



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

88583

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 06 1993

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

A 61K 31/557, 9/10

(21) Patentihakemus - Patentansökning	870663
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	17.02.87
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	12.06.86
(41) Tulnut julkiseksi - Blivit offentlig	17.02.87
(44) Nähtävöksiäminen ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	26.02.93
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/JP86/00293.
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	17.06.85 JP 60-129920 P

(71) Hakija - Sökande

1. Teijin Limited, 11, Minamihonmachi 1-chome, Higashi-ku, Osaka-shi, Osaka, Japan, (JP)
2. Mizushima, Yutaka, 25-20, Daita 4-chome, Setagaya-ku, Tokyo 155, Japan, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Mizushima, Yutaka, 25-20, Daita 4-chome, Setagaya-ku, Tokyo 155, Japan, (JP)
2. Shoji, Yoko, 25-16, Nakadai, Higashiterao, Tsurumi-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken 230, Japan, (JP)
3. Yagyu, Yasuko, No.403, Sagamihara-Gardenhouse, 5-8, Sagamihara 5-chome, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken 229, Japan, (JP)
4. Kurozumi, Seizi, 2-28, Higashitokura 1-chome, Kokubunji-shi, Tokyo 185, Japan, (JP)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Borenius & Co Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

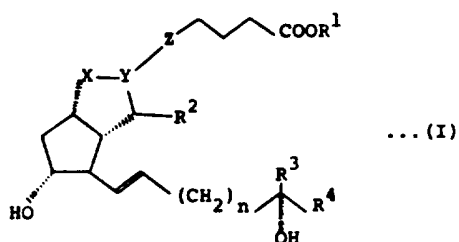
Menetelmä prostaglandiini I₂:a sisältävien rasvaemulsioiden valmistamiseksi
Förfarande för framställning av fettemulsioner, som innehåller prostaglandin I₂

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 97481 (A 61K 31/557)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on rasvaemulsio, joka sisältää seuraavan kaavan (I) mukais-
ta prostaglandiinia I₂, sekä menetelmä sen valmistamiseksi

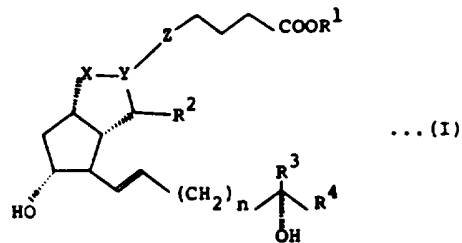


jossa X tarkoittaa happiatomia tai metiini-ryhmää, Y on hiiliatomi, Z tarkoittaa metyleeni- tai metiini-ryhmää; kun X on happiatomi, Y-Z-sidosmuoto on hiili-hiili-kaksoissidos; ja kun X on metiini-ryhmä, X-Y-sidosmuoto on hiili-hiili-kaksoissidos ja Z on metyleeni-ryhmä; R₁ tarkoittaa vetyatomia tai alkyyli-ryhmää, R₂ tarkoittaa vetyatomia tai fluoriatomia, R₃ tarkoittaa vetyatomia, metyyli-ryhmää, etyyli-ryhmää tai vinyyli-ryhmää, R₄ tarkoittaa substituoitua tai substituoimatonta 1...10 hiiliatomia sisältävää alkyyli-ryhmää, substituoitua tai substituoimatonta 2...10 hiiliatomia sisältävää alkenyyli-ryhmää, substituoitua tai substituoimatonta 2...10 hiiliatomia sisältävää alkynyyli-ryhmää tai substituoitua tai substituoimatonta 3...8 hiiliatomia sisältävää syklo-alkyyli-ryhmää; ja n on nolla (0) tai kokonaisluku, jonka arvo on 1.

Nämä rasvaemulsiot ovat stabiileja, pitkäaikaisvaikutteisia ja ne ovat käytökelpoisia sydänverisuonisairauksien hoidossa.

