

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

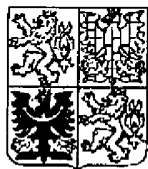
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3908-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03. 06. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.06.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/478502**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 05. 98**
(Věstník č. 5/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/08474**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/40073**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 9/16
A 61 K 38/18

(71) Přihlašovatel:

ALKERMES CONTROLLED THERAPEUTICS,
INC., Cambridge, MA, US;

(72) Původce:

Zale Stephen E., Hopkington, MA, US;
Burke Paul A., Medford, MA, US;
Bernstein Howard, Cambridge, MA, US;
Brickner Avram, Brookline, MA, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273,
Praha 4, 14021;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Přípravek pro kontrolované uvolňování
biologicky aktivního neagregovaného
erythropoetinu

(57) Anotace:

Předmětem tohoto vynálezu je přípravek pro kontrolované uvolňování neagregovaného biologicky aktivního erythropoetinu, sestávající z polymerní matrice tvořené blokompatibilním polymerem a z částecek biologicky aktivního erythropoetinu rozptýlených v této polymerní matici. Způsob, kterým je tento přípravek pro kontrolované uvolňování erythropoetinu připravován, spočívá v rozpuštění blokompatibilního polymeru ve vhodném rozpouštědle, dispergaci částecek erythropoetinu v takto vzniklém roztoku polymeru a v následujícím ztužení polymeru za vzniku polymerní matrice obsahující částčky erythropoetinu. Předmětem tohoto vynálezu je dále způsob použití tohoto přípravku pro kontrolované uvolňování, umožňující dlouhodobé udržování účinné koncentrace biologicky aktivního nereagujícího erythropoetinu v krevním séru léčené osoby.

CZ 3908-97 A3

**Přípravek pro kontrolované uvolňování biologicky aktivního
neagregovaného erythropoetinu**

Oblast techniky

Tento vynález se týká přípravku pro kontrolované uvolňování biologicky aktivního neagregovaného erythropoetinu (EPO).

Dosavadní stav techniky

Erytropoetin (EPO) je glykoprotein, který je možno izolovat z moči, nebo je možno jej syntetizovat metodou rekombinačního genetického inženýrství. Je používán jako aktivní látka způsobující zvýšení počtu červených krvinek.

Běžná tvorba červených krvinek vyžaduje sekreci erythropoetinu v ledvinách. Erythropoetin řídí vznik a diferenciaci populace kmenových buněk v kostní dřeni, stimuluje syntézu hemoglobinu v dospívajících erythroidních buňkách, urychluje uvolňování červených krvinek z kostní dřene do krevního oběhu a tím zvyšuje celkové množství červených krvinek.

EPO je obvykle používán pro léčení anemie, zvláště je-li anemie spojena se selháním ledvin. V současné době je pro udržování dostatečné koncentrace EPO v krevním séru tato látka podávána ve formě vodných roztoků subkutánně nebo intravenózně třikrát týdně.

U nemocných, kterým je dlouhodobě podáván EPO ve formě injekcí, dochází k výraznému kolísání jeho koncentrace v séru, tento způsob aplikace je rovněž pro nemocného nepohodlný.

Aby byly vyřešeny problémy spojené s opakovaným injikováním vodných roztoků, byly činěny pokusy navrhnout přípravky obsahující větší dávky EPO, než jsou dávky používané v injekcích, ze kterých by se EPO uvolňoval *in vivo* po dobu jednoho týdne nebo delší.

Nevýhodou těchto přípravků však je, že obvykle je rychlost uvolňování na počátku příliš vysoká, poté však klesá na příliš

nízké hodnoty. Dále se po uplynutí několika dnů vlivem vysoké koncentrace EPO v těchto přípravcích pro kontrolované uvolňování projevuje tendence molekul EPO (monomeru) ke tvorbě agregátů, které jsou na rozdíl od monomeru EPO *in vivo* imunogenní.

Proto existuje potřeba vyvinout prostředky pro kontrolované uvolňování biologicky aktivního EPO *in vivo*, které by po dobu uvolňování EPO nevyvolávaly imunitní odezvu.

Podstata vynálezu

Stručný popis vynálezu

Přípravek pro kontrolované uvolňování podle tohoto vynálezu sestává z polymerní matrice tvořené biokompatibilním polymerem a z částecek biologicky aktivního EPO stabilizovaného proti agregaci, které jsou rozptýleny v tomto biokompatibilním polymeru.

Způsob podle tohoto vynálezu, kterým je získáván přípravek pro kontrolované uvolňování neagregovaného EPO spočívá v rozpuštění biokompatibilního polymeru v rozpouštědle tohoto polymeru, kterým vzniká jeho roztok, v dispergaci částecek biologicky aktivního EPO stabilizovaného proti agregaci v polymerním roztoku a v následném ztužení polymeru, kterým se vytvoří polymerní matrice obsahující disperzi zmíněného EPO.

Výhodou tohoto přípravku pro kontrolované uvolňování EPO je delší doba trvání stálých koncentrací EPO v krvi, snížení počátečních vysokých koncentrací EPO na počátku uvolňování a zlepšení léčebných účinků, způsobené odstraněním kolísání v koncentracích EPO v krevní plazmě. Výhodou je rovněž skutečnost, že aplikace je pohodlnější pro nemocného, protože se snižuje počet injekcí. Výhodou je dále možnost použití menších množství EPO ve srovnání s množstvími, která jsou potřebná při aplikaci běžnými injekcemi, protože koncentrace EPO jsou udržovány na hodnotách bližších prahovým terapeutickým koncentracím.

Stručný popis obrázků

Na obr. 1 je znázorněna závislost a) celkového množství uvolněného monomerního EPO na čase, b) celkového množství uvolněného EPO (monomerní EPO plus agregovaný EPO) na čase, c) podílu EPO v procentech, který je uvolňován jako monomer v časovém intervalu ohraničeném daným experimentálním bodem a bezprostředně předcházejícím experimentálním bodem. Jedná se o uvolňování *in vitro* v HEPES-puftru z mikrosfér neblokovaného poly(laktidu-co-glykolidu) (PLGA, molekulová hmotnost 10 000), obsahujícího 10 hmot. % MgCO_3 a 5 hmot. % směsi Am1 z příkladu 1. Celková doba měření byla 28 dní.

Na obr. 2 je znázorněna závislost a) celkového množství uvolněného monomerního EPO na čase, b) celkového množství uvolněného EPO (monomerní EPO plus agregovaný EPO) na čase, c) podílu EPO v procentech, který je uvolňován jako monomer. Jedná se o uvolňování *in vitro* v HEPES-puftru z mikrosfér neblokovaného PLGA, (molekulová hmotnost 10 000), obsahujícího 10 hmot. % MgCO_3 a 5 hmot. % směsi Am7 z příkladu 1. Celková doba měření byla 28 dní.

Na obr. 3 je znázorněna závislost a) celkového množství uvolněného monomerního EPO na čase, b) celkového množství uvolněného EPO (monomerní EPO plus agregovaný EPO) na čase, c) podílu EPO v procentech, který je uvolňován jako monomer. Jedná se o uvolňování *in vitro* v HEPES-puftru z mikrosfér neblokovaného PLGA, (molekulová hmotnost 10 000 Dalton), obsahujícího 10 hmot. % MgCO_3 a 5 hmot. % směsi Zn1 z příkladu 1. Celková doba měření byla 28 dní.

Na obr. 4 je znázorněna závislost podílu retikulocytů v krvi krys, které byly podrobeny nebo nebyly podrobeny proceduře CS/HC, a kterým bylo ve dni 0 subkutánně injikováno 10 000 jednotek EPO obsaženého v mikrosférách pro kontrolované uvolňování RMAm7, popsaných v příkladu 5, a kterým bylo ve dni 28 injikováno 2000 jednotek EPO ve formě vodného roztoku. Celková doba měření byla 28 dní.

Na obr. 3 je znázorněna závislost koncentrace (v IU/ml) EPO v krevním séru krys, kterým byly subkutánně aplikovány různé

mikrosféry obsahující EPO, popsané v příkladu 3. Celková doba měření byla 28 dní.

Na obr. 6 je znázorněna časová závislost podílu retikulocytů v krvi krysa, kterým bylo subkutánně injikováno 10 000 mikrosfér podle příkladu 2, obsahujících směs AM7 z příkladu 1 v neblokovaných polymerech s molekulovou hmotností a) 10 000 Dalton, b) 31 000 Dalton nebo c) 48 000 Dalton. Celková doba měření byla 28 dní.

Podrobný popis vynálezu

Termín erytropoetin (EPO), jak je užíván v tomto dokumentu, znamená všechny formy EPO, jako je EPO- α a EPO- β . EPO může být získáván ze surovin živočišného původu, nebo může být vyráběn způsobem popsaným v patentu USA č. 4 703 008.

EPO používaný při postupech podle tohoto vynálezu je biologicky aktivní EPO v molekulární (monomerní t.j. neagregované) formě. Typickou vlastností monomerního EPO je to, že není imunogenní.

Agregované molekuly EPO mohou ztratit svoji schopnost být biologicky aktivní a stimulovat tvorbu červených krvinek. Agregovaný EPO může dále vyvolávat imunitní odezvu, jejímž důsledkem je tvorba protilátek proti EPO. Tím může být snížena účinnost dlouhodobé léčby pomocí EPO. Navíc může agregovaný EPO stimulovat autoimunitní odezvu na vlastní EPO.

Kontrolované uvolňování biologicky aktivního neagregovaného erytropoetinu umožňuje, aby se v krevním séru udržovaly měřitelné koncentrace biologicky aktivního monomerního EPO po delší dobu než při přímé aplikaci vodných roztoků EPO. S výhodou je doba, po kterou probíhá kontrolované uvolňování, týden nebo déle než týden, výhodněji je tato doba dva týdny nebo více.

Kontrolované uvolňování biologicky aktivního neagregovaného EPO z polymerní matrice může být nepřerušované nebo přerušované, rychlosti uvolňování mohou být relativně stálé, nebo se mohou měnit. Stálost rychlosti uvolňování a dosahované koncentrace mohou být m.j. dosaženy použitím jednoho nebo více typů polymerních přípravků, koncentrací EPO v těchto přípravcích

a/nebo volbou vhodných vehikul.

V tomto dokumentu uváděný erythropoetin, který je stabilizován proti vzniku agregátů, je tvořen biologicky aktivním monomerním EPO, který je stabilizován proti agregaci alespoň jedním protiagregačním činidlem. V jednom provedení jsou jako materiály, vhodné jako stabilizátory proti agregaci, používány látky, které snižují rozpustnost EPO ve vodných kapalinách, jako je PBS, HEPES nebo tělní tekutiny (např. lymfa). Tím se lokální koncentrace EPO udržuje v oblasti nižších koncentrací, než jsou koncentrace, při kterých dochází k výrazné agregaci molekul EPO. Lokální koncentrace EPO znamená ve smyslu tohoto dokumentu koncentraci EPO uvnitř, mezi nebo v bezprostředním okolí mikročástic používaných pro kontrolované uvolňování této látky.

