5-ml heparinisoiduissa (Li-hepariini) putkissa. Glukoosianalyysiä varten otettua verta sekoitettiin varovasti 5-ml fluoridioksalaattiputkissa. Glukoosi-

analyysiä varten otetut verinäytteet pidettiin murskatussa jäässä välitöntä analyysiä odottamassa. Verinäytteitä insuliinianalyysiä varten sentrifugoitiin nopeudella 3000 r/min, ja kerätty plasma säilytettiin -20 °C:ssa odottamassa analyysiä.

Kuvassa 4 esitetään plasman glukoositaso kaneilla, joille annettiin intranasaalinen Zn-insuliinin yksinkertainen liuos, ja kuvassa 5 esitetään plasman glukoositaso kaneilla, joille annettiin Na-insuliinin yksinkertainen liuos, yksinkertaisina liuoksina lisätyn 0,2 % LPC:n tai tärkkelysmikropallosten ja LPC:n yhdistelmän kanssa. Esitetään myös plasmaglukoositasot kaneilla, jotka saivat ihonalaiset Zn-insuliini- tai Na-insuliiniruiskeet. Tulokset osoittavat, että molemmantyyppisillä insuliineilla (heksameerisellä - ja monomeeri/dimeeri-muodolla) insuliinin anto yhdistelmänä LPC-parannusainejärjestelmän kanssa laskee plasmaglukoositasoja merkittävästi yksinkertaisiin insuliiniliuoksiin verrattuna. Vielä huomattavampia plasmaglukoositasojen laskuja havaitaan annettaessa insuliini yhdistelmänä mikropallosten ja parannusainejärjestelmän kanssa. Plasmaglukoosikäyrien muodot viimeksi mainituille järjestelmille olivat hämmästyttävällä tavalla samanlaiset kuin ihonalaisella annolla saadut, vaikkakin annokset ovat 2,5 IU/kg verrattuna ihonalaiseen annosteluun 0,8 IU/kg.

25

Lammaskokeet

1 mg Zn-kiteytettyä, erittäin puhdasta, puolisynteettistä ihmisen insuliinia vastaa 28 IU insuliinia. Insuliiniliuokset formuloitiin 1/75 M fosfaattipuskuriin (pH 7,3).

30

Tässä tutkimuksessa käytettiin 15 ristisiitettyä (Suffolk ja Texel) lammasta käytettiin. Eläimet korvamerkittiin ja punnittiin ennen tutkimusta:

35 Lampaiden keskipaino kg:na (\pm S.D.) oli 35,9 (\pm 2,7). Eläimet eivät paastonneet ennen insuliinin antoa, koska tämän käytännön toteuttaminen on vaikeaa, ja koska on mahdollisuus insuliiniresistanssin indusoimiseen eläimillä. Viimeksimainittu

ilmaus tarkoittaa, että lampaan veren glukoositasot eivät sellaisissa olisuhteissa vastaisi yhtä hyvin annettuun insuliiniin.

5 Kunkin eläimen oikeaan kaulalaskimoon asetettiin kokeen ensimmäisenä päivänä paikalleenturpoava Viggo secalon universal-sentraalinen laskimokatetri, sisähalkaisijaltaan 1.2 mm, jossa oli secalon universal-virtausventtiili, ja huuhdeltiin tarvittaessa aukipitämiseksi heparinisoidulla normaalisuola-
10 liuoksella (50 IU/ml). Tämä katetri poistettiin tutkimuksen lopussa.

Insuliiniliuosten ja -jauheiden valmistus:

Insuliinin kantaliuokset valmistettiin 1/75 M fosfaattipuskuriin (pH 7,3). Näitä käytettiin nestemäisinä valmisteina laskimonsisäiseen ja intranasaaliseen antoon, ja myös lyofilisoi-
15 soitujen mikropallovalmisteiden formulointiin. Viimeksi mainitut valmistettiin dispergoimalla tarvittava määrä mikropallo-
20 huoneenlämpötilassa, ja pakastekuivaamalla sitten jauhevalmisteeseen saamiseksi.

Insuliinivalmisteiden anto:

Insuliinia annettiin 0,1 IU/kg laskimonsisäisesti, 0,2 IU/kg
25 ihonalaisesti ja 2 IU/kg intranasaalisesti. Kussakin kokeessa käytettiin 3 lammasta:

(1) insuliinin laskimonsisäinen anto vesiliuoksena, formuloitu 4 IU/ml:aan: lampaat J, K ja L, 24/11/87.

30

(2) vesiliuoksen intranasaalinen anto, formuloitu 200
IU/ml:aan: lampaat A, B ja C, 24/11/87.

(3) vesiliuoksen intranasaalinen anto, formuloitu 200
35 IU/ml:aan yhdistelmänä 0,2 % LPC:n kanssa (0,02 mg/kg): lampaat D, E ja F, 24/11/87.

(4) intranasaalinen insuliinin anto yhdistelmänä tärkkelys-

mikropallosten (2,5 mg/kg) ja LPC:n (0,20 mg/kg) kanssa lyofilisoituna jauheena. Valmisteen formuloimiseksi 500 mg Spherexiä dispergoitiin 30 ml:aan 1/75M fosfaattipuskuria (pH 7,3), joka sisälsi 400 IU insuliinia ja 40 mg LPC:tä, sekoitettiin 1 h, ja pakastekuivattiin sitten: lampaat M, N ja O, 26/11/87.

(5) intranasaalinen tärkkelysmikropallosten (2,5 mg/kg) anto ilman insuliinia. Valmisteen formuloimiseksi 500 mg Spherexiä dispergoitiin 30 ml:aan 1/75M fosfaattipuskuria (pH 7,3), sekoitettiin 1 h ja pakastekuivattiin sitten: lampaat G, H ja I, 24/11/87.

(6) insuliinin ihonalainen anto vesiliuoksena, formuloitu 4,2 IU/ml:aan.

Liuosten intranasaaliseen antoon lampaan sieraimeen asetettiin siniviivoitettu, 35-cm napakanyyli (koko 6 FG, Portex Ltd., Hythe, Kent, Englanti) ennaltamäärättyyn 10-cm syvyyteen ennen liuoksen lisäystä 1-ml ruiskusta. Jauhevalmisteiden antamiseksi 6,5-mm BOC henkitorviputkeen (punaista kumia, taivutettu) lisättiin jauhevalmistetta, ja se asetettiin sitten lampaan sieraimeen määrättyyn 6-cm syvyyteen ennen jauheen puhaltamista nenäonteloon.

25

Lampaat nukutettiin intranasaalista antoa varten ketamiinihydrokloridin IV-annoksella, 2 mg/kg annon aikaisen aivastuksen estämiseksi. Nukutus kesti noin 3 min. Myös eläimet, jotka saivat insuliinia laskimonsisäisesti, nukutettiin vastustamaan ketamiinin mahdollisia vaikutuksia mitattuihin veren glukoosiin tai insuliinin tasoihin.

Kanyloidusta lampaan kaulalaskimosta otettiin 5-ml verinäytteet jäämurskaan hetkellä 15 ja 5 min ennen insuliinin antoa, ja hetkellä 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 120, 150, 180 ja 240 min annon jälkeen. Kaikki verinäytteet jaettiin 2 osaan. Insuliinianalyysiä varten otettua verta (2,5 ml) sekoitettiin varovasti 5-ml heparinisoiduissa (Li-hepariini)

putkissa. Glukoosianalyysiä varten otettua verta (2,5 ml) sekoitettiin varovasti 5-ml fluoridioksalattiputkissa. Kaikki näytteet pidettiin ottamisen jälkeen jäämurskassa odottamassa sentrifugointia, joka suoritettiin sitten 4 °C:ssa nopeudella 5 3000 r/min. Kerätty plasma säilytettiin -20 °C:ssa odottamassa insuliini- ja glukoosianalyysiä (radioimmunomääritys insuliinille).