88583

Uppfinningen avser en fettemulsion, som innehåller en prostaglandin I₂ enligt följande formel (I), samt förfarande för dess framställning



där X betecknar en syreatom eller metingrupp, Y är en kolatom, Z betecknar en metylen- eller metingrupp; när X är en syreatom, är Y-Z-bindningsformen en kol-kol-dubbelbindning; och när X är en metingrupp, är X-Y-bindningsformen en kol-kol-dubbelbindning, och Z är en metylengrupp; R₁ betecknar en väteatom eller alkylgrupp, R₂ betecknar en väteatom eller fluoratom, R₃ betecknar en väteatom, metylgrupp, etylgrupp eller vinylgrupp, R₄ betecknar en substituerad eller osubstituerad alkylgrupp med 1...10 kolatomer, en substituerad eller osubstituerad alkenylgrupp med 2...10 kolatomer, en substituerad eller osubstituerad alkynylgrupp med 2...10 kolatomer, eller en substituerad eller osubstituerad cykloalkylgrupp med 3...8 kolatomer; och n är noll (0) eller ett helt tal vars värde är 1.

Fettemulsionerna är stabila, har långtidsverkan och de är användbara vid skötseln av hjärtblodkärlsjukdomar.

Menetelmä prostaglandiini I₂:a sisältävien rasvaemulsioiden valmistamiseksi

Förfarande för framställning av fettemulsioner, som innehåller prostaglandin I₂

Keksintö kohdistuu prostaglandiineja I₂ sisältävien rasvaemulsioiden valmistamiseen. Erityisemmin keksintö kohdistuu uusiin rasvaemulsioihin, jotka sisältävät aktiivisena aineosana prostaglandiineja I₂, jotka vaikuttavat veritukosten liukenemista edistävästi ja ovat lisäksi käyttökelpoisia sydänverisuonijärjestelmän häiriötilojen hoidossa.

Prostaglandiineilla on laaja fysiologisten vaikutusten alue ja niillä on ollut laajaa käyttöä lääkinnässä johtuen niiden erilaisista ja käyttökelpoisista biologisista vaikutuksista, joista mainittakoon ääreisverenkierron parantaminen, verisuonien laajentaminen, haavaumia estävä vaikutus, verenpainetta alentava vaikutus, synnytyksen aloittaminen, veritukosten liukenemista edistävä vaikutus ja astmaa ehkäisevä vaikutus. Viime vuosina näitä yhdisteitä on tutkittu tarkoituksena mahdollisesti löytää uusia vaikutuksia kuten syöpää ehkäisevä vaikutus, luiden aineenvaihdunnan parantaminen, virusten vastainen vaikutus, maksaa suojaava vaikutus, virtsaneritys. Erityisesti luonnossa esiintyvä prostasykliini on paikallinen hormoni, joka pääasiallisesti muodostuu in vivo valtimoiden verisuonien seinämissä. Johtuen sen tehokkaista fysiologisista vaikutuksista, kuten verihiutaleiden kasautumista estävä vaikutus ja verisuonia laajentava vaikutus, tämä paikallinen hormoni muodostaa tärkeän tekijän, joka säättää solujen toimintaa in vivo, ja siksi on pyritty käyttämään luonnollisesti esiintyvää prostasykliiniä sellaisenaan farmaseuttisena tuotteena (P. J. Lewis, J. O. Grady et al., Clinical prostacyclin, Raven Press, N.Y. (1981)).

Toisaalta kun näitä käyttökelpoisia prostaglandiineja käytetään farmaseuttisina tuotteina esiintyy kuitenkin erilaisia ongelmia johtuen prostaglandiineissa luonnostaan esiintyvistä

in vivo epästabiilisuudesta, niiden laajan alueen käsittävän fysiologisten vaikutusten aiheuttamista sivuvaikutuksista ja niiden kemiallisesta epästabiilisuudesta johtuvista formulointivaikeuksista.

Siten on suoritettu intensiivisiä kokeita sekä kotimaassa että ulkomaille tarkoituksena saada kemiallisesti stabiileja syntetettisiä prostasykliinijohdannaisia, jotka olisivat verrannollisia luonnollisesti esiintyvään prostasykliiniin biologisten vaikutusten suhteen.