V jiném provedení jsou vhodnými protiagregačními činidly cukry, které z neznámých důvodů zabráňují výraznější agregaci monomerního EPO.

Významná agregace je agregace v takovém rozsahu, který přesahuje 10 % počátečního množství enkapsulovaného monomerního EPO. S výhodou je míra agregace udržována pod 5 % původně přítomného množství EPO. Výhodněji je míra agregace udržována pod 2 % původně přítomného množství EPO. Bližší informace týkající se míry agregace pozorované při kontrolovaném uvolňování prováděném postupy podle tohoto vynálezu se nacházejí v příkladech 3 a 4.

V jednom provedení je použitím protiagregačního činidla dosahováno snížení rozpustnosti EPO jeho srážením z vodného prostředí a v důsledku toho udržováním nízké lokální koncentrace EPO. Vhodnými materiály, kterými se dosahuje vysrážení proteinu bez toho, že by zároveň byl denaturován jsou soli Hofmeisterovy řady srážedel krevních globulinů (neboli "vysolovací soli"), uvedené v knize Thomase E. Creightona: "Proteins: Structures and Molecular Principles", str. 149 až 150 (vydáno W.H. Freeman and Company, New York). Vysolovacími solemi, vhodnými pro použití při postupech podle tohoto vynálezu, jsou například soli, které obsahují jeden nebo více kationtů Mg^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , nebo soli obsahující jeden nebo více aniontů SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , acetátový

anion, citrátový anion, šťavelanový anion, Cl^- , NO_3^- , I^- , ClO_4^- , a SCN^- .

V jiném provedení je protiagregačním činidlem cukr nebo cukry, jako například mannitol.

Vhodnost požití určité látky jako protiagregačního činidla stabilizujícího roztoky EPO může být odborníkem v této oblasti stanovena použitím různých metodik, jako je SEC, elektroforéza s použitím polyarylamidového gelu (polyacrylamide gel electrophoresis - PAGE) a zkoušky účinku proteinu uvolněného z částecek obsahujících EPO a příslušné protiagregační činidlo, případně trvání uvolňování z přípravků pro kontrolované uvolňování, které jsou popsány v příkladu 3.

Vhodnými částeckami biologicky aktivního erythroproteinu stabilizovaného proti agregaci jsou pevné částčky získané lyofilizací, vymrazováním, lisováním a jakýmkoliv jiným způsobem, vhodným pro přípravu pevných částic ze směsi dvou složek (např. ze směsi EPO a protiagregačního činidla), z nichž jedna není odolná zvýšeným teplotám.

Je-li biologicky aktivní a proti agregaci stabilizovaný EPO lyofilizován, je výhodné, aby tento EPO rovněž obsahoval pufr, který udržuje pH v rozmezí, ve kterém nedochází k významným ztrátám biologické aktivity v důsledku změn pH, které nastávají během lyofilizace. Vhodným pH je pH v rozmezí 4,0 až 8,0. Preferováno je pH v rozmezí 5,0 až 7,0. Vhodných hodnot pH se zpravidla dosáhne použitím vodných pufrů, jako je například hydrogenuhličitan sodný. Příklady vhodných pufrů jsou fosfátové pufrы, citrátové pufrы a jejich kombinace.

Částice EPO může rovněž obsahovat jiná aditiva, jako jsou stabilizátory a aditiva zvětšující objem. Stabilizátory jsou přidávány pro udržování účinnosti EPO po celou dobu jeho uvolňování. Vhodné stabilizátory, například cukry, aminokyseliny, mastné kyseliny a povrchově aktivní látky jsou známy odborníkům v příslušné oblasti. Množství použitého stabilizátoru se určí na základě hmotnostního poměru k EPO. Hmotnostní poměr pro aminokyseliny, mastné kyseliny a cukry, jako je sacharóza, maltóza, inulin, dextran a heparin je obvykle 1:1 až 20:1. Pro povrchově aktivní látky, jako je TweenTM

a PluronicTM, je hmotnostní poměr povrchově aktivní látky k EPO obvykle 0,01:1 až 1:1.

Aditivы zvyšujícími objem jsou běžně inertní materiály. Vhodná aditiva zvyšující objem jsou známa odborníkům v dané oblasti.

Polymery vhodné pro vytváření polymerní matrice pro kontrolované uvolňování při postupech podle tohoto vynálezu jsou biokompatibilní polymery, které mohou být buď biodegradovatelné nebo nebiodegradovatelné, nebo jejich směsi a kopolymery.

Termín "biodegradovatelný", jak je užíván v tomto dokumentu, znamená, že příslušná kompozice je *in vivo* degradována nebo erodována za vzniku chemických sloučenin o nižší molekulové hmotnosti. K degradaci může docházet enzymatickými, chemickými a fyzikálními procesy. Vhodnými biokompatibilními a zároveň biodegradovatelnými polymery jsou například polylaktidy, polyglykolidy, poly(laktidy-co-glykolidy), kyselina polymléčná, kyselina polyglykolová, kopolymery kyseliny mléčné a glykolové, polykaprolakton, bpolykarbonáty, polyesteramidy, polyanhydridy, polyaminokyseliny, polyorthoestery, polykyanoakryláty, poly-(*p*-dioxanon), polyalkylenoxaláty, biodegradovatelné polyurethany a jejich směsi a kopolymery. Biokompatibilními nebiodegradovatelnými polymery, vhodnými pro použití podle tohoto vynálezu, jsou nebiodegradovatelné polymery zvolené ze skupiny tvořené polyakryláty, kopolymery ethylen-vinylacetát, estery celulózy, nedegradovatelné polyurethany, polystyreny, polyvinylchlorid, polyvinylfluorid, poly(vinylimidazol), chlorsulfonované polyolefiny, polyethylenoxid, jejich směsi a kopolymery.

Polymer nebo polymerní matrice jsou biokompatibilní, jsou-li polymer nebo jakékoliv produkty vznikající jeho degradací pro příjemce netoxické a nemají-li na příjemce žádný významný škodlivý nebo nepříjemný vliv, jakým je například imunitní reakce v místě, kde tato látka byla injikována.

Koncové skupiny polymeru mohou být dále modifikovány. Tak například mohou být polyesterý buď blokovány nebo neblokované, nebo se může jednat o směs blokových a neblokových polymerů. Blokové polymery jsou běžně známy z dosavadního stavu

techniky, zvláště se jedná o polymery s blokovánými karboxylovými skupinami. Obecně jsou blokující skupiny odvozeny od iniciátoru polymerace. Neblokovanými polymery jsou obvykle polymery s jejichž koncovými skupinami jsou karboxyly.

Přijatelné molekulové hmotnosti polymerů používaných při postupech podle tohoto vynálezu mohou být určovány osobou, která je zkušená v daném oboru. Je třeba při tom brát v úvahu takové faktory, jako je požadovaná rychlost degradace polymeru, fyzikální vlastnosti jako je mechanická pevnost a rychlost rozpouštění polymeru v rozpouštědle. Obvykle je přijatelné rozmezí molekulových hmotností 2000 Dalton až 2 000 000 Dalton. V preferovaném provedení je polymerem degradovatelný polymer nebo kopolymer. Ve více preferovaném provedení je polymerem poly(laktid-co-glykolid) (dále "PLGA") s poměrem laktid:glykolid 1:1 a s molekulovou hmotností 5000 až 70 000 Dalton. V ještě více preferovaném provedení tohoto vynálezu je molekulová hmotnost PLGA 10 000.

Množství EPO, který je obsažen v jedné dávce mikrosfér obsahujících biologicky aktivní EPO stabilizované proti agregaci, používaných pro kontrolované uvolňování nebo v alternativní lékové formě vhodné pro kontrolované uvolňování léčiv je terapeuticky a profylakticky účinné množství, které může určit osoba zkušená v daném oboru s přihlédnutím k takovým faktorům jako jsou tělesná hmotnost, stav pacienta, typ použitého polymeru a rychlost uvolňování z tohoto polymeru.

V jednom z provedení obsahuje přípravek pro kontrolované uvolňování EPO obsahovat 50 hmot. % biologicky účinného EPO ve formě částecek, stabilizovaného proti agregaci. Množství EPO ve formě částecek, které je použito, závisí na požadovaném účinku, předpokládaných koncentracích uvolněné látky a době po kterou bude docházet k uvolňování EPO. Preferovaný obsah částecek EPO je 0,1 až 30 hmot. %. Více preferovaným obsahem částecek EPO je 0,1 až 10 hmot. %. Nejvíce preferovaným obsahem částecek EPO je 5 hmot. %.

V jiném provedení obsahuje přípravek pro kontrolované uvolňování EPO rovněž biokompatibilní složku s kationtem kovu, která není obsažena v biologicky aktivních a proti agregaci

stabilizovaných částech EPO, ale je rozptýlena v polymeru.

Složka obsahující kation kovu je složkou jejíž součástí je alespoň je alespoň jeden druh kationtů kovů s více náboji (s nábojem +2 a vyšším) v nedisociovaném stavu, nebo v částečně disociovaném stavu. Vhodnými sloučeninami kovů jsou například soli kovů, hydroxydy kovů a bazické soli slabých kyselin a hydroxydů kovů (s pH 7 nebo vyšším). S výhodou je náboj kationtu kovu +2.

Složka s kationtem kovu je biokompatibilní, je-li při použití dávkování pro příjemce netoxická a nevykazuje-li na příjemce žádný významný škodlivý nebo nepříjemný vliv, jakým je například imunitní reakce v místě, kde byla injikována. Složka s kationtem kovů může případně obsahovat kation nebo anion, který je obsažen v protiagregačním činidle v částech EPO. Tato složka s kationtem kovu působí tak, že ovlivňuje průběh uvolňování EPO z polymerní matrice přípravku pro kontrolované uvolňování a může rovněž zvyšovat stabilitu EPO v přípravku. Při tomto modulovaném uvolňování EPO je alespoň jeden parametr charakterizující uvolňování, jako je například počáteční rychlost uvolňování, rychlost uvolňování v období následujícím po počátečním období, doba uvolňování a/nebo množství uvolněného EPO, odlišný od charakteristických parametrů uvolňování EPO v případě, že polymerní matrice neobsahuje dispergovanou složku s kationtem kovu.