Kuvassa 6 esitetään plasmaglukoositasot, jotka saatiin antamalla intranasaalisesti yksinkertainen insuliiniliuos, 0-koe tärkkelysmikropallosia, insuliiniliuosta, johon on lisätty 0,2 % LPC:tä, insuliinia mikropallosvalmisteena LPC:n kanssa, ja antamalla insuliinia laskimonsisäisesti. Kuvassa 7 nähdään vastaavat käyrät plasman insuliinitasoille. Kuten rotta- ja 15 kanikokeista nähdään, ei intranasaalisesti annetulla yksinkertaisella insuliiniliuksella ole merkittävää vaikutusta plasman glukoositason, ja tätä reittiä absorboituneen insuliinin määrä on todella hyvin pieni. Parannusainejärjestelmän (LPC) lisäys formulaatioon lisää verenkierrossa ilmenevän insuliinin määrää, ja aiheuttaa siten jonkin verran alhaisemman 20 plasman glukoositason. Insuliinin anto yhdistelmänä tärkkelysmikropallosten ja LPC:n kanssa tuottaa 693 % lisäyksen plasmainsuliinin AUC:hen verrattuna yksinkertaiseen nasaaliseen insuliiniliuokseen. Samalla insuliinin huipputaso kasvaa 25 1040 %:lla. Terävä tasohuippu ilmenee kohdalla 15 - 20 min ja laskee nopeasti kuten laskimonsisäisesti annetullekin insuliinille. Tarkasteltaessa insuliini/mikropallos/parannusainejärjestelmää antamalla saatuja glukoositasoja plasmaglukoosiprofiilin muoto on hyvin samanlainen kuin laskimonsisäisellä insuliinilla saatu. Tämän järjestelmän suhteellinen biosaataavuus on noin 25 % verrattuna ihonalaiseen insuliiniruiskeeseen.

Ihmisen kasvuhormoni

35 Kaikissa kokeissa käytettiin biosynteettistä hGH:ta. Plasmatasot analysoitiin kiintofaasi-2-puolisesti kerrostettu-ELISA-tekniikkaa käyttäen. Plasma määritettiin kaksoiskokeena 1/10-laimennoksena vasta-aineinkubointipuskuriin valmistettua

B-hGH:ta (0,11 - 7,0 ng/ml) vastaan, ja myös sopivaan plasma-laimennokseen valmistettuna.

Rottatutkimukset:

- 5 Kuten edellä, suoritettiin kokeet käyttäen Hirain kuvaamaa ja Fisherin modifioimaa rotan in situ-mallia.

Paastoamattomat koiraspuoliset Wistar-rotat, jotka painoivat noin 200 g, jaettiin 4:n ryhmiin, ja nukutettiin 0,35-ml pen-
10 tobarbitonin vatsaontelonsisäisellä ruiskeella (60 mg/ml).

Rotille annettiin 3 eri hGH-valmistetta, nimittäin hGH:n 10-
mg/ml liuos kaliumfosfaattipuskurissa (1,75 M), pH = 7,2,
edellä mainittu liuos, johon lisättiin 0,05 % LPC:tä, ja
15 edellä mainittu liuos, johon lisättiin 0,5 % LPC:tä.

20 µl (1 mg/kg) jotain 3 valmisteesta annettiin intranasaa-
listi muoviputken avulla.

- 20 Kaikki kokeet suoritettiin rinnakkaismäärityksin. Otettiin verinäytteitä, 20 tippaa, ja pidettiin ne jäissä, ajanhetkilä 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, 240 ja 300 min annon jälkeen. Plasma erotettiin ja säilytettiin analyysiin asti -20 °C:ssa.

25

Kuvasta 8 nähdään, ettei intranasaalisesti liuksena ilman parannusainejärjestelmää annettu hGH absorboitu merkittävässä määrin nasaalimembraanin kautta. Lisättessä luokseen 0,5 % LPC:tä saatavat huipputasot plasmassa kasvavat kuitenkin noin
30 3,5 ng/ml:sta noin 57 ng/ml:aan hyvin merkittäväällä vaikutuksella AUC:hen. Hyvin alhaisen LPC:n konsentraation (0,05 %) lisäyksellä ei ilmeisesti ole vaikutusta hGH:n absorptioon.

Lammastutkimukset:

- 35 Tässä tutkimuksessa käytettiin 12 ristisiitettyä (Suffolk ja Texel) lammasta. Eläimet korvamerkittiin ja punnittiin ennen tutkimusta:

Lampaiden keskipaino kg:na (\pm S.D.) oli 35,8 (\pm 3,0).

Kunkin eläimen oikeaan kaulalaskimoon asetettiin kokeen ensimmäisenä päivänä paikalleenturpoava Viggo secalon universal-sentraalinen laskimokatetri, sisähalkaisijaltaan 1.2 mm, jossa oli secalon universal-virtausventtiili, ja huuhdeltiin tarvittaessa aukipitämiseksi heparinisoidulla normaalisuolaliuoksella (25 IU/ml). Tämä katetri poistettiin tutkimuksen lopussa.

10

hGH:ta annettiin 34,2 μ g/kg (0,1 IU/kg) ihonalaisesti ja 307,5 μ g/kg (0,9 IU/kg) nasaalisesti. Kussakin kokeessa käytettiin 3 lammasta:

15

(1) hGH:n anto ihonalaisesti vesiliuoksena, formuloitu 1,37 mg/ml:aan (4 IU/ml).

(2) hGH:n anto intranasaaliksi vesiliuoksena, formuloitu 17,57 mg/ml:aan (51,43 IU/ml). 40-kg lammas saisi siten 0,35 ml valmistetta kumpaankin sieraimen (yhteensä 0,70 ml).

(3) hGH:n anto intranasaaliksi yhdistelmänä tärkkelysmikropallosten (2,5 mg/kg) and LPC:n (0,20 mg/kg) kanssa lyofili-soituna jauheena. Valmisteen formulointiin 600 mg Spherexiä dispergoitiin 30 ml:aan steriiliä tislattua vettä, joka sisälsi 61.5 mg hGH:ta (180 IU) and 40 mg LPC:tä, sekoitettiin 1 h ja sitten pakastekuivattiin:

30 Liuosten intranasaaliseen antoon lampaan sieraimen asetettiin siniviivoitettu, 35 cm pitkä napakanyyli ennaltamäärättyyn 10-cm syvyyteen ennen liuoksen lisäystä 1-ml ruiskusta. Jauhevalmisteiden antamiseksi 6,5-mm BOC henkitorviputkeen (punaista kumia, taivutettu) lisättiin jauhevalmistetta, ja 35 se asetettiin sitten lampaan sieraimen määrättyyn 6-cm syvyyteen ennen jauheen puhaltamista nenäonteloon.

Lampaat oli nukutettava intranasaalista antoa varten ketamii-

nihydrokloridin IV-annoksella 2 mg/kg. Tämä oli tarkoitettu vastustamaan eläinten aivastamista annon aikana. Nukutus kesti noin 3 min.