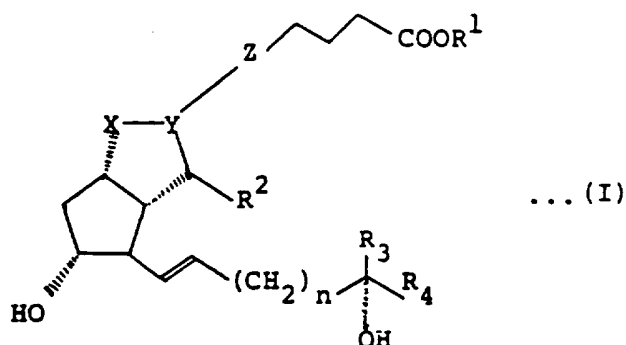
On myös pyritty stabiloimaan kemiallisesti epästabiilia prostasykliiniä annosmuodoissa sekä parantamaan sen lääketehokkuutta. On esimerkiksi ehdotettu menetelmää prostasykliinin stabiloinnin suorittamiseksi klatraattiyhdisteenä käyttäen syklodekstriiniä (Joseph Scesitri et al., japanilainen kuulutusjulkaisu Showa 54-56685), menetelmää prostasykliinin stabiloimiseksi pinta-aktiivisilla aineilla (Moo Yang Chou et al., japanilainen kuulutusjulkaisu Showa 55-15470), farmaseuttisen valmisteen tuottamista muodostamalla ensin prostasykliinin uusi esterijohdannainen, joilla on suurempi liukoisuus rasvaan, emulgoimalla tämä esterijohdannainen rasvaan ja ylläpitämällä sen aktiivisuus verrannollisena alkuperäisen prostasykliinin aktiivisuuteen (Fukaya et al., japanilainen kuulutusjulkaisu Showa 60-13779), jne.

PGE₁ ja PGA₁ sisältäviä rasvaemulsioita on äskettäin ehdotettu käytettäväksi stabiloituina prostaglandiinin rasvavalmisteina, joilla on verisuonia laajentava, verihiutaleiden kasautumista estävä ja verenpainetta alentava vaikutus (Mizushima et al., japanilainen kuulutusjulkaisu Showa 58-222014 ja japanilainen kuulutusjulkaisu Showa 59-141518; ja Mizushima et al., Ann. Rheum. Diseases, 41, 263 (1982); Pharm. Pharmacol., 35, 398 (1983)). Tällaisia tekniikoita sovelletaan kasvaintenvastaisen aineiden valmistuksessa. On esitetty myös ehdotus, joka koskee parannusta syövänvastaisten lääkkeiden selektiivisessä saattamisessa kohde-elimien (Okamoto et al., japanilainen kuulutusjulkaisu Showa 59-122423).

Keksijät huomasivat ylläesitetyt tosiseikat ja suorittivat intensiivistä tutkimusta eräillä kemiallisesti stabiileilla synteettisillä prostaglandiineilla I₂ tarkoituksena pidentää niiden vaikutusta ja parantaa niiden lääkinällistä tehokkuutta. Tämän seurauksena valmistettiin mainitut stabiileja prostaglandiineja I₂ sisältävät rasvaemulsiot ja huomattiin, että nämä valmisteet olivat täyttäneet nämä tarkoitukset. Keksijät näin ollen päätyivät esillä olevaan keksintöön, jonka tunnusmerkit ilmenevät oheisista patenttivaatimuksista.

Näin ollen keksinnön kohteena on menetelmä prostaglandiini I₂:a sisältävän, lääkinällisesti tehokkaan rasvaemulsion valmistamiseksi, jossa menetelmässä emulgoidaan seos, joka käsittää 5...50 % (w/v) kasviöljyä, 1...50 osaa fosfolipidiä 100 osaa kasviöljyä kohti, 1,0 mg/ml ... 0,2 µg/ml vähintään yhtä prostaglandiini I₂:a ja loput vettä.