Složka s kationtem kovu používaná pro modulaci uvolňování obsahuje obvykle alespoň jeden kation kovu s více náboji. Příklady kationtů kovů vhodných modulovat uvolňování EPO jsou dále uvedené sloučeniny, nebo látky tyto sloučeniny obsahující, například: $Mg(OH)_2$, $MgCO_3$ (jako $4MgCO_3 \cdot Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$), $ZnCO_3$ (jako je $3Zn(OH)_2 \cdot 2ZnCO_3$), $CaCO_3$, $Zn_3(C_6H_5O_7)_2$, $Mg(OAc)_2$, $MgSO_4$, $Zn(OAc)_2$, $ZnSO_4$, $ZnCl_2$, $MgCl_2$, a $Mg_3(C_6H_5O_7)_2$. Vhodný hmotnostní poměr složky s kationtem kovu k polymeru je 1:99 až 1:2. Optimální poměr závisí na použitém polymeru a na použité složce s kationtem kovu. Polymerní matrice obsahující dispergovanou složku s kationtem kovu, schopnou modulovat uvolňování biologicky aktivní látky z polymerní matrice je dále popsána v přihlášce vynálezu USA, č. 08/237 057, podané 3. května 1994

a v přihlášce vynálezu PCT/US95/05511, které jsou v řízení současně s touto přihláškou vynálezu a které jsou zde uvedeny jako odkazy.

V ještě dalším provedení je v mikročástěce obsažena alespoň jedna látka tvořící póry, jakou je například vodorozpustná sůl, cukr nebo aminokyselina, jejíž přítomnost způsobuje změnu struktury mikročástěčky. Koncentrace látky tvořící póry, přidané do roztoku polymeru je 1 až 30 hmot. %. S výhodou obsahuje nebiodegradovatelná polymerní matrice podle tohoto vynálezu alespoň jednu látku tvořící póry.

Přípravek pro kontrolované uvolňování EPO podle tohoto vynálezu může být formován do různých tvarů jako je folie, granule, válec, disk nebo mikročástice. Termínem "mikročástice", jak je užíván v tomto dokumentu, se rozumí polymerní přípravek ve formě částice s průměrem nižším než 1 mm, ve které jsou rozptýleny částěčky biologicky aktivního EPO stabilizovaného proti agregaci. Mikročástice může mít sférický tvar, tvar odlišný od sférického, nebo tvar nepravidelný. S výhodou má mikročástice tvar mikrosféry. Obvykle je velikost mikročástic taková, aby bylo možno je injikovat. Preferovanány jsou mikročástice s velikostí 1 až 180 μm , které je možno injikovat pomocí injekčních stříkaček velikosti 23.

Při provádění způsobu výroby přípravku pro kontrolované uvolňování biologicky aktivního neagregovaného EPO podle tohoto vynálezu se vhodné množství částěček biologicky aktivního neagregovaného EPO disperguje v polymerním roztoku. Tato dispergace může být prováděna mícháním, třepáním, působením ultrazvuku, nebo jinými známými prostředky, kterými se provádí mísení. Polymerní roztok, ve kterém je dispergován biologicky aktivní EPO stabilizovaný proti agregaci, se potom vhodným způsobem ztuhí a tak vznikne přípravek pro kontrolované uvolňování EPO podle tohoto vynálezu.

Příprava disperze částěček EPO v polymerním roztoku může být rovněž prováděna tak, že částěčky biologicky aktivního neagregovaného EPO jsou vmíchávány do rozpouštědla polymeru po částech, v obráceném pořadí, odděleně nebo současně.

Vhodný roztok polymeru obsahuje 1 až 30 hmot. % vhodného

biokompatibilního polymeru, přičemž tento roztok se připravuje rozpouštěním tohoto biokompatibilního polymeru ve vhodném rozpouštědle. S výhodou obsahuje roztok polymeru 2 až 20 hmot. % polymeru, nejvýhodněji 5 až 10 hmot. % polymeru.

Vhodným rozpouštědlem polymeru je rozpouštědlo, ve kterém se rozpouští polymer, ve kterém jsou však částčky EPO stabilizovaného proti agregaci v podstatě nerozpustné a se kterým tyto částčky nereagují. Příkladem vhodných rozpouštědel polymeru jsou polární organické kapaliny jako je methylenchlorid, chloroform, octan ethylnatý a aceton.

Příprava mikročástic pro kontrolované uvolňování EPO podle tohoto vynálezu je dále popsána v příkladu 2.

Aby se získaly částčky biologicky aktivního EPO, stabilizovaného proti agregaci, EPO se zamíchá do vhodného vodného rozpouštědla, obsahujícího alespoň jedno protiagregační činidlo, čímž se vytvoří stabilizační směs, jejíž jednotlivé složky mohou být suspendovány nebo rozpouštěny, nebo mohou být částečně suspendovány a částečně rozpouštěny.

Je třeba podotknout, že než je EPO uvedeno do kontaktu s protiagregačním činidlem, může existovat v pevné i v rozpouštěné formě. Rovněž protiagregační činidlo může existovat v pevné i v rozpouštěné formě, před tím, než je uvedeno do kontaktu s EPO. Preferován je postup, při kterém se stabilizační směs připraví smísením vodného roztoku EPO s vodným roztokem protiagregačního činidla.

Stabilizační směs se potom formuje do částic biologicky aktivního erythropoetinu stabilizovaného proti agregaci. Může být použita jakákoliv známá metoda, vhodná k vytváření pevných částček ze směsi dvou složek z nichž jedna je citlivá na vyšší teploty. Tak může být solvatovaná stabilizační směs odpařována, lyofilizována nebo vymražována. Pevná stabilizační směs může být lisována do granulí.

V preferovaném provedení je stabilizační směsí solvatovaná směs, která je pufována takovým množstvím pufru, které udržuje její pH v oblasti, ve které nedochází k výrazné ztrátě biologické aktivity v důsledku změn pH během vytváření částic (například během lyofilizace). Obvykle je obsah pufru ve

stabilizační směsi 5 až 20 hmot. %, vztaženo na celkovou hmotnost pevných látek. Vhodnými rozpouštědly jsou rozpouštědla, ve kterých jsou jak EPO, tak protiagregační činidlo, alespoň mírně rozpustné, jako je vodný hydrogenuhličitanový pufr nebo vodný fosfátový pufr. Pro přípravu vodných roztoků je preferováno použití deionizované vody nebo vody pro injikování.

Stabilizační směs je obvykle pufována na pH v rozmezí 4,0 až 8,0, preferované rozmezí pH je 5,0 až 7,0. Vhodné pH je obvykle nastaveno za použití vodného pufru, jako je hydrogenuhličitanový pufr. Více je preferováno použití fosfátových pufrů, citrátových pufrů a jejich kombinací.

pH ve vhodném rozmezí se může dosáhnout dialýzou s pufrem, použitím pufru jako rozpouštědla nebo protiagregačního činidla EPO a přidáním jedné nebo více dávek pufru k roztoku EPO před přidáním protiagregačního činidla, případně po tomto přidání nebo během něho.

Solvatovaná stabilizační směs se potom suší lyofilizací, čímž se vytvářejí částice biologicky aktivního EPO, stabilizovaného proti agregaci. Stabilizační směs může být sušena vcelku, nebo před sušením rozdělena na menší části.

V preferovaném provedení je stabilizační směs mikronizována, například pomocí ultrazvukové sondy, zmrazována a potom lyofilizována za vzniku biologicky aktivních částic EPO, stabilizovaných proti agregaci.

V jiném preferovaném provedení je stabilizační směsí pufovaný roztok obsahující EPO, síran amonný (6 až 8 g síranu amonného na 1 g EPO) a roztok pufru (5 až 30 g roztoku pufru na 1 g EPO) s pH v rozmezí 5 až 7. Výhodněji je roztokem pufru směs 5 mM citrátového pufru s 5 mM fosfátovým pufrem nebo 5 mM fosfátový pufr (pH 7).

S výhodou je průměr částic EPO stabilizovaného proti agregaci 1 až 6 μm . Částice EPO jsou rozměňovány odděleně, před jejich přidáním k roztoku polymeru, postupem popsaným v přihlášce vynálezu USA č. 08/006 682, podané 21. ledna 1993, zde uvedené jako odkaz, která je v řízení zároveň s touto přihláškou vynálezu a která se týká způsobu přípravy malých částic biologicky aktivních látek. Částice EPO mohou však také

být rozmělnovány po jejich přidání do roztoku polymeru, například pomocí ultrazvukové sondy nebo pomocí ultrazvukové trysky.

Příprava biologicky aktivních částic EPO, stabilizovaných proti agregaci, je blíže popsána v příkladu 1. Další popis mikrosfér obsahujících částice biologicky aktivního EPO, stabilizovaného proti agregaci, je uveden v příkladech 2 až 5.

V dalším provedení způsobu přípravy podle tohoto vynálezu se za účelem modulace rychlosti uvolňování EPO disperguje v polymerním roztoku složka s kationtem kovu, která ještě není přítomna v částicích EPO.

Je třeba upozornit na to, že složka s kationtem kovu a částice EPO stabilizovaného proti agregaci, mohou být dispergovány v roztoku polymeru postupně, v opačném pořadí, střídavě, odděleně nebo současně.

Rovněž mohou být polymer, složka s kationtem kovu a EPO stabilizovaný proti agregaci vmíchány do rozpouštědla postupně, v opačném pořadí, střídavě, odděleně nebo současně.

Způsob přípravy kompozice modulující rychlost uvolňování biologicky aktivní látky z biodegradovatelného polymeru je dále popsán v přihlášce vynálezu USA č. 08/237 057, která je v řízení zároveň s touto přihláškou vynálezu a v přihlášce vynálezu PCT/US95/05511, která je rovněž v řízení zároveň s touto přihláškou vynálezu.

Další popis mikrosfér obsahujících částice EPO stabilizovaného proti agregaci a složku s kationtem kovu je uveden v příkladu 2.

Vhodným způsobem ztužení roztoku polymeru obsahujícího částice EPO stabilizované proti agregaci, je způsob spočívající v odpaření rozpouštědla, popsáný v patentech USA č. 3 737 337, autoři Schnoring a kol., č. 3 523 906, autoři Vrancken a kol., č. 3 691 090, autoři Kitajima a kol. a č. 4 389 330, autoři Tice a kol., které jsou zde uvedeny jako odkazy. Odpařování rozpouštědla může být použito k přípravě mikročástic nebo jiných tvarovaných prostředků pro kontrolované uvolňování EPO.

Při provádění způsobu používajícího odpařování rozpouštědla se roztok polymeru obsahující částice EPO stabilizované proti

agregaci smísí nebo rozmíchá s kontinuální fází, se kterou je částečně mísitelné rozpouštědlo polymeru. Tím vznikne emulze. Kontinuální fáze je obvykle vodné rozpouštědlo. V kontinuální fázi jsou obvykle přítomny emulgátory, které stabilizují emulzi. Rozpouštědlo polymeru se potom během několika hodin odpaří a tím se polymer ztuhne na polymerní matici, ve které je obsažena disperze částic EPO, stabilizované proti agregaci. Při použití tohoto způsobu musí být dbáno na to, aby se roztok polymeru nezahřál na teplotu, při které probíhá denaturace EPO obsaženého v částicích EPO. V příkladu 2 jsou uvedeny bližší informace, týkající se zachování vysokého stupně biologické aktivity mikročástic podle tohoto vynálezu, který je obvykle vyšší než 98 %.