- 5 Eläimet, jotka saivat hGH:ta ihonalaisesti, nukutettiin myös vastustamaan mahdollista ketamiinin vaikutusta mitattuihin veren hGH-tasoihin.

Kanyloidusta lampaan kaulalaskimosta otettiin 2-ml verinäyt-
10 teet heparinisoituihin (Li-hepariini) putkiin jäämurskaan ennen hGH:n antoa ja hetkillä 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240 ja 300 min annon jälkeen. Sentrifugoimalla (3000 r/min 4 °C:ssa) kerätty plasma säilytettiin -20 °C:ssa odottamassa ELISA-tekniikalla tehtävää analyysiä.

15

Kuvassa 9 esitetään saadut hGH-tasot yksinkertaisella hGH-li-
uoksen intranasaalisella annolla, hGH:n intranasaalisella an-
nolla yhdistelmänä mikropallosten ja LPC:n kanssa ja hGH:n
ihonalaisella ruiskeella. Tuloksista voidaan tehdä johtopää-
20 tös, ettei intranasaalisesti yksinkertaisena liuoksena annettu hGH absoroidu merkittävästi. Annettaessa hGH yhdistelmänä mikropallosten ja LPC-parannusainejärjestelmän kanssa hGH:n plasmataso kasvaa kuitenkin huomattavasti. Siten plasman huipputaso on kasvanut noin 10 ng/ml:sta noin 55 ng/ml:aan. Biosaata-
25 vuus ihonalaiseen ruiskeeseen verrattuna voidaan laskea noin 20 %:ksi.

Viitteet

1. Hussain, A., Hirai, S. ja Bawarshi, R., Nasal absorption of
30 natural contraceptive steroids in rats - progesterone absorption, J. Pharm. Sci. 70, 1981, s. 466 - 467.
2. Hussain, A., Hirai, S. ja Bawarshi, R., Nasal absorption of propranolol from different dosage forms by rats and dogs,
35 J. Pharm. Sci. 69, 1980, s. 1411 - 1413.
3. Salzman, R., Manson, J.E., Griffing, C.T., Kimmerle, R., Ruderman, N., McCall, A., Stoltz, E.I., Mullin, C., Small,

D., Armstrong, J. ja Melly, J.S., Intranasal aerosolized insulin, N. Eng. J. Med. 312, 1985, s. 1078 - 1084.

4. Chien, Y.W. ja Chang, S.F., Intranasal Dry Delivery for Systemic Medications CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 4, 67ug (1987).

5. Hanson, M., Gazdick, G., Cahill, J. ja Augustine, M., Intranasal delivery of the peptide, salmon calcitonin. Teok-
10 sessa S.S. Davis, L. Illum ja E. Tomlinson: Advanced Delivery Systems for Peptides and Proteins, Plenum Press, London, 1986, s. 233 - 242.

6. Gordon, G.F., Moses, A.C., Silver, R.D., Flier, G.F. ja
15 Carey, E., Nasal absorption of insulin: enhancement by hydrophobic bile salts, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1985, s. 7419 - 7423.

7. Illum. L., Jorgenson, H., Bisgaard, H., Krogsgaard, O.,
20 and Rossing N., Bioadhesive microspheres as a potential nasal drug delivery system. Int. J. Pharmaceut. 39, s. 189 - 199 (1987).

8. Nagai, T., Nishimoto. Y., Nambu, N., Suzuki, Y. ja Sekine,
25 K., Powder dosage form of insulin for nasal administration, J. Control. Rel. 1, 1984, s. 15 - 22.

9. Morimoto, K., Morisaka, K. ja Kamada, A., Enhancement of
nasal absorption of insulin and calcitonin using polyacrylic
30 acid gel, J. Pharm. Pharmacol. 37, 1985, s. 135 - 136.

10. S.S. Davis, L. Illum ja E. Tomlinson (toimittajat) Delivery systems for peptide drugs, plenum, New York, 1987.

35 11. de Vries, A.C.J., Batenburg, F.F. ja van Golde, L.M.G. Lysophosphatidylcholine acyltransferase and lysophosphatidylcholine:lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells from fetal rat lung. Biochem. Biophys. Acta 833

(1985) s. 93 - 99.

12. Christiansen, K. ja Carlsen, J, Reconstitution of a protein into lipid vesicles using natural detergents. Biochim. 5 Biophys. Acta 735 (1983) s. 225 - 233.
13. Davis S.S., Illum, L. McVie, J.G. ja Tomlinson E. (toimittajat) Microspheres and Drug Therapy, Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects, Elsevier Science Publishers 10 B.V., Amsterdam, 1983.
14. Fisher, A.N., Brown, K., Davis, S.S., Par, G.D. ja Smith D.A., The effect of molecular size on the nasal absorption of water soluble compounds by the albino rat, J. Pharm. Pharmacol. 39, 1987, s. 357 - 362.
15. Hirai, S., Yashiki, T., Matsuzawa, T. ja Mima, H., Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat, Int. J. Pharm. 7, 1981, s. 317 - 325.
- 20
16. O'Connell, M.B., Hein, K., Halstenson, C. ja Matzke, G.R. Heparin interference with tobramycin, netilmicin and gentamicin concentrations determined by EMIT. Drug Intell. Clin. Pharm. 18 (1984), s. 503 - 504.
- 25
17. Duchateau, G.S.M.J.E., Zuidema, F. ja Merkus, W.H.M. Bile salts and intranasal drug absorption. Int. J. Pharm. 31 (1986) s. 193 - 199.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä limakalvon läpi tapahtuvaan antoon tarkoitettun lääkkeenantojärjestelmän valmistamiseksi, joka järjestelmä käsittää suuren joukon mikropalloshiukkasia, jotka sisältävät vaikuttavan lääkkeen ja kuhunkin mikropalloshiukkaseen liittyyneen aineen, jolla on ominaisuus lisätä vaikuttavan lääkkeen biosaatavuutta limakalvon lävitse, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:
- 5
- i) valmistetaan mikropalloshiukkasia,
 - 10 ii) vaikuttava lääke ja aine sisällytetään mikropallosten valmistuksen aikana tai lääke ja aine sorboidaan mikropallosten sisään tai päälle niiden valmistuksen jälkeen, ja
 - iii) mahdollisesti pakastekuivataan vaiheesta ii) saatu tuote.
 - 15
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistettujen mikropallosten koko on välillä 10 - 100 μm .
- 20
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että aine on pinta-aktiivinen aine.
4. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mikropalloset valmistetaan tärkkelyksestä, tärkkelysjohdannaisista, gelatiinista, albumiinista, kollageenista, dekstraanista tai dekstraanijohdannaisista.
- 25
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mikropalloset valmistetaan tärkkelyksestä.
- 30
6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mikropalloset muodostetaan vaikuttavasta
- 35 lääkkeestä itsestään.

7. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se lisäksi käsittää vaiheen, jossa mikropalloset ristisidotaan.
- 5 8. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että biosaatavuutta lisäävä aine on lysofosfatidyylikoliini.
9. Jonkin patenttivaatimuksen 3-7 mukainen menetelmä, **tun-**
10 **nettu** siitä, että pinta-aktiivinen aine on ei-ioninen pinta-aktiivinen aine.
10. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistettu koostumus on tarkoitettu int-
15 ranasaaliseen antoon.
11. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että lääke on biologisesti aktiivinen polypeptidi tai sen johdannainen, jonka molekyylipaino on 1000 -
20 300000.
12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että polypeptidi on insuliini tai kasvuhormoni.
- 25 Patentkrav
1. Förfarande för framställning av ett läkemedelsavgivande system för transmukosal avgivning, vilket system innehåller ett flertal mikrosfärpartiklar, som innehåller ett aktivt läkemedel och ett med varje partikel förbundet material, som har
30 egenskapen att öka det aktiva läkemedlets biotillgänglighet över ett slemhinne-membran, **kännetecknat** av att förfarandet omfattar följande steg:
- i) framställning av mikrosfärpartiklar,
ii) införlivande av det aktiva läkemedlet och materialet un-
35 der framställningen av mikrosfärerna eller sorbering av läkemedlet och materialet in i eller på mikrosfärerna efter deras framställning, och
iii) möjligen frystorkning av produkten från steg ii).

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att de framställda mikrosfärerna har en storlek mellan 10 och 100 μm .

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** av att materialet är ett ytaktivt material.

4. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att mikrosfärerna framställs från stärkelse, stärkelsederivat, gelatin, albumin, kollagen, dextran eller dextranderivat.

5. Förfarande enligt patentkrav 4, **kännetecknat** av att mikrosfärerna framställs från stärkelse.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, **kännetecknat** av att mikrosfärerna bildas från det aktiva läkemedlet självt.

7. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att det ytterligare omfattar ett steg där mikrosfärerna tvärbindes.

8. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att det material, som ökar biotillgängligheten, är ett lysofosfatidylkolin.

9. Förfarande enligt något av patentkraven 3-7, **kännetecknat** av att det ytaktiva medlet är ett ickejoniskt ytaktivt medel.

10. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att den framställda kompositionen är avsedd för intranasal ingivning.

11. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att läkemedlet är en biologiskt aktiv polypeptid eller ett derivat därav med en molekylvikt från 1000 till 300000.