Keksinnön mukaiset rasvaemulsiot sisältävät seuraavan kaavan (I) edustamia prostaglandiineja I₂



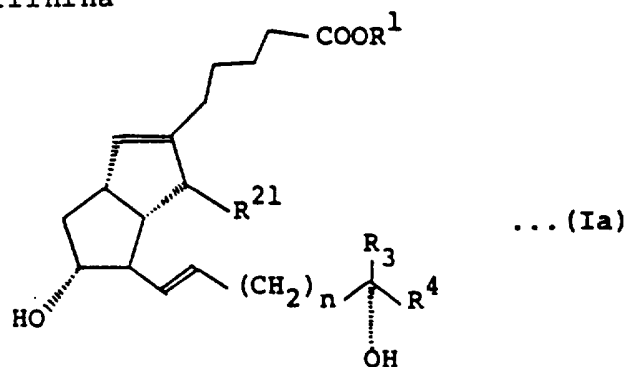
jossa X tarkoittaa happiatomia tai metiiniiryhmää, Y on hiili-atomi, Z tarkoittaa metyleeni- tai metiiniiryhmää; kun X on happiatomi, Y-Z-sidosmuoto on hiili-hiili-kaksoissidos; ja kun X on metiiniiryhmä, X-Y-sidosmuoto on hiili-hiili-kaksoissidos ja Z on metyleeniiryhmä; R₁ tarkoittaa vetyatomia tai alkyyli-ryhmää, R₂ tarkoittaa vetyatomia tai fluoriatomia, R₃ tarkoittaa vetyatomia, metyyliiryhmää, etyyliiryhmää tai vinyyliiryhmää. R₄ tarkoittaa substituoitua tai substituoimatonta 1...10 hiiliatomia sisältävää alkyyliiryhmää, substituoitua tai substituoimatonta 2...10 hiiliatomia sisältävää alkenyyliiryhmää, substituoitua tai substituoimatonta 2...10 hiiliatomia sisäl-

tävää alkynyyliryhmää tai substituoitua tai substituoimatonta 3...8 hiiliatomia sisältävää sykloalkyyliryhmää; ja n on nolla (0) tai kokonaisluku, jonka arvo on 1.

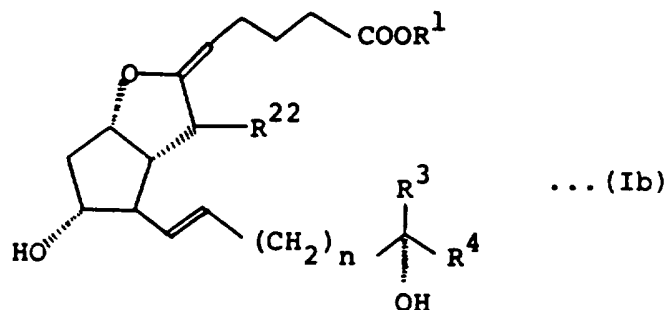
Keksinnön mukaiset rasvaemulsiot ovat uusia rasvaemulsioita, jotka sisältävät kemiallisesti stabiileja prostaglandiineja I₂. Tällaisilla rasvaemulsioilla on pitempivaikutteinen teho, parantunut prostaglandiinien I₂ stabiilisuus, alentunut sivuvaikutusten esiintyminen ja niillä on samanaikaisesti tehokkaat farmakologiset vaikutukset ja niitä voidaan käyttää valmisteina, jotka on tarkoitettu suonensisäistä annostamista varten.

Useimmat prostaglandiinit I₂ edellä mainitussa kaavassa (I) ovat niitä yhdisteitä, joiden tunnetaan olevan stabiloituja prostaglandiineja I₂ (japanilainen kuulutusjulkaisu Showa 58-150583, jonka hakemusnumero on Showa 57-32981).

Edellä mainitussa kaavassa (I) X tarkoittaa happiatomia tai metiiniiryhmää, Y on hiiliatomi, Z tarkoittaa metyleeni- tai metiiniiryhmää; kun X on happiatomi, Y-Z-sidosmuoto on hiilihiili-kaksoissidos, ja kun X on metiiniiryhmä, X-Y-sidosmuoto on hiilihiili-kaksoissidos ja Z on metyleeniiryhmä. Näistä määritelmistä lähtien tässä keksinnössä oleva aktiivinen aineosa ilmoitetaan seuraavan kaavan (Ia) mukaisena isokarbasykliininä



(jossa R₁, R₃, R₄ ja n tarkoittavat samaa kuin edellä; R₂₁ tarkoittaa vetyatomia), tai seuraavan kaavan (Ib) mukaisena 7-fluoriprostasykliininä:



(jossa R_1 , R_3 , R_4 ja n tarkoittavat samaa kuin edellä; R_{22} tarkoittaa fluoriatomia).