Jiným vhodným způsobem ztuhnutí polymerního roztoku za vzniku polymerní matrice obsahující částice EPO stabilizované proti agregaci je metoda separace fází, popsána v patentu USA č. 4 675 800, který je zde uveden jako odkaz. Při této metodě se polymer obsažený v roztoku polymeru obsahujícím částice EPO stabilizované proti agregaci, vysrážuje kolem částic EPO přidáním srážedla, nemísitelného s rozpouštědlem polymeru, do roztoku polymeru, čímž se vytváří emulze.

Preferovanou metodou přípravy částic EPO, stabilizované proti agregaci, je rychlé zmrazení a extrakce rozpouštědla, které je popsáno v patentu USA č. 5 019 400, autoři Gombotz a kol. a v přihlášce vynálezu USA č. 08/443 726, podané 18. května 1995, která je v řízení zároveň s touto přihláškou vynálezu. Tento způsob přípravy mikrosfér ve srovnání s jinými metodami, například s metodou separace fází, dále snižuje množství EPO potřebné pro vznik přípravku pro kontrolované uvolňování léčiv s určitým obsahem EPO. Tento způsob přípravy mikročástic je rovněž popsán v příkladu 2.

Při provádění tohoto způsobu se roztok polymeru obsahujícího disperzi částic EPO zpracovává za vzniku kapek, přičemž podstatná část těchto kapek obsahuje roztok polymeru a částice biologicky aktivního EPO stabilizované proti agregaci. Tyto kapky se poté zmrazují způsobem, kterým vznikají mikročástice. Příklady prostředků používaných ke zpracování polymerního

13.02.98

roztoku za vzniku kapiček jsou průchod disperze ultrazvukovou tryskou, tlakovou tryskou, Raileighovou tryskou nebo jakýmkoliv jiným prostředkem vhodným pro tvorbu kapiček z roztoku.

Pro zmrazení kapiček na mikročástičky je používáno vedení kapiček do zkapalněného plynu nebo do jeho blízkosti. Příkladem těchto zkapalněných plynů jsou kapalný argon nebo kapalný dusík, vzniklé zmražené mikrokapičky se potom oddělují od zkapalněného plynu. Na zmražené mikrokapičky se potom ponechá působit kapalně srážedlo, jako například ethanol nebo směs ethanolu a hexanu, případně pentanu. Rozpouštědlo ve zmražených mikrokapičkách je extrahováno v pevné a/nebo kapalně formě do srážedla a tím vznikají mikročástice biologicky aktivního EPO stabilizovaného proti agregaci. Smísením ethanolu s jinými srážedly, jako je hexan nebo pentan, se může u některých polymerů, jako například u poly(laktidu-co-glykolidu), dosáhnout zvýšení rychlosti extrakce rozpouštědla, ve srovnání s rychlostí extrakce dosahovanou s čistým ethanolem.

Změnami velikosti kapiček, prováděnými například změnou průměru ultrazvukové trysky, mohou být připravovány mikročástice s různými rozměry. Jsou-li třeba částice s velkými rozměry, mohou být protlačovány injekční stříkačkou přímo do chladné kapaliny. Se zvyšováním viskozity roztoku polymeru se může rovněž zvyšovat velikost částic. Tak například může být velikost mikročástic získávaných tímto způsobem 1000 až 1 μ m, nebo i nižší.

Ještě jiný způsob získání přípravku pro kontrolované uvolňování EPO z polymerního roztoku spočívá v odlévání například odlévání ve formě, kterým se může získat folie nebo jiný tvar. Může se postupovat tak, že roztok polymeru, obsahující disperzi částic EPO stabilizovaného proti agregaci, se naplní do formy a potom se buď odstraní některou ze známých metod rozpouštědlo, nebo se teplota roztoku polymeru snižuje tak dlouho, až se získá folie nebo jiný tvar s konsistentní sušinou. Příprava folií odléváním polymerních roztoků obsahujících biologicky aktivní látku je blíže popsána v přihlášce vynálezu USA č. 08/237 057, která je v řízení současně s touto přihláškou vynálezu.

13.02.98

Způsob získání přípravku pro kontrolované uvolňování biologicky aktivního EPO může být rovněž použit pro získání přípravků pro kontrolované uvolňování jiných biologicky aktivních látek, které jsou rozpustné ve vodných roztocích a mají při dostatečně vysokých koncentracích tendenci k vytváření biologicky neaktivních agregátů.

Předpokládáme, že uvolňování EPO může probíhat dvěma různými způsoby. Uvolňování EPO může probíhat difuzí kanálky v polymerní matici, které vznikají například rozpouštěním EPO a které jsou naplněny vodnými roztoky, nebo rovněž vodnými roztoky naplněnými dutinami vzniklými odstraněním rozpouštědla polymeru v průběhu přípravy přípravku pro kontrolované uvolňování. Rychlost hydrolyzy polymeru může být zvýšena, liší-li se hodnota pH od hodnot pH odpovídajících neutrálním podmínkám. Z tohoto důvodu se může postupovat tak, že se k roztoku polymeru, ze kterého se dále připravují mikročástice, přidá kyselé nebo zásadité aditivum, a tím se ovlivní rychlost eroze polymeru.

Druhým mechanismem je uvolňování EPO degradací polymeru. Rychlost degradace může být řízena změnou vlastností polymeru, které ovlivňují rychlost jeho hydratace. Takovými vlastnostmi jsou například poměr různých monomerních jednotek, které tvoří polymer, jako například laktidu a glykolidu; použití L-isomeru monomeru namísto racemické směsi, přítomnost určitých koncových skupin v polymeru. Tyto vlastnosti mohou ovlivňovat hydrofilitu a stupeň krystalinity, které určují rychlost hydratace polymeru. Pro zvýšení hydrofility mohou být rovněž přidány hydrofilní látky, které mohou zvyšovat stupeň hydratace a měnit rychlost eroze polymeru.

Změnou vlastností polymeru může být řízen rozsah příspěvků difuze nebo degradace polymeru na uvolňování EPO. Sníží-li se například molekulová hmotnost polymeru tím, že se namísto blokového polymeru použije polymer neblokovaný, nebo zvýší-li se obsah glykolidových monomerních jednotek v kopolymeru laktidu s glykolidem, může tím dojít ke zvýšení rychlosti hydrolyzy polymeru a tím ke zvýšení rychlosti uvolňování EPO způsobovaného erozí polymeru. Vliv různých molekulových hmotností neblokovaného PLGA je dále objasněn v příkladu 5.

13.02.98

Přípravky pro kontrolované uvolňování podle tohoto vynálezu mohou být použity v humánním i veterinárním lékařství, mohou být aplikovány injekcí, implantací (například subkutánně, intramuskulárně, intraperitoneálně, intrakraniálně, intravaginálně a intradermálně), přestupem přes sliznice (například intranasálně nebo pomocí čípků), nebo aplikací *in situ* například pomocí klystýru nebo aerosolového spreje). Aplikace se provádí tak, aby se dosáhlo žádoucího dávkování EPO, které vyplývá ze známých údajů, týkajících se léčení pomocí EPO za různých podmínek.

Vynález bude dále podrobněji objasněn pomocí následujících příkladů provedení vynálezu.

Odborníci v dané oblasti mohou pouze na základě své zkušenosti odvodit mnohá další analogická provedení zde popsaného vynálezu. Tato analogická provedení je třeba považovat za součást předmětu tohoto vynálezu, chráněného patentovými nároky uvedenými dále.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava biologicky aktivního erytropoetinu stabilizovaného proti agregaci

Erytropoetin byl získán postupem popsaným v patentu USA č. 4 703 008. EPO byl rozpuštěn v deionizované vodě na vodný roztok o koncentraci asi 1 mg/ml. Různé části tohoto roztoku EPO byly potom dialyzovány proti třem čerstvým nasadám pufru vhodného složení (konkrétně 5 mM fosfátový pufr o pH = 7, 5 mM citrátový pufr o pH = 7, 5 mM fosfátový pufr/5 mM citrátový pufr o pH = 7 nebo 10 mM hydrogenuhličitanový pufr o pH = 7).

Po dialýze bylo měřením absorbance při 280 nm ($\epsilon = 1,345 \text{ L.g}^{-1}\text{.cm}^{-1}$) při 280 nm zjištěno, že koncentrace EPO v dialyzovaném roztoku je asi 1 mg/ml.

13.10.98

Části dialyzovaného roztoku EPO byly potom smíseny s příslušným protiagregačním činidlem (například se síranem amonným, octanem zinečnatým, směsí mannitol/sacharóza nebo směsí mannitol/maltóza) za vzniku směsí uvedených v následující Tabulce I. V roztocích příslušných protiagregačních činidel byla rovněž obsažena další aditiva (konkrétně inulin, glycin a povrchově aktivní látka Tween 20TM).

Potřebné roztoky protiagregačních činidel byly připraveny v těchto pufrech, které byly používány pro dialýzu roztoků EPO, do kterých byly později přidány.

Přibližné objemy každého z roztoků protiagregačních činidel a pufrů byly nality do 50 ml polypropylenové nádobky v takovém množství, aby se dosáhlo žádané koncentrace jednotlivých roztoků (uvedených v Tabulce I). Jednotlivé dialyzované roztoky EPO byly potom přidány do příslušného roztoku protiagregačního činidla a takto získané roztoky byly mírně promíchávány.

Tabulka I

Složky roztoků EPO	Obsah složek v jednotlivých roztocích EPO (hmot. %)							
	Am1	Am4	Am7	Ma1	Ma3	Ma4	Zn1	Zn6
EPO	10,0	10,1	9,9	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
síran amonný	66,8	64,7	79,1	-	-	-	-	-
octan zinečnatý	-	-	-	-	-	-	76,9	76,9
mannitol	-	-	-	62,5	62,5	72,5	-	-
sacharóza	-	-	-	10,0	-	10,0	-	-
maltóza	-	-	-	-	10,0	-	-	-
5 mM citrátový pufr (pH=7)	-	15,1	-	-	-	-	-	-
5 mM fosfátový pufr (pH=7)	-	-	10,0	7,5	7,5	7,5	-	-
10 mM hydrogenuhličita- nový pufr (pH=7)	-	-	-	-	-	-	13,1	13,1
inulin	1,1	10,1	1,0	-	-	-	-	-
glycin	-	-	-	10,0	10,0	-	-	-
povrchově aktivní látka Tween 20 TM	-	-	-	-	-	-	-	1,0

Každý z připravených roztoků EPO byl nasát do 60 ml plastikové injekční stříkačky, na kterou byla nasazena teflonová hadička a byl podroben atomizaci průchodem ultrazvukovou tryskou (typ VI A, výrobce Sonics and Materials Inc., Danbury, CT) do polypropylenové nádoby obsahující kapalný dusík. Přitom bylo dbáno na to, aby atomizovaná látka byla vždy zcela ponořena a aby se tak vytvářely zmražené částičky. Nádoba byla poté udržována při teplotě -80°C tak dlouho, dokud se všechen kapalný dusík nevypařil. Zmražené částičky, které obsahovaly biologicky aktivní EPO, stabilizovaný proti agregaci, byly přeneseny do skleněných kádinek a poté lyofilizovány, čímž vznikly biologicky aktivní částičky EPO stabilizovaného proti agregaci. Částičky EPO byly vyjmuty z lyofilizátoru v atmosféře suchého dusíku, další operace s nimi se prováděly v atmosféře s nízkým obsahem vlhkosti, a částičky byly uskladněny se v suchém prostředí při -80°C .