12. Förfarande enligt patentkrav 11, **kännetecknat** av att polypeptiden är insulin eller tillväxthormon.

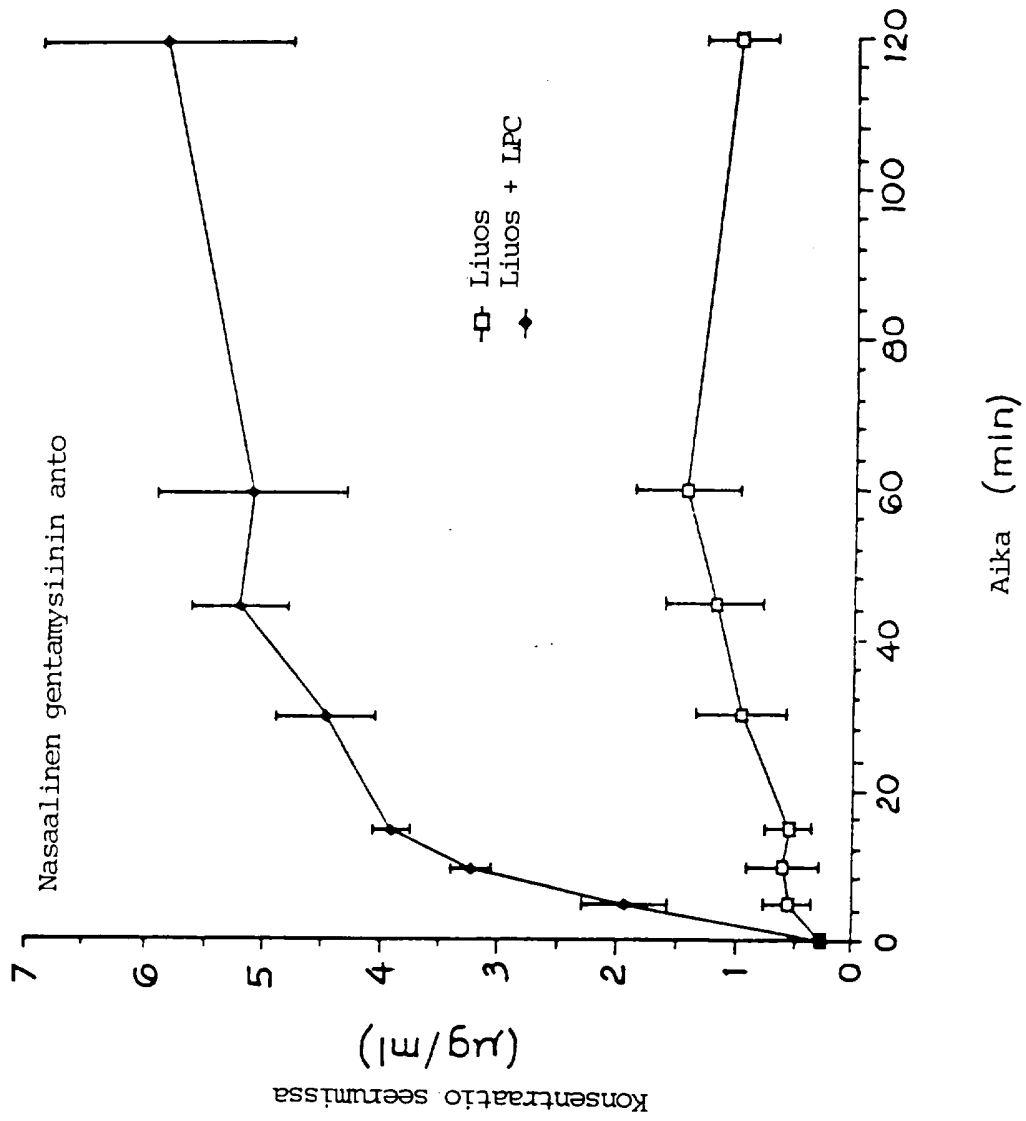