Edellä esitetyssä kaavassa (I) R_1 on vetyatomi tai alkyyli-ryhmä. Alkyyli-ryhmänä voi olla 1...10 hiiliatomia sisältävä alkyyli-ryhmä, kuten metyyli-, etyyli-, propyyli-, butyyli-, pentyyli-, heksyyli-, oktyyli- ja dekyyli-ryhmä. R_1 on edullisesti vetyatomi tai metyyli-ryhmä.

R_4 tarkoittaa substituoitua tai substituoimatonta 1...10 hiiliatomia sisältävää alkyyli-ryhmää, substituoitua tai substituoimatonta 2...10 hiiliatomia sisältävää alkenyyli-ryhmää, substituoitua tai substituoimatonta 2...10 hiiliatomia sisältävää alkynyyli-ryhmää tai substituoitua tai substituoimatonta 3...10 hiiliatomia sisältävää sykloalkyyli-ryhmää. Substituoimatonta 1...10 hiiliatomia sisältävä alkyyli-ryhmä voi olla esimerkiksi metyyli-, propyyli-, butyyli-, pentyyli-, heksyyli-, oktyyli- tai dekyyli-ryhmä, jne. Substituoimatonta 2...10 hiiliatomia sisältävä alkenyyli-ryhmä voi olla esimerkiksi vinyyli-, 2-propenyli-, 3-butenyli-, 2-pentenyli-, 2-metyyli-3-pentenyli-, 2-heksenyli-, 5-metyyli-4-heksenyli-, 2,6-dimetyyli-5-heptenyli-ryhmä, jne. Substituoimatonta 2...10 hiiliatomia sisältävä alkynyyli-ryhmä voi olla esimerkiksi 2-butyynyli-, 3-butyynyli-, 1-metyyli-2-pentyynyli-, 1-metyyli-3-pentyynyli-, 2-heksyynyli-, 4-heksyynyli-ryhmä, jne. Substituoimatonta 3...8 hiiliatomia sisältävä sykloalkyyli-ryhmä voi olla esimerkiksi syklopropyyli-, syklopentyyli-, sykloheksyyli-ryhmä, jne.

Näiden alkyyli-, alkenyyli-, alkynyli- ja sykloalkyyli-ryhmien substituentteina voivat olla esimerkiksi halogeeniatomit kuten fluori ja kloori, alemmat alkoksiryhmät kuten metoksi-, etoksi-, propoksi- ja butoksiryhmät, halogeenialkyyli-ryhmä kuten trifluorimetyyli, substituoitu tai substituimaton fenoksiryhmä, joka on mahdollisesti substituoitu halogeeniatomilla tai alemmalla alkoksiryhmällä, jne.

Kaavan (I) mukaiset prostaglandiinit I_2 voidaan valmistaa esimerkiksi menetelmillä, jotka on selitetty japanilaisessa kuulutusjulkaisussa Showa 58-150583 ja japanilaisessa kuulutusjulkaisussa Showa 57-32981.

Edellä esitetyn kaavan (I) edustamat stabiilit prostaglandiinit I_2 ovat erityisesti lueteltu alla seuraavasti:

- (1) isokarbasykliini
- (2) 16,17,18,19,20-pentanor-15-syklopentyyli-isokarbasykliini
- (3) 16,17,18,19,20-pentanor-15-sykloheksyyli-isokarbasykliini
- (4) 17,20-dimetyyli-isokarbasykliini
- (5) 15-deoksi-16-hydroksi-isokarbasykliini
- (6) 15-deoksi-16-hydroksi-16,20-dimetyyli-isokarbasykliini
- (7) 7-fluoriprostasykliini
- (8) 7-fluori-16,17,18,19,20-pentanor-15-syklopentyyliprostasykliini
- (9) 7-fluori-16,17,18,19,20-pentanor-15-sykloheksyyliprostasykliini
- (10) 7-fluori-17,20-dimetyyliprostasykliini
- (11) 7-fluori-16,16-dimetyyliprostasykliini
- (12) 7,16-difluoriprostasykliini
- (13) 15-deoksi-16-hydroksi-7-fluoriprostasykliini
- (14) 15-deoksi-16-hydroksi-7,16-difluoriprostasykliini
- (15) Edellisten kohtien (1)...(14) metyyliesterit.