Příklad 2

Příprava PLGA mikrosfér obsahujících biologicky aktivní erythropoetin stabilizovaný proti agregaci

Mikrosféry obsahující částičky EPO stabilizovaného proti agregaci o složení uvedeném v příkladu 1 byly připraveny z neblokovaného PLGA (50:50, molekulová hmotnost 10 000 Dalton), zakoupeného u firmy Boehringer Ingelheim Chemicals Inc., Montvale, NJ, nebo z blokovaného PLGA (50:50, molekulová hmotnost 10 000 Dalton), zakoupeného u firmy Birmingham Polymers Inc., Birmingham, AL.

Mikrosféry obsahující částičky EPO stabilizovaného proti agregaci o složení Am7 byly připraveny z neblokovaného PLGA (50:50) o molekulové hmotnosti asi 31 000 Dalton nebo 45 000, (Boehringer Ingelheim Chemicals Inc., Montvale, NJ).

Enkapsulace částiček EPO stabilizovaného proti agregaci, připravených postupem podle příkladu 1 v PLGA byla provedena způsobem popsany Gombotzem a spoluautory (patent USA

13.02.98

č. 5 019 400). Roztoky polymerů byly vždy připraveny rozpuštěním polymeru v 5,1 ml methylenchloridu. Uhličitan hořečnatý nebo uhličitan zinečnatý byly prosáty přes síto o velikosti ok 38 μm a potom byly přidány do roztoku polymeru v takovém množství, aby vznikl roztok o koncentraci 100 g/l. Do takto vzniklé suspenze soli v roztoku polymeru bylo přidáno 30 mg částecek EPO stabilizovaného proti agregaci.

Roztok polymeru obsahující suspendovanou sůl a částecky EPO byl umístěn do lázně tvořené směsí vody a ledu a podroben působení ultrazvukové sondy (Virtis Co., Gardiner, NY), čímž se průměr proteinových částecek zmenšil na 2 až 3 μm a vytvořila se disperze částecek EPO v roztoku polymeru.

V nádobce z polypropylenu byla vytvořena zmražená vrstva ethanolu ponořením této nádoby do kapalného dusíku a potom byl zmražený ethanol přelit kapalným dusíkem. Suspenze částecek EPO v roztoku polymeru byla poté čerpána pístovým mikročerpádem (Orion Research Inc., Boston, MA) rychlostí 1 až 2 ml/min. do ultrazvukové trysky, umístěné nad nádobkou se zmraženým ethanolem a kapalným dusíkem. Ze suspenze částecek EPO v roztoku polymeru se vytvářely kapičky, které mrzly stykem s kapalným dusíkem a tím vznikly mikrosféry, které padaly na povrch vrstvy zmraženého ethanolu.

Nádobka byla umístěna do lázně o teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tím se odpařil kapalný dusík a ethanol se roztavil. Jakmile se ethanol roztavil, mikrosféry klesly do kapalného ethanolu a vyextrahoval se z nich methylenchlorid. Po 24 hodinách byl do nádoby přidán další ethanol, který byl předem ochlazen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dva dny poté, co byly mikrosféry připraveny, byla suspenze mikrosfér v ethanolu přefiltrována přes 0,65 μm membránu Durapore^R (Milipore, Bedford, MA) za použití předchlazené filtrační aparatury. Filtrace byla provedena v suché skříni, která byla předem profoukána dusíkem. Přefiltrované mikrosféry byla potom lyofilizovány (na podložce, která byla předchlazena na $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) až do vysušení.

Imunoreaktivita EPO obsaženého v těchto mikrosférách pro kontrolované uvolňování byla následovně stanovena analýzou za použití imunoesejů (radioimmunoassay - RIA) (Inostar,

13.02.98

Stillwater, MN). Extrakce EPO z mikrosfér byla provedena tak, že asi 10 mg mikrosfér bylo přemístěno do zkumavky s 0,25 ml methylenchloridu. Vzorek byl míchán po dobu 10 až 20 s a potom ponechán při teplotě místnosti po dobu 5 min., aby se polymer rozpustil. Byl přidán aceton (0,75 ml), směs byla míchána dalších 10 s a odstředěním při 4 °C a 14 000 ot./min. po dobu 30 s byl oddělen EPO. Kapalina nad odstředěným preparátem byla odstraněna a dvakrát bylo zopakováno popsání rozpouštění v methylenchloridu a vysrážení acetonem. Vzorek byl vysušen v lyofilizátoru nebo sušením při teplotě místnosti za sníženého tlaku po dobu 14 až 18 hodin. Získaný EPO byl přelit 1 ml pufru HEPES míchán po dobu asi 10 s a ponechán stát při teplotě místnosti asi 1 hodinu až do úplného rozpouštění. Vzorek, který byl analyzován, byl získán zředěním roztoku extrahovaného EPO puftrem (8,1 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 400 mM NaCl, pH 7,5) na koncentraci 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$.

Imunoreaktivita takto získaného EPO je $121\,000 \pm 5000$ jednotek na 1 mg EPO. Tato specifická aktivita je srovnatelná s aktivitou výchozího EPO, v důsledku použití způsobu přípravy přípravků pro kontrolované uvolňování podle tohoto vynálezu se tedy projevuje pouze nevýznamný pokles aktivity EPO. Bylo zjištěno, že obsah monomerní formy EPO byl ve všech mikrosférách vyšší než 98 %.

V mikrosférách obsahujících částičky EPO Am1 a Am7 bylo rovněž provedeno pomocí gelové chromatografie (size exclusion chromatography - SEC) stanovení dimeru EPO a dále stanovení vysokomolekulárních agregátů EPO pomocí metody SES-PAGE/ Western blot analysis. Nebyl zjištěn žádný dimer EPO ani vysokomolekulární agregáty EPO.

Příklad 3

Uvolňování EPO stabilizovaného proti agregaci z částiček EPO uvnitř PLGA mikrosfér *in vitro*.

Uvolňování EPO stabilizovaného proti agregaci z částiček EPO

uvnitř PLGA mikrosfér bylo prováděno *in vitro* v pufru HEPES (75 mM HEPES, 115 mM NaCl, 0,1 objem.% Tween 20TM, 0,1 hmot. % kaziidu sodného, pH upraveno přidáním NaOH na 7,4) nebo v pufru HEPES obsahujícím 2 až 20 % ovčího séra. Pufr obsahující sérum se skládá z 80 objem.% shora uvedeného roztoku a z 20 objem.% ovčího séra. Stanovení bylo provedeno suspendováním 8 až 10 mg mikrosfér v 1 až 5 ml pufru při 37 °C.

~~Vždy po určité době byl všechn pufr odstraněn a nahrazen čerstvým.~~

U vzorků kondiciovaných v pufru HEPES byl pomocí gelové chromatografie (SEC) stanoven časový průběh uvolňování monomerního EPO (biologicky aktivní EPO) a agregovaného EPO (biologicky inaktivní EPO). Výsledky měření tohoto časového průběhu u různých mikrosfér v pufru HEPES *in vitro* jsou uvedeny na obr. 1 až 3. Jednalo se o mikrosféry tvořené a) neblokováným PLGA (mol. hmotn. 10 000 Dalton) obsahující směsí Am1 a Am7, a b) blokováným PLGA (mol. hmotn. 10 000 Dalton) obsahující směs Zn1. Z obrázků 1 a 2 je zřejmé, že EPO, uvolněný za směsí obsahujících síran amonný jako protiagregační činidlo, byl po celou dobu uvolňování skoro výhradně monomerní.

Na obrázku 3 je znázorněno uvolňování EPO ze směsi obsahující jako protiagregační činidlo octan zinečnatý. V tomto případě byla zjištěna značná množství agregátů, rychlost uvolňování těchto látek se podstatně zvyšovala se zvyšující se dobou uvolňování.

V Tabulce II jsou znázorněny výsledky SEC a RIA analýz časových závislostí uvolňování z různých mikrosfér obsahujících různě směsí EPO, uvedené v příkladu 1; *in vitro* v pufru HEPES nebo ve směsi pufr HEPES/sérum (ve všech případech použit PLGA o molekulové hmotnosti 10 000). Množství látky uvolněné v počáteční fázi a rychlost uvolňování v roztoku tvořeném pufrem HEPES a sérem byly stanoveny metodou RIA. Kvalita uvolňovaného EPO byla v pufru HEPES určena pomocí SEC.

13.02.98

Tabulka II

označení směsi	obsah EPO (%)	polymer/sůl	celkové množství uvolněné látky (% původního obsahu)	množství látky uvolněné na počátku (%)	průměrné množství látky uvolněné za jeden den (%/den)	dobu uvolňování (dny)
Zn1	10	blokováný/ 10 % MgCO_3	12	66	1,2	14
Zn1	10	blokováný 10 % ZnCO_3	22	46	1,7	28
Zn6	10	blokováný 10 % ZnCO_3	37	32	1,6	28
Am1	5	neblokováný/ 10 % MgCO_3	1	39	1,4	21
Am1	10	blokováný/ 10 % MgCO_3	2	71	0,3	3
Am4	5	neblokováný/ 10 % MgCO_3	1	29	1,1	21
Am4	5	neblokováný/ žádný	1	35	0,9	28
Ma1	5	neblokováný/ 10 % MgCO_3	1	44	1,8	24
Ma3	10	neblokováný/ 10 % MgCO_3	1	71	1,3	21
Ma4	10	blokováný 10 % ZnCO_3	1	77	0,6	3

Tyto analýzy ukazují, že přidavek vhodných protiagregačních aditiv podstatným způsobem snižuje agregaci EPO během uvolňování. Tyto analýzy rovněž ukazují, že přidavek složky s kationtem kovu (například soli) k polymeru, jakož i vhodná volba polymeru (t.j. použití blokováného nebo neblokováného polymeru) podstatně ovlivňují množství látky uvolněné v počáteční fázi uvolňování a dobu uvolňování.

Příklad 4

Obsah agregátů v EPO uvolňovaném z částíček EPO stabilizovaného síranem amonným uvnitř PLGA mikrosfér

Účelem tohoto pokusu bylo stanovit míru agregace EPO uvolňovaného z mikrosfér obsahujících různá množství síranu amonného.