Fig. 1

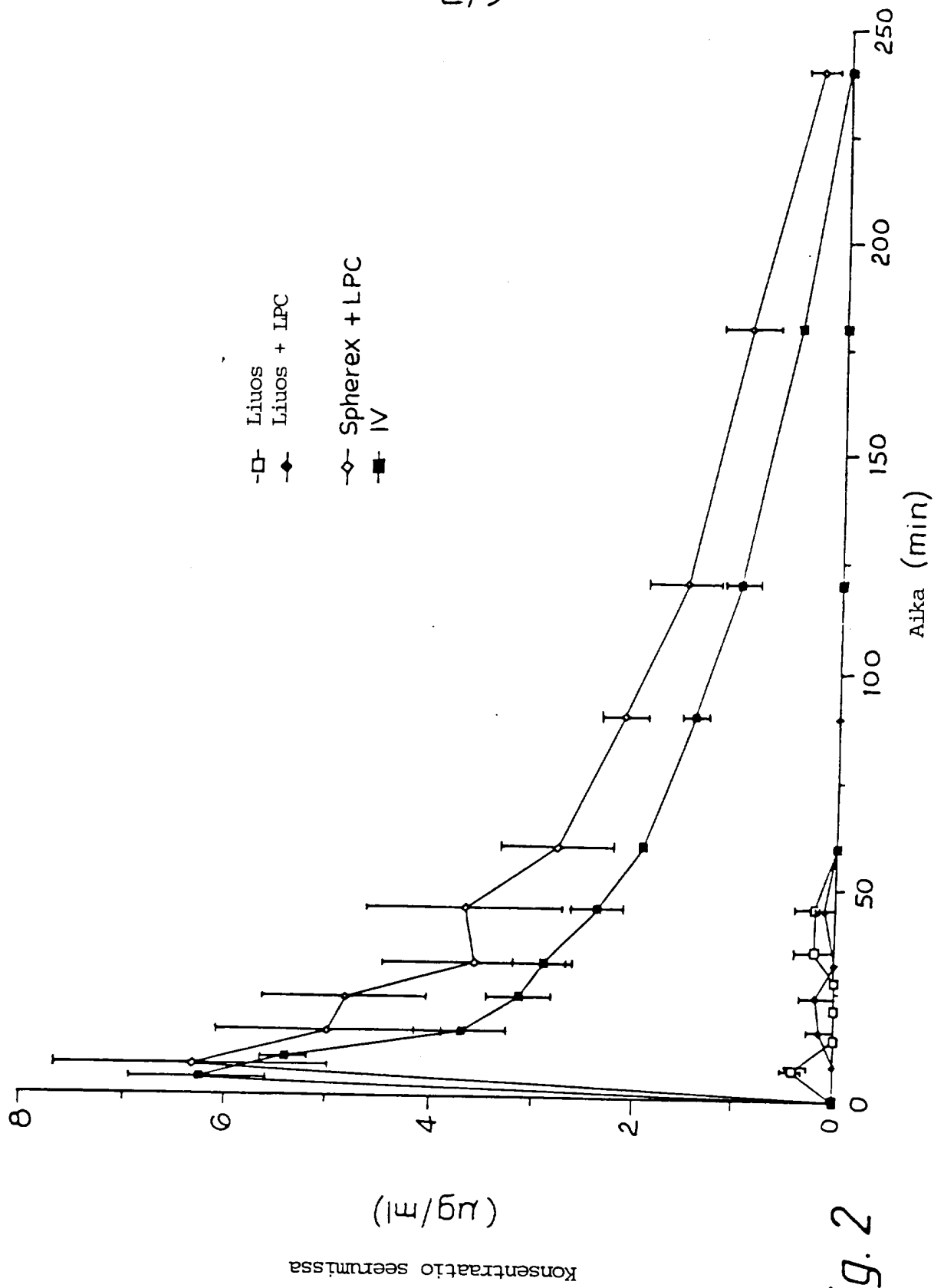


Fig. 2

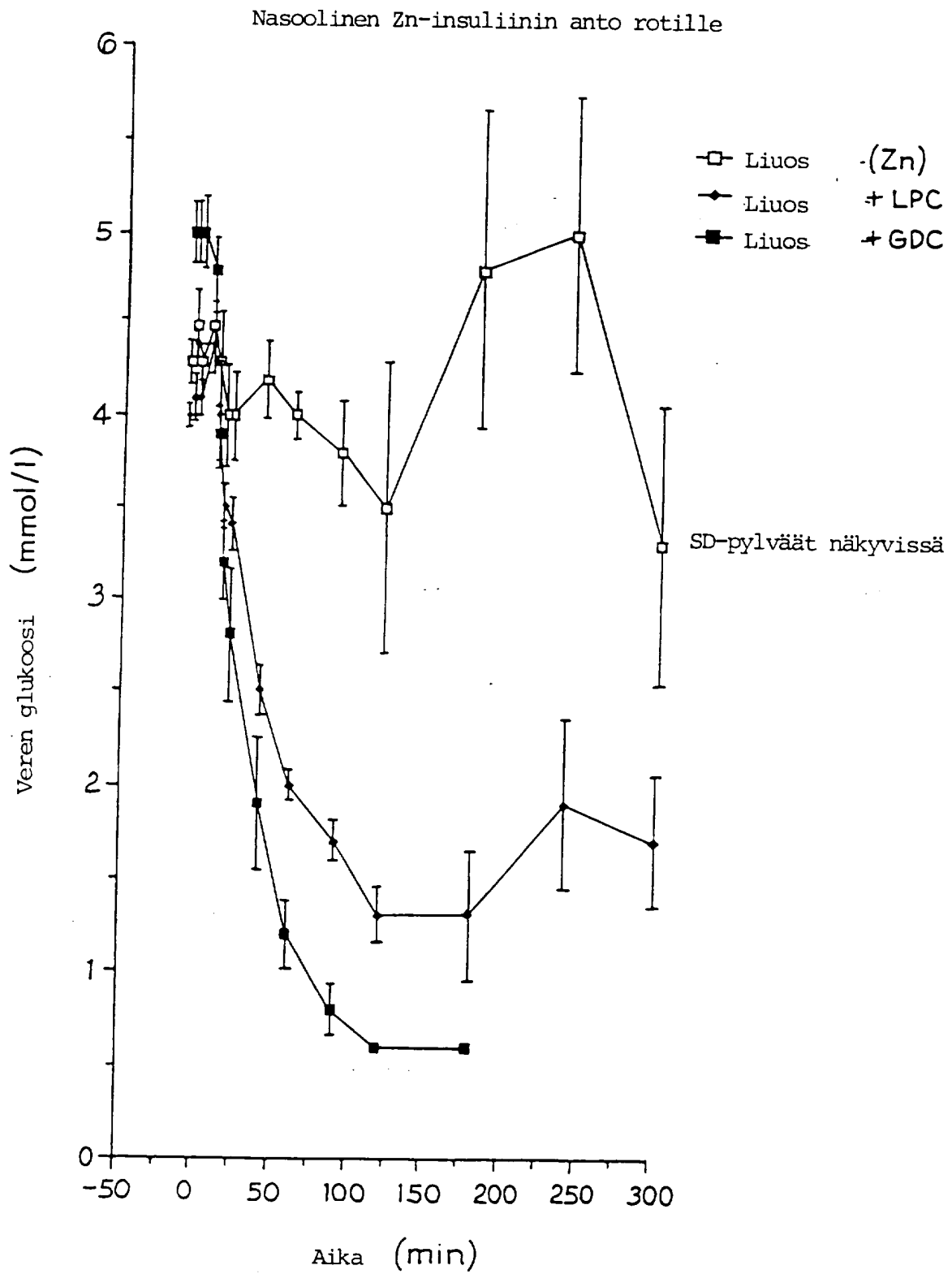


Fig. 3

4/9

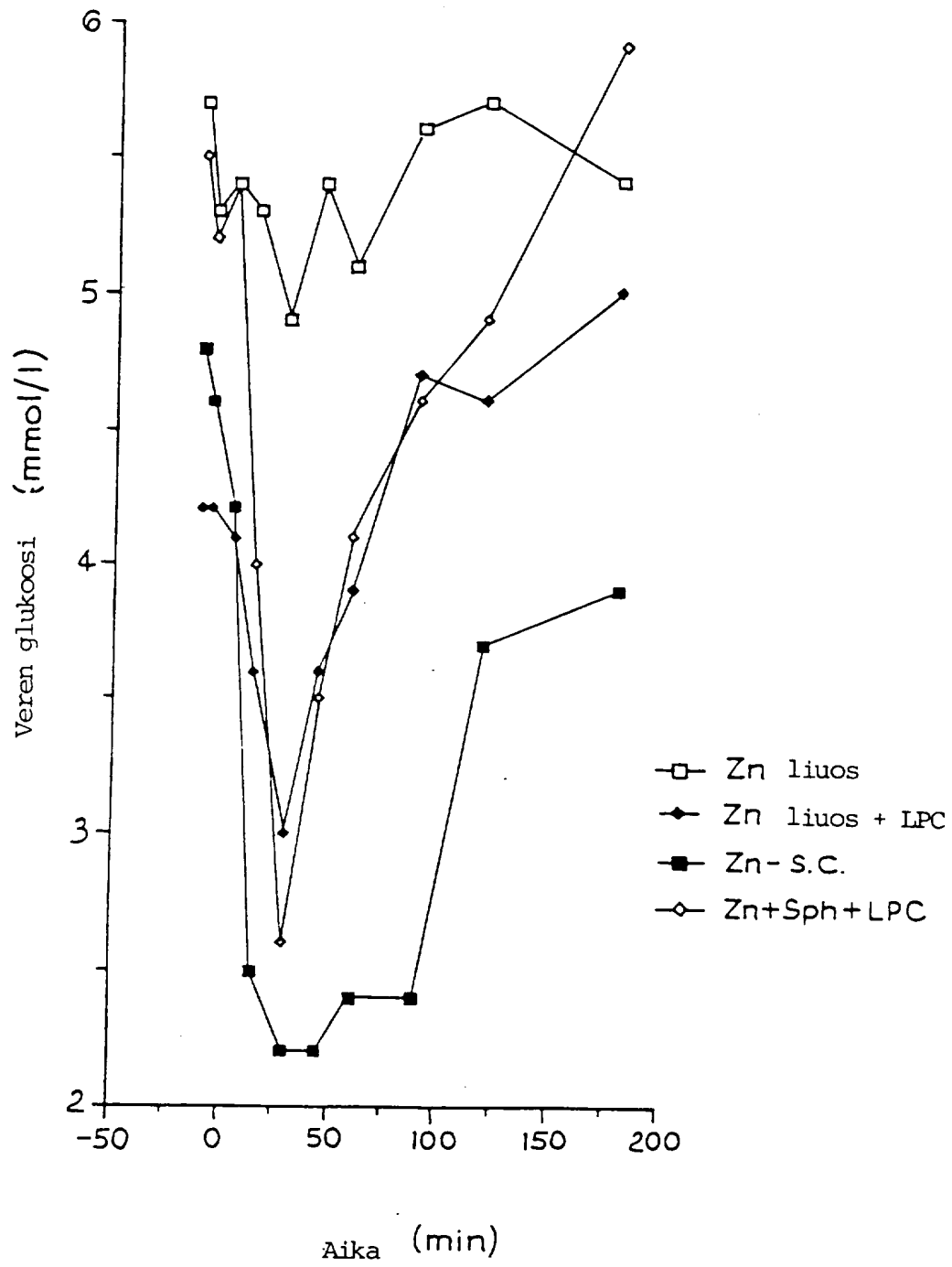