Keksinnön mukaiset rasvaemulsiot käsittävät pääasiallisina komponentteina kaavan (I) mukaisia prostaglandiineja I_2 , 5...50 % w/v (paino/tilavuus) kasvisöljyä, 1...50 osaa, edul-

lisesti 5...10 osaa fosfolipidiä 100 osaa kohti kasvisöljyä, sekä sopivan määrän vettä.

Kasvisöljy voi olla soiijapapuöljyä, puuvillansiemenöljyä, sesamöljyä, safloriöljyä ja maissiöljyä, mutta se on edullisesti soiijapapuöljyä.

Soiijapapuöljyn paras valinta on erittäin puhdas raffinoitu soiijapapuöljy. Se on edullisesti erittäin hyvin puhdistettua, raffinoitua soiijapapuöljyä, joka on saatu edelleen puhdistamalla tavallista raffinoitua soiijapapuöljyä esimerkiksi höyrytistlaamalla.

Fosfolipidinä on puhdistettu fosfolipidi, kuten munankeltuisen lesitiiniä ja soiijapapulesitiiniä. Voidaan käyttää fosfolipidiä, joka on valmistettu fraktionoimalla käyttäen orgaanista liuotinta tavanomaisella tavalla, toisin sanoen lisäämällä hitaasti, sekoittaen asetonia raakaan munankeltuaisfosfolipidiin, joka on liuotettu n-heksaanin ja asetonin kylmään seokseen, keräämällä liukenematon aines suodattamalla, toistamalla liuotuskäsittely, jota seuraa saostaminen ja lopuksi poistamalla liuotin tistlaamalla. Tuote käsittää pääasiallisina komponentteinaan fosfatidyylikoliinia ja fosfatidyylietanoliamiinia. Muut fosfolipidit voivat olla fosfatidyyli-inositolia, fosfatidyyliiseriiniä, sfingomyeliiniä, jne.

Keksinnön mukaan rasvaemulsioon voidaan tarvittaessa lisätä edelleen emulgoimisen apuainetta, stabilointiainetta, suuren molekyylipainon omaavia aineita, isotonoivia aineita jne.

Emulgoitumisen apuaineina voivat esimerkiksi olla jopa 0,3 % w/v (paino/tilavuus) 6...22, edullisesti 12...20 hiiliatomia sisältäviä rasvahappoja tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, jne. Mitä tahansa 6...22 hiiliatomia sisältävää rasvahappoa voidaan käyttää mikäli niitä voidaan lisätä farmaseuttiseen tuotteeseen. Tällaiset rasvahapot ovat joko suora-ketjuisia tai haaroituneita. Edullisia ovat steariini-,

oleiini-, linoli-, palmitiini-, linoleeni- ja myristiinihapot. Nämä suolat voivat olla suoloja alkalimetallien kuten natriumin ja kaliumin kanssa, maa-alkalimetallien kuten kalsiumin kanssa, jne.

Stabilisoivana aineena voi esimerkiksi olla alle 0,5 % w/v, edullisesti alle 0,1 % w/v kolesterolia, alle 5 % w/v, edullisesti alle 1 % w/v fosfatidihappoa, jne.

Suuren molekyylipainon omaavina yhdisteinä voi olla esimerkiksi 0,1...5 paino-osaa, edullisesti 0,5...1 paino-osaa albumiinia, dekstraania, vinyylipolymeeriä, ei-ionisia pinta-aktiivisia aineita, gelatiinia, hydroksietyylitärkkelystä, jne. prostaglandiinien I₂ yhtä paino-osaa kohti.