Postupem popsaným v příkladu 1 byly připraveny směsi obsahující EPO srovnatelné s Am7, lišící se však tím, že obsahují 10, 20 nebo 40 % síranu amonného. Zbytek síranu amonného byl nahrazen chloridem sodným nebo sacharózou, takže celková hmotnost síranu amonného a chloridu sodného nebo síranu amonného a sacharózy byla vždy 79 %.

Podíly monomerního a agregovaného EPO v procentech byly stanoveny po 35 a 42 hodinách uvolňování *in vitro*. Směs Am7, jakož i směs obsahující vedle NaCl 40 % síranu amonného vykazovaly při obou uvedených časech 3 až 4 % agregátů, zatímco směsi obsahující vedle NaCl 10 a 20 % síranu amonného vykazovaly 5 až 6 % agregátů. Výsledky dosažené se směsmi obsahujícími mannitol byly podobné, jako výsledky dosažené se směsmi obsahujícími 10 a 20 % síranu amonného.

V případech, kdy síran amonný byl nahrazen sacharózou, se při 40% obsahu síranu amonného neuvolnilo dostatek látky, aby bylo možno provést kvantitativní stanovení, při obsahu síranu amonného 10 a 20 % byla zjištěna tvorba vyššího množství agregátů (6 až 9 %), než u směsi Am7. Obdobné výsledky byly zjištěny směsí se sacharózou, obsahujícími 10 až 20 % chloridu sodného.

Příklad 5

Vliv současně podávaného cyklosporinu a hydrokortizonu na *in vivo* farmakokinetiku erythropoetinu

Jako pokusná zvířata byli použiti samci krys chovu Sprague-Dawley. Krysy nebyly před pokusem ponechány hladovět, ~~ale byly krmeny obvyklým způsobem s přidavkem přípravku obsahujícího železo a s volným přístupem k vodě.~~ Intraperitoneálně bylo dvakrát týdně injikováno 5 mg/kg přípravku Iron dextran (Sigma Co., St. Louis, MO).

Při těchto experimentech byla použita metoda popsaná v patentové přihlášce USA č. 08/480 813, podané 7. června 1995, která je v řízení současně s touto přihláškou a která se týká potlačení tvorby protilátek u pokusných zvířat při podávání EPO pomocí přípravku pro kontrolované uvolňování (nebo injikování) takovým způsobem, že jsou dosahovány přesně vymezené koncentrace EPO v krevním séru. Tvorba protilátek je přitom potlačena tím, že se pokusnému zvířeti podává cyklosporin A a hydrokortison.

Účelem prvního experimentu bylo srovnání farmakokinetických projevů - speciálně koncentračních profilů retikulocytů - EPO uvolněného z mikrosfér, s účinkem jednorázově injikovaného EPO *in vivo*. Dvěma skupinám krys po třech jedincích bylo subkutánně injikováno ve dni 0 do interkapsulární oblasti 10 000 jednotek mikrosfér RMAm7 EPO (neblokovaný PLGA o molekulové hmotnosti 10 000 obsahující 10 % $MgCO_3$ a 5 % Am7) a ve dni 28 2000 jednotek vodného EPO formou jednorázové injekce. Jedné ze skupin byl podáván cyklosporin A a hydrokortison, kontrolní skupině tyto látky podávány nebyly.

Z ocasní žíly každé z krys byly odebírány vzorky krve 1, 3, 4, 8, 10, 14, 16, 20, 24, 28, 30, 31, 32 a 36 hodin po injekci. Další vzorky krve byly odebírány jednou denně po dobu následujících 4 až 5 dnů.

V každém vzorku krve byl zjišťován počet retikulocytů. Výsledky jsou uvedeny na obr. 4. Z tohoto obrázku je zřejmé, že větší počet retikulocytů byl zjištěn u krys, kterým byla podávána imunosupresiva, a to jak v případě uvolňování EPO

z mikrosfér, tak při jeho jednorázovém injikování. Skupina krys, které nebyla imunosupresiva podávána (kontrolní skupina) vykazovala nižší počty retikulocytů, protože docházelo k tvorbě protilátek v důsledku odezvy imunitního systému na EPO. To je zvláště zřejmé ze skutečnosti, že v kontrolní skupině nenastal významný vzestup počtu retikulocytů po aplikaci jednorázové dávky EPO ve dni 28. Z obrázku 4 je rovněž zřejmé, že pokud byly injikovány mikrosféry, udržovala se zvýšená hladina retikulocytů v séru po delší dobu, než v případě jednorázové aplikace EPO.

Účelem druhého experimentu bylo srovnání *in vivo* farmakokinetických a farmakodynamických účinků EPO uvolněného z různých mikrosfér.

Krysám rozděleným do čtyř skupin vždy po třech jedincích byly subkutánně injikovány mikrosféry do interkapsulární oblasti tak, že u každé skupiny zvířat byl použit jeden z dále uvedených čtyř druhů mikrosfér:

RMAm1	neblokovaný PLGA o m.h. 10 000 / 10 % MgCO_3 / 5 % Am1
RMAa1	neblokovaný PLGA o m.h. 10 000 / 10 % MgCO_3 / 5 % Ma1
PZZn1	blokovaný PLGA o m.h. 10 000 / 10 % ZnCO_3 / 5 % Zn1
RMAm7	neblokovaný PLGA o m.h. 10 000 / 10 % MgCO_3 / 5 % Am7

Každé kryse bylo injikováno 10 000 až 12 000 jednotek. Každé kryse bylo dále jednou denně ve dnech 0 až 14 a poté ve dnech 15 až 28 dvakrát týdně interperitoneálně injikováno 10 mg cyklosporinu A (Sandimmune^R Injection, Sandoz, East Hanover, NJ) a 5 mg hydrokortizonu (Spectrum Co., Gardena, CA) v 0,5 ml fyziologického roztoku chloridu sodného (USP). Účelem podávání těchto látek bylo snížení odezvy imunitního systému krys na EPO.

Z ocasní žíly každé z krys byly odebírány vzorky krve 1, 2, 4, 8, 10, 24, 36 a 48 hodin po injekci. (Po 10 hodinách byly vzorky krve odebírány pouze v některých případech). Další vzorky krve byly odebírány jednou denně po dobu následujících 4 až 5 dnů. Koncentrace EPO v séru krve krys byly stanovovány pomocí ELISA. Byly rovněž zjišťovány počty retikulocytů v krvi.

Časové profily koncentrace EPO v krevním séru a počtu retikulocytů jsou uvedeny na obrázcích 5 a 6. Zvýšené

13.02.98

Koncentrace EPO byly u zvířat pozorovány po dobu asi 14 dní, což je důkazem kontrolovaného uvolňování biologicky aktivního EPO. Zvýšené počty retikulocytů byly pozorovány asi 17 dní. Poměr nedospělých retikulocytů k jejich celkovému počtu byl přiměřený a po aplikaci EPO se podstatným způsobem nezměnil.

Příklad 6

Vliv molekulové hmotnosti polymeru na rychlost uvolňování EPO u krys

Krysám rozděleným do tří skupin vždy po třech jedincích byly injikovány mikrosféry z příkladu 2 postupem popsáním v příkladu 4 tak, že u každé skupiny zvířat byly použity mikrosféry tvořené PLGA polymery s různou molekulovou hmotností (konkrétně 10 000, 31 000 a 45 000 Dalton). Každé kryse byla aplikováno 10 000 jednotek.

Účelem této zkoušky bylo zjistit vliv molekulové hmotnosti na koncentrace dosahované při kontrolovaném uvolňování EPO a na dobu, po kterou probíhalo kontrolované uvolňování.

Z ocasní žíly každé z krys byly odebírány vzorky krve 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 a 28 dnů po injekci. Koncentrace EPO v séru krve krys byly stanovovány pomocí ELISA. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 7. Z tohoto obrázku je zřejmé, že výrazný pokles molekulové hmotnosti polymeru způsobuje v případě, že jako tento polymer je použit neblokovaný PLGA obsahující 2 % MgCO_3 , zvýšení rychlosti uvolňování EPO a zkrácení doby, po kterou uvolňování probíhá.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Přípravek pro kontrolované uvolňování biologicky aktivního neagregovaného erytropoetinu z polymerní matrice, který je tvořen:

a) biokompatibilním polymerem

b) částicemi erytropoetinu, který je stabilizován proti agregaci solí, snižující jeho rozpustnost ve vodných roztocích.

2. Přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná sůl obsahuje kation zvolený ze skupiny sestávající z Mg^{+2} , Li^{+} , Na^{+} , K^{+} , NH_4^{+} a kombinace těchto kationtů.

3. Přípravek podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná sůl obsahuje anion zvolený ze skupiny sestávající z SO_4^{-2} , HPO_4^{-2} , octanového aniontu, citrátového aniontu, šťavelanového aniontu, Cl^{-} , NO_3^{-} , ClO_3^{-} , I^{-} , ClO_4^{-} , SCN^{-} a kombinace těchto aniontů.

4. Přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněnou solí je síran amonný.

5. Přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsah zmíněné soli je 10 až 80 hmot. %, nebo alespoň 40 hmot. %, vztaženo na celkovou sušinu erytropoetiinových částic.

6. Přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že stupeň agregace erytropoetinu je nižší než 5 % jeho původní dávky, s výhodou nižší než 2 % jeho původní dávky.

7. Přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněný polymer je zvolen

ze skupiny sestávající z polylaktidu, polyglykolidu, poly(laktidu-co-glykolidu), kyseliny polymléčné, kyseliny polyglykolové, polykaprolaktonu, polykarbonátu, polyesteramidu, polyanhydridu, polyaminokyseliny, polyorthoesteru, polykyanoakrylátu, poly(dioxanonu), polyalkylenoxalátu, polyurethanu a ze směsí a kopolymerů těchto látek.

8. Přípravek podle nároku 7, v y z n a ě u j í c í s e tím, že zmíněný polymer je zvolen ze skupiny sestávající z polylaktidu, polyglykolidu a poly(laktidu-co-glykolidu).

9. Přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a ě u j í c í s e tím, že zmíněné částice erythropoetinu jsou ve zmíněném polymeru přítomny v koncentracích 0,1 až 30 hmot. %, s výhodou 0,1 až 10 hmot. %.

10. Přípravek podle nároku 9, v y z n a ě u j í c í s e tím, že zmíněné částice erythropoetinu jsou ve zmíněném polymeru přítomny v koncentraci 5 hmot. %.

11. Přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a ě u j í c í s e tím, že zmíněný erythropoetin se lyofilizuje v přítomnosti pufru, který udržuje pH v oblasti 4,0 až 8,0, s výhodou 5,0 až 7,0.

12. Přípravek podle nároku 11, v y z n a ě u j í c í s e tím, že zmíněným pufrem je buď fosfátový pufr nebo citrátový pufr.

13. Přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a ě u j í c í s e tím, že zmíněný biokompatibilní polymer dále obsahuje složku s kationtem kovu.

14. Přípravek podle nároku 13, v y z n a ě u j í c í s e tím, že zmíněným kationtem kovu zmíněné složky s kationtem kovu je kation s více náboji jako například Zn^{+2} , Mg^{+2} a Ca^{+2} .

15. Přípravek podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná složka s kationtem kovu je zvolena ze skupiny sestávající z $\text{Mg}(\text{OH})_2$, MgCO_3 , ZnCO_3 , CaCO_3 , $\text{Zn}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$, $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, MgSO_4 , $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, ZnSO_4 , ZnCl_2 , MgCl_2 , a $\text{Mg}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$, a že s výhodou je touto složkou MgCO_3 .

16. Přípravek podle nároku 14 nebo 15, v y z n a č u j í c í ~~s e t í m, že~~ poměr zmíněné složky s kationtem kovu k polymeru je 1:99 až 1:2.

17. Přípravek podle nároku 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněnou složkou s kationtem kovu je uhličitán hořečnatý přítomný v koncentraci asi 10 hmot. %, vztaženo na celkovou hmotnost přípravku.

18. Použití přípravku podle kteréhokoliv z předcházejících nároků pro přípravu léčiva.

19. Biologicky aktivní erythropoetin, stabilizovaný proti agregaci, kterým je lyofilizovaný roztok erythropoetinu, síranu amonného a pufru udržujícího pH v rozmezí 4 až 8, s výhodou 5 až 7.

20. Erythropoetin podle nároku 19, obsahující 10 až 80 hmot. % nebo alespoň 40 hmot. % síranu amonného, vztaženo na celkovou sušinu.

21. Erythropoetin podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněným pufrům je fosfátový nebo citrátový pufr.

22. Užití erythropoetinu podle kteréhokoliv z nároků 19 až 21 pro výrobu přípravku pro kontrolované uvolňování.

23. Způsob přípravy částeczek biologicky aktivního erythropoetinu, stabilizovaného proti agregaci, jehož jednotlivými stupni jsou:

- a) smíchání protiagregačního činidla, biologicky aktivního erythropoetinu a pufru udržujícího pH v rozmezí 4 až 8,

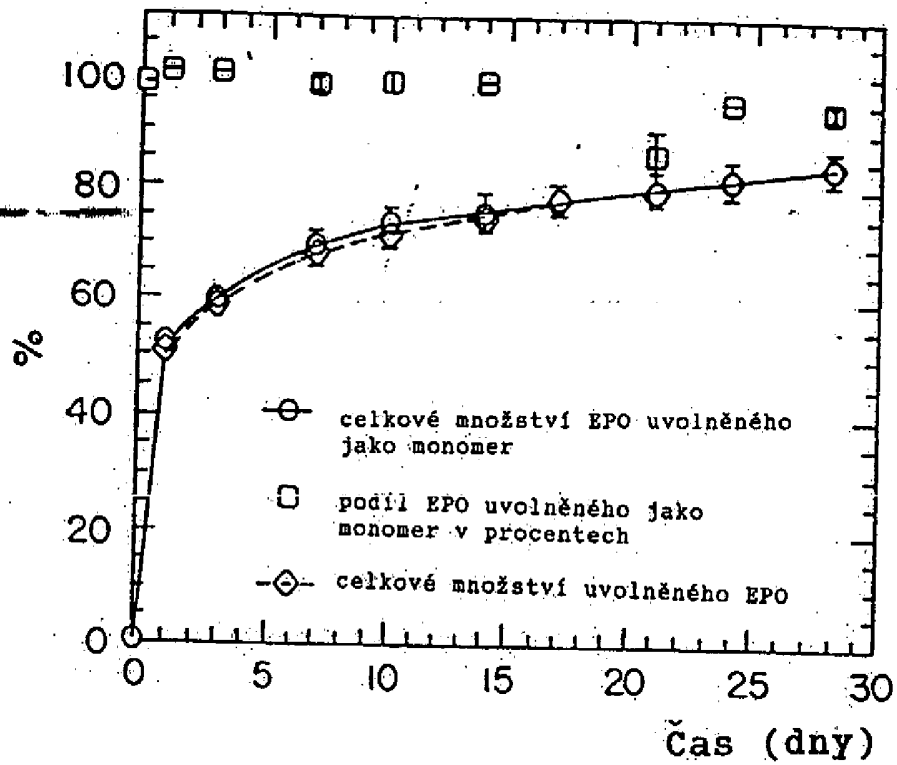
13.02.98

s výhodou 5 až 7, za vzniku směsi s protiagregačními účinky; a

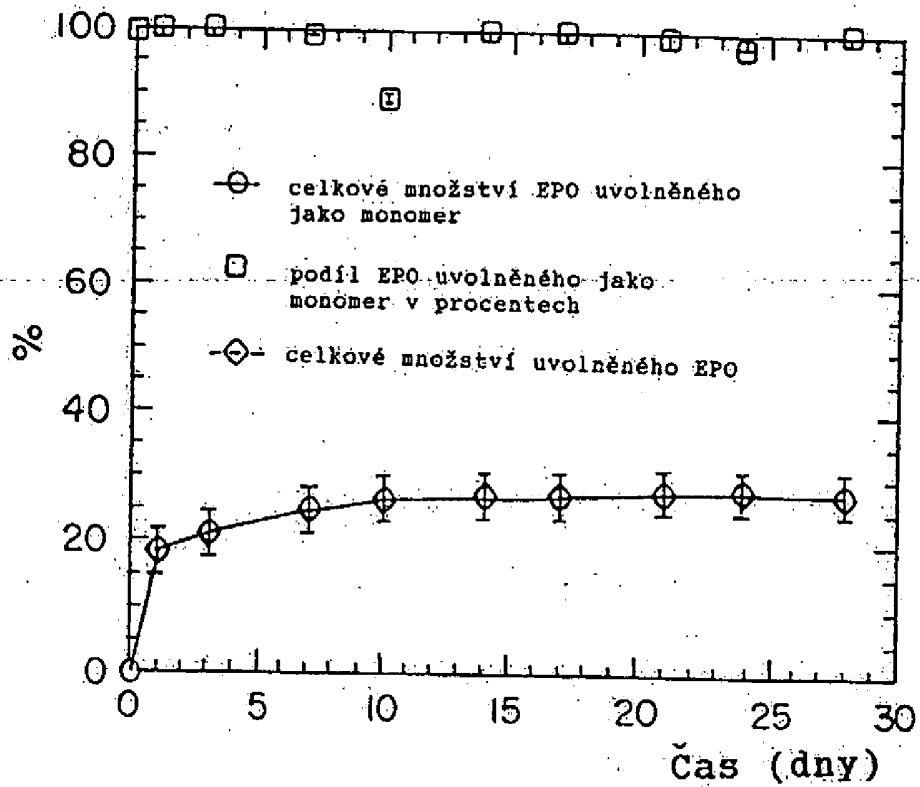
b) lyofilizace této směsi za vzniku biologicky aktivního erythropoetinu, stabilizovaného proti agregaci.

24. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněným protiagregačním činidlem je síran amonný, přidávaný v takovém množství, že jeho koncentrace je 10 až 80 hmot. %, nebo alespoň 40 hmot. %, vztaženo na celkovou sušinu.

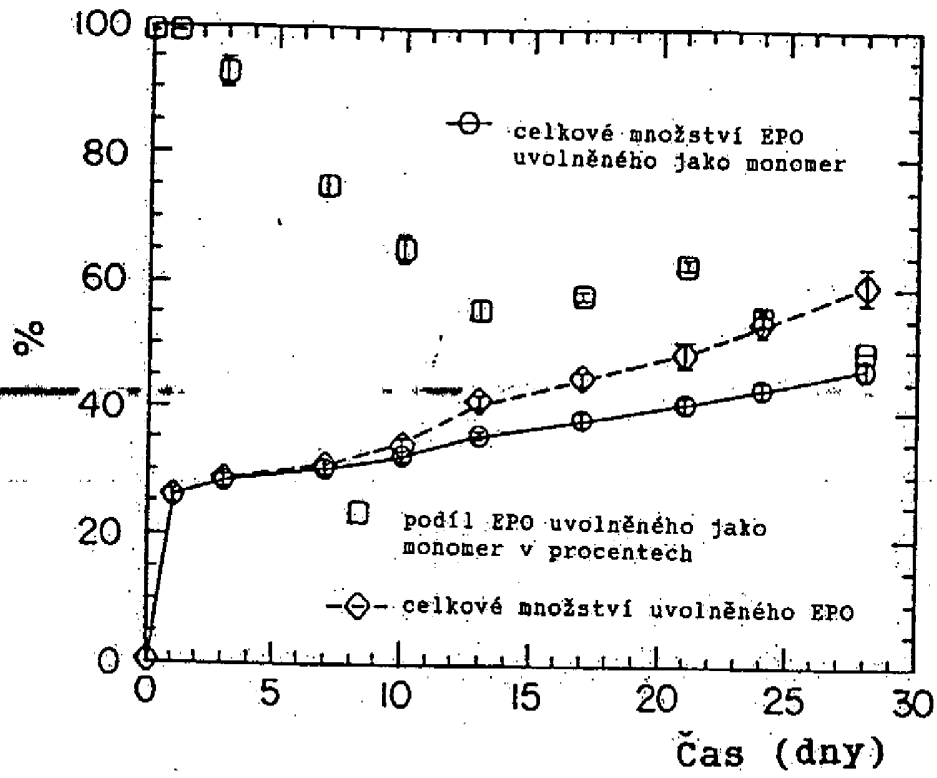
25. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněným pufrům je fosfátový pufr nebo citrátový pufr.