Fig. 4

5/9

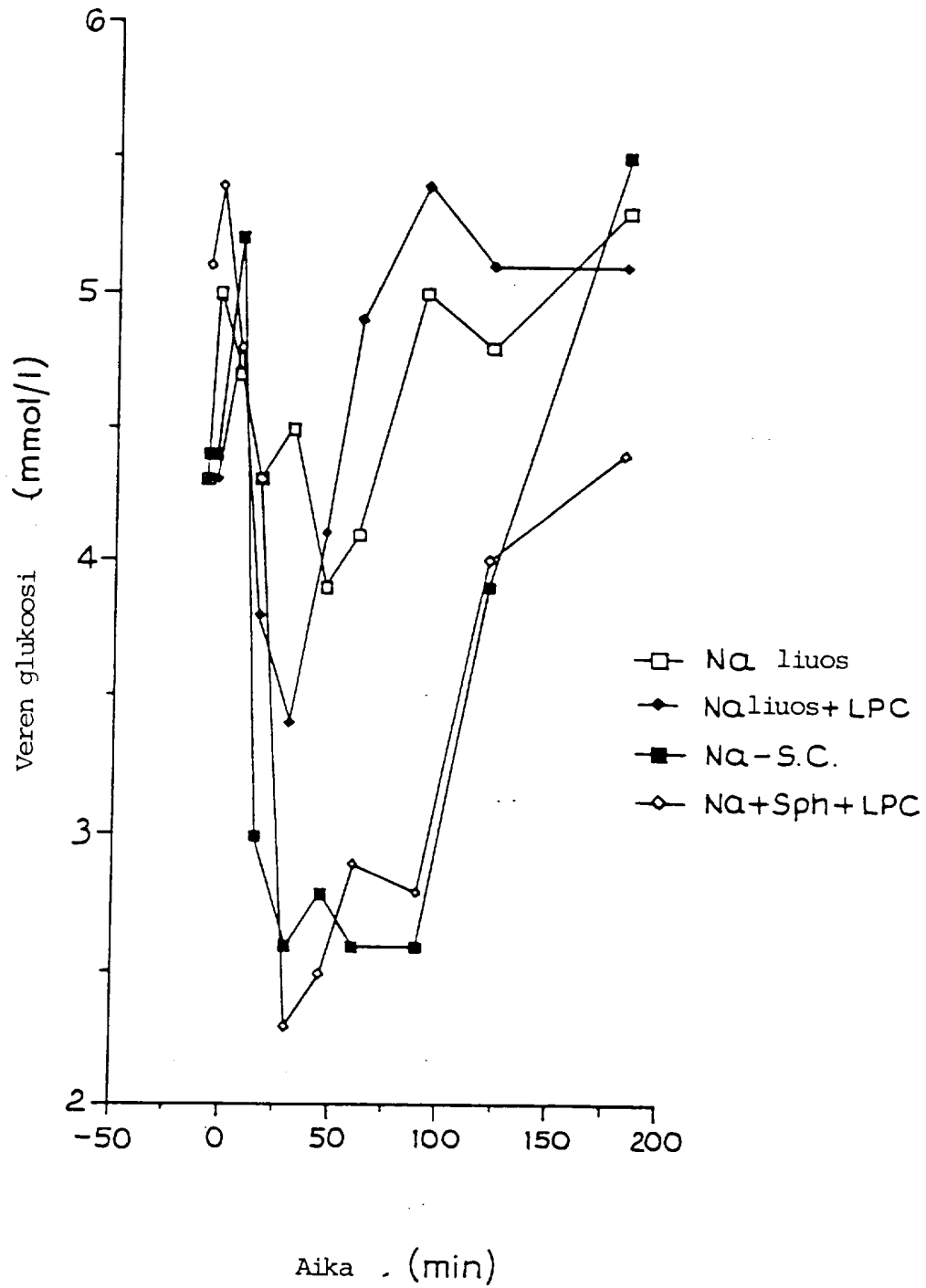


Fig. 5

6/9

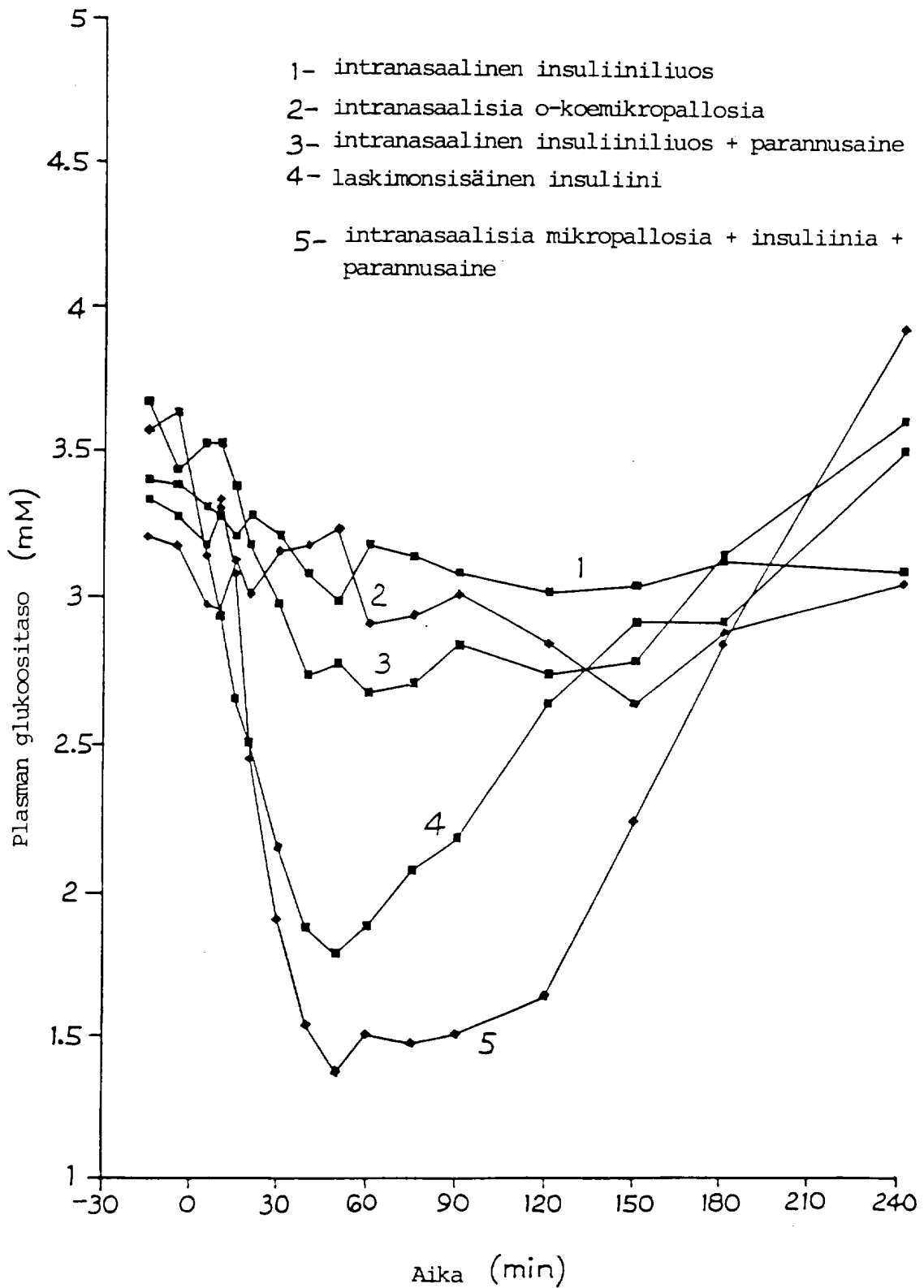


Fig. 6

7/9

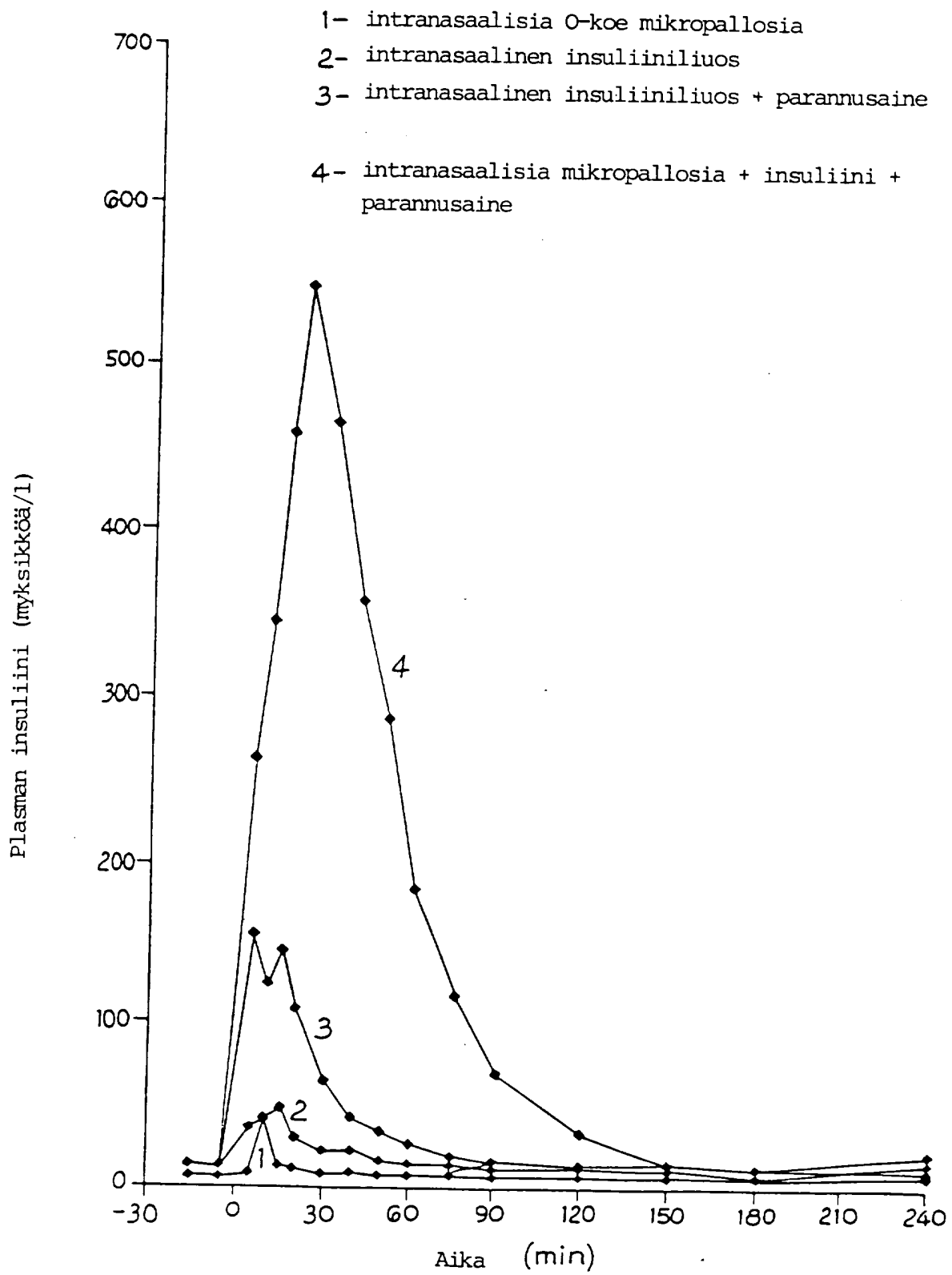