Albumiinina voi edullisesti olla ihmisestä peräisin oleva albumiini, vinyylipolymeerinä voi olla polyvinyylipyrrolidoni, jne. Ei-ionisina pinta-aktiivisina aineina voivat olla esimerkiksi polyalkyleeniglykolit, polyoksialkyleenikopolymeerit, kovetetun risiiniöljyn polyoksialkyleenijohdannaiset, risiiniöljyn polyoksialkyleenijohdannaiset, jne.

Prostaglandiinien I₂ pitoisuutta rasvaemulsioissa voidaan sopivasti suurentaa tai vähentää riippuen emulsioiden ja annostapojen muodosta. Yleensä erittäin pieni määrä, esimerkiksi 1,0 mg...0,2 µg/ml rasvaemulsiossa on riittävä määrä.

Keksinnön mukaiset rasvaemulsiot valmistetaan esimerkiksi seuraavalla tavalla:

Ennalta määrätyt määrät kasvisöljyä, fosfolipidiä ja prostaglandiineja I₂ ja muita lisäaineita sekoitetaan keskenään ja seosta lämmitetään liuoksen muodostamiseksi. Liuos homogenisoidaan esimerkiksi käyttämällä suurella suihkutuspaineella toimivan tyyppistä homogenisaattoria, ultraäänihomogenisaattoria, jne. Homogenaatti homogenoidaan uudelleen sen jälkeen kun on lisätty tarpeellinen määrä vettä keksinnön mukaisten

rasvaemulsioiden valmistamiseksi. Valmistusolosuhteissa lisäaineet kuten stabilointiaine ja isotonisointiaine voidaan lisätä sen jälkeen kun rasvaemulsio on muodostettu.

Rasvaemulsioita voidaan antaa ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti kuten esimerkiksi ruiskeena, edullisimmin suonensisäisesti. Prostaglandiineja I_2 annetaan esimerkiksi suonensisäisesti jatkuvana nesteruiskeena kerran päivässä annostason ollessa 0,01...0,1 $\mu\text{g/kg}$ tai 0,01...0,1 ng/kg/min . Keksinnön mukaisilla rasvaemulsioilla on erittäin tehokas vaikutus. Ne toimivat kauan pitkäaikaisen vapautumisen johdosta ja kohdistuvat selektiivisesti vammoihin; siten pienten annosten antaminen mahdollistaa tehokkaan hoidon.

Koska aineita voidaan antaa suonensisäisesti, voidaan odottaa, että vaikutus alkaa nopeasti, lääkkeen tehokkuus on tasainen, ja koska annokset ovat pieniä, on sivuvaikutusten ilmeneminen pienempi.

Valmisteen osaset ovat lisäksi äärimmäisen pieniä ja niiden keskimääräinen koko on alle 1,0 μ . Varmuus (stabiilisuus) varastoinnissa on hyvä.

Viitaten seuraaviin esimerkkeihin selitetään parhaat menetelmät keksinnön soveltamiseksi.

Esimerkki 1

Isokarbasykliiniä (yhdiste I) sisältävän rasvaemulsion valmistaminen

10 grammaan raffinoitua soi-japapuuöljyä lisättiin 1,2 g munan-keltuaislesitiiniä ja 1000 μg isokarbasykliiniä. Seosta kuumennettiin 60...80 °C:ssa liuokseksi. Liuokseen lisättiin 50 ml tislattua vettä ja tämän jälkeen 2,5 g glyserolia. Ruisketta varten lisättiin tislattua vettä siten että liuoksen määrä

nousi 100 ml:aan. Liuos homogenoitiin karkeasti homo-sekoittimessa.

Käyttäen Manton-Gaulin homogenaattoria raaka emulsio emulgoitiin sitten edelleen johtamalla se 10 kertaa laitteen läpi ensimmäisen vaiheen paineen ollessa 120 kg/cm^2 ja kokonaispaineen ollessa 500 kg/cm^2 . Näin saatiin homogenoitu, hienojakoisesti dispergoitunut 10 % soijapapuöljyä sisältävä rasvaemulsio, joka sisälsi isokarbasykliiniä (yhdistettä I) lopullisen konsentraation ollessa $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Esimerkki 2