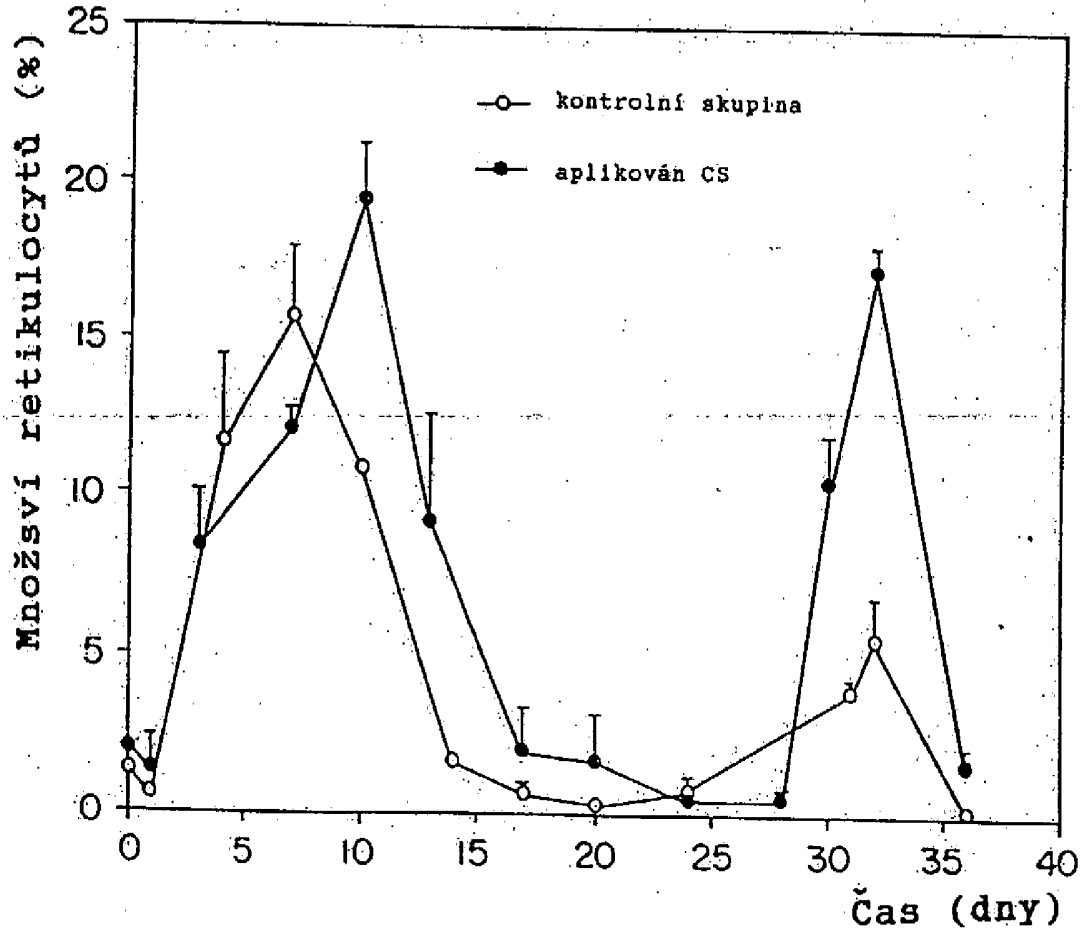
obr. 1



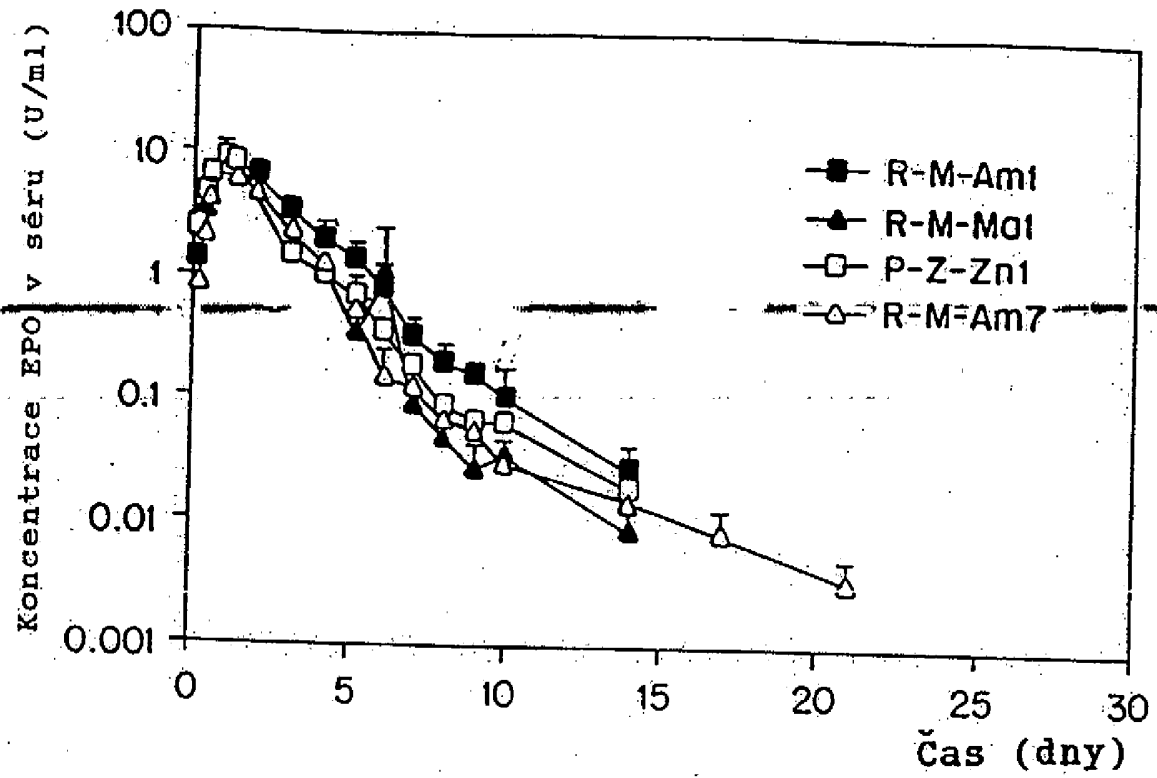
obr. 2



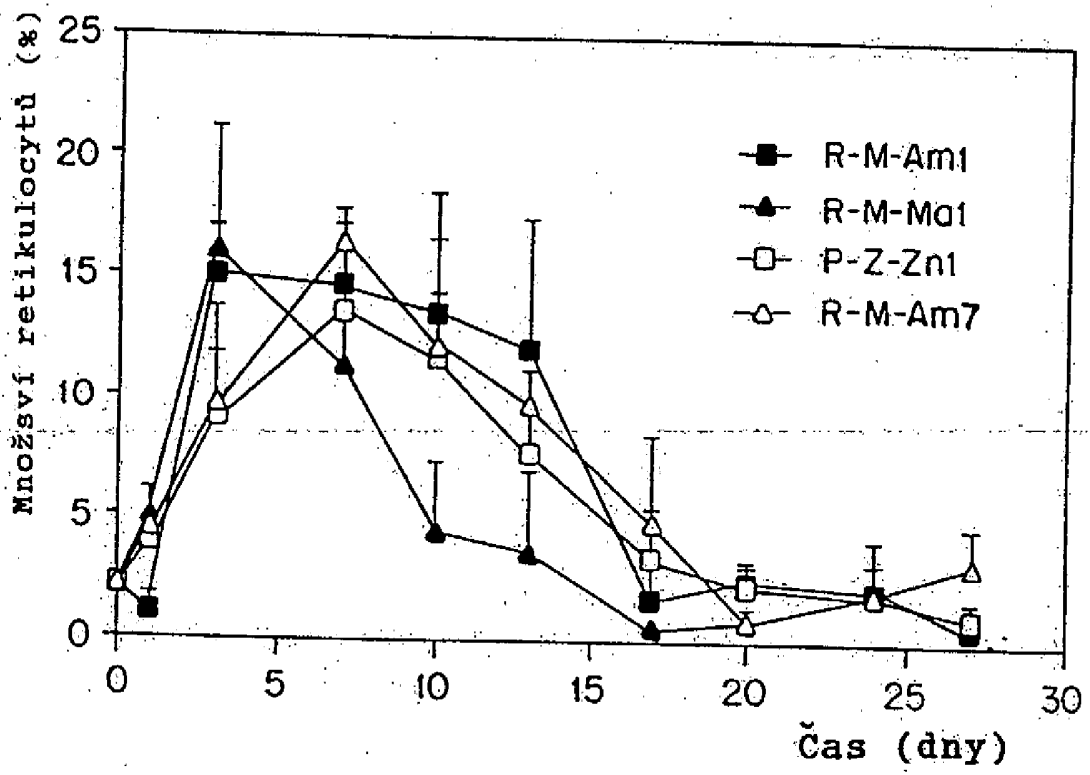
obr. 3



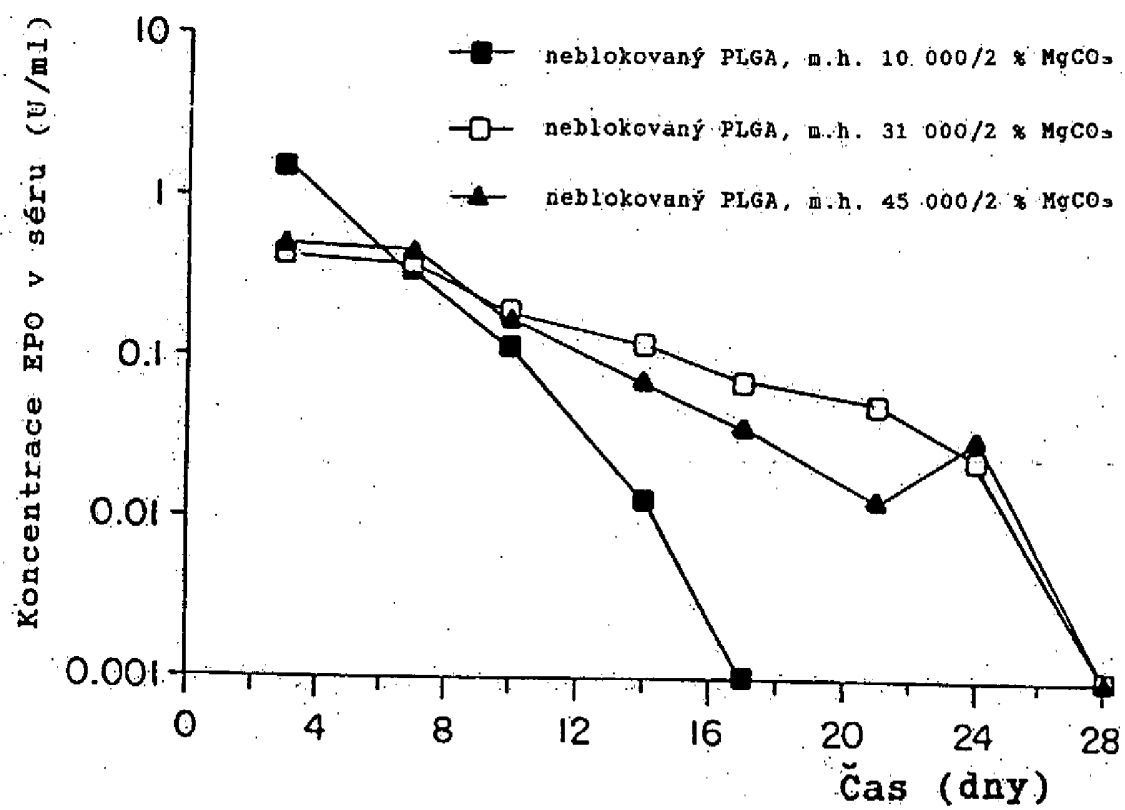
obr. 4



obr. 5



obr. 6



obr. 7