Fig. 7

"Rotta hGH-kokeen" tulokset

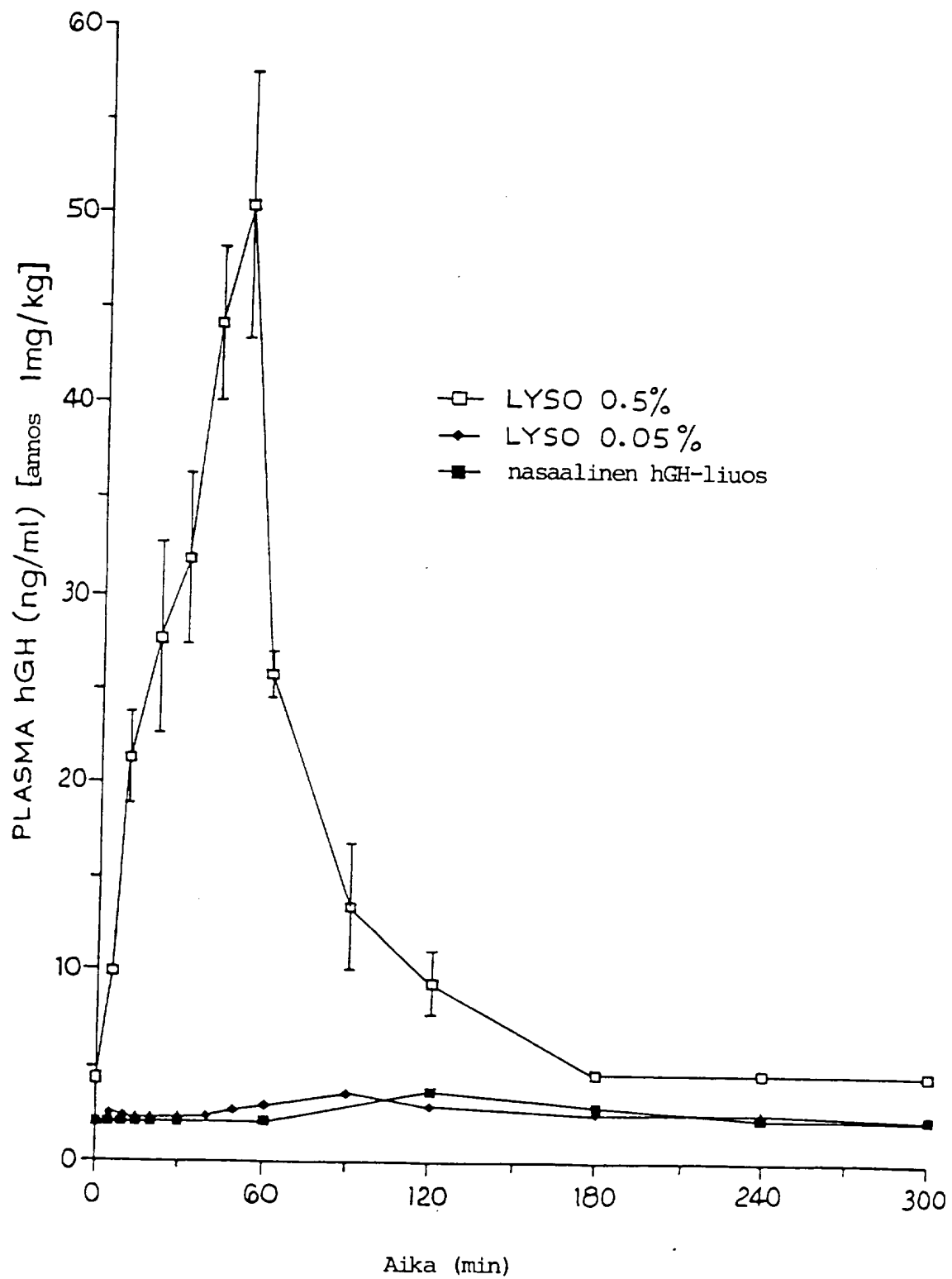


Fig. 8

9/9

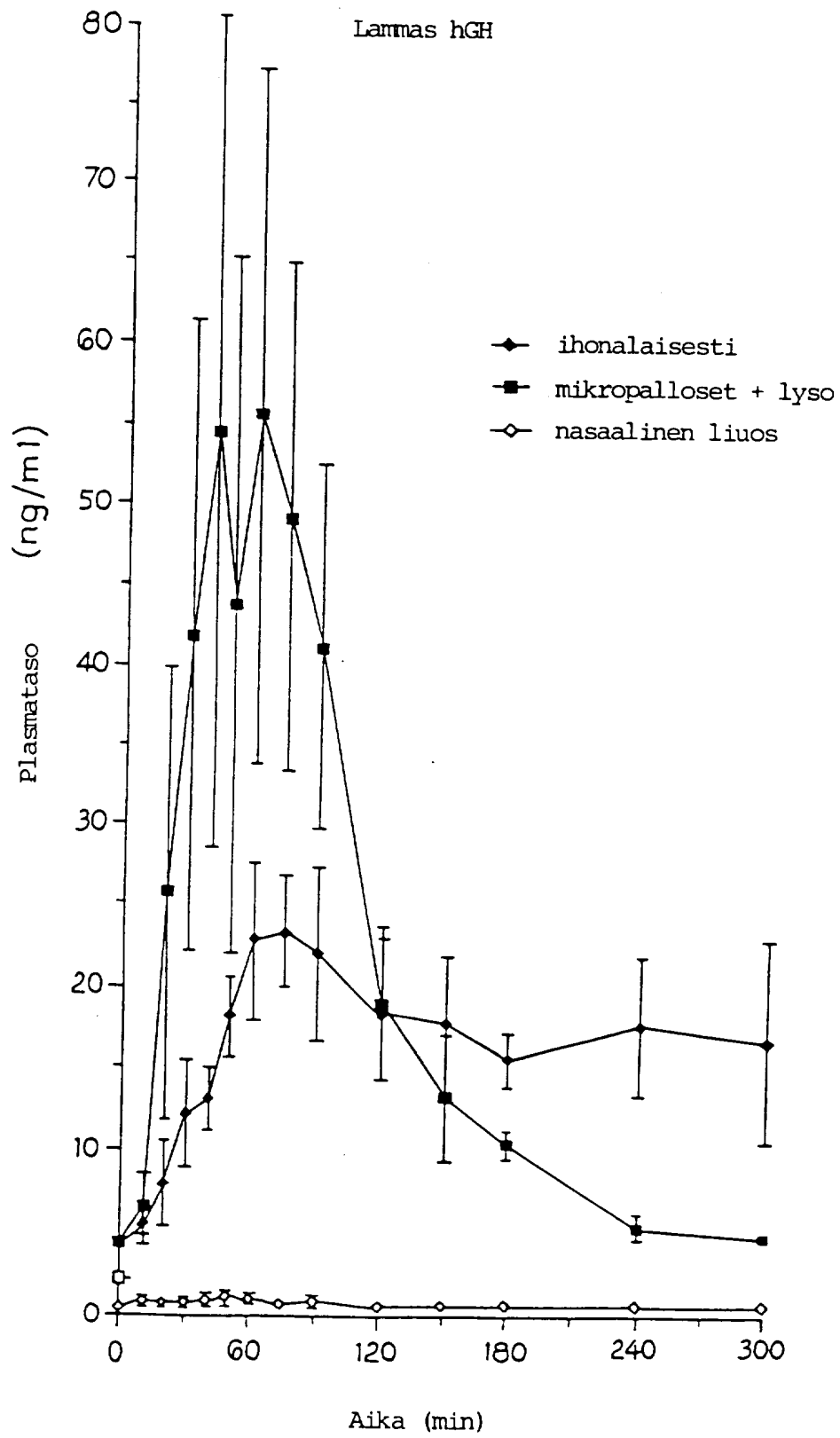


Fig. 9