Rasvaemulsioiden valmistaminen kun emulsiot sisälsivät 16,17,18,19,20-pentanor-15-pentyyli-isokarbasykliiniä (yhdistettä II), 7-fluori-16,17,18,19,20-pentanor-15-syklopentyyli-prostasykliinin metyyliesteriä (yhdistettä III) ja vastaavasti isokarbasykliinin metyyliesteriä (yhdistettä IV)

Käyttäen yhdisteitä II, III ja IV 10 % soijapapuöljyä sisältävät rasvaemulsiot valmistettiin samalla tavalla kuin esimerkissä 1, jolloin kukin emulsioista sisälsi yllämainittua yhdistettä niin paljon, että lopullinen konsentraatio oli $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$, $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ja vastaavasti $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Esimerkit 5...16

Lääkinnällisen vaikutuksen arviointi käyttäen ihmisen verihiutaleita

Keksinnön mukaisen rasvaemulsion kykyä muodostaa syklistä AMP:tä ajan kuluessa määritettiin käyttäen ihmisen verihiutaleita ja näitä arvoja verrattiin emulgoimattoman yhdisteen vastaavaan kykyyn. 50 ml ihmisen verta kerättiin käyttäen 1 osaa 3,8 prosenttista natriumsitraattia 9 osaa verta kohti. Verinäyte sentrifugoitiin nopeudella 1300 kierr/min 10 minuuttia. Ylempi kerros otettiin talteen PRP:nä (verihiutalerikkaa-

na plasmana) ja sentrifugoitiin nopeudella 3000 kierr/min 20 minuuttia. Näin saatu saostuma (verihiutaleet) suspendoitiin 2 ml:aan Tris-puskuroitua suola-glukoosi-EDTA-liuosta (TSG-EDTA) (pH 7,4).

Rasvaemulsioon, joka oli aikaisemmin siirretty 350 μ l TSG-EDTA:ta ja 50 μ l verihiutalesuspensiota sisältävään muoviputkeen ja inkuboitu 37 °C:ssa, lisättiin 50 μ l suolaliuokseen liuotettua 5 mM isobutyylimetyyliksantiinia, ja 2 minuuttia tämän jälkeen reaktiot keskeytettiin 0,5 ml:lla 10 prosenttista trikloorietikkahappoa (TCA). Solut rikottiin sulattamalla lyofilisoitu näyte solunsisäisen syklisen AMP:n (C-AMP) vapauttamiseksi. TCA poistettiin vedellä kyllästetyllä eetterillä, minkä jälkeen C-AMP-pitoisuus määritettiin radioimmunologiatekniikan (radioimmunoassay technique) avulla.

Tulokset on esitetty Taulukossa 1. Kuten näistä tuloksista selvästi ilmenee, todettiin, että rasvaemulsion C-AMP:n tuotantokyky pysyi tyydyttävänä pitemmän ajan.

Taulukko 1. Rasvaemulsion kyky tuottaa ja ylläpitää syklistä AMP:tä

Esimerkit	Yhdisteet	Aika (min)	C-AMP tuotanto (pikomooli)	Suhteellinen arvo (%)
Esim. 5	Rasvaemulsio (I)	0	80	100
" 6	Rasvaemulsio (I)	30	100	125
" 7	Rasvaemulsio (I)	60	100	125
Vertailu				
1	Yhdiste (I)	0	320	100
" 2	Yhdiste (I)	30	200	63
" 3	Yhdiste (I)	60	100	31

Esim. 8	Rasvaemulsio (II)	10	130	100
" 9	Rasvaemulsio (II)	30	190	146
" 10	Rasvaemulsio (II)	60	100	76

Vertailu

4	Yhdiste	(II)	10	430	100
" 5	Yhdiste	(II)	30	320	74
" 6	Yhdiste	(II)	60	120	27

Esim. 11	Rasvaemulsio (III)	30	55	100
" 12	Rasvaemulsio (III)	60	30	55
" 13	Rasvaemulsio (III)	120	30	55

Vertailu

7	Yhdiste	(III)	30	100	100
" 8	Yhdiste	(III)	60	90	90
" 9	Yhdiste	(III)	120	40	40

Esim. 14	Rasvaemulsio (IV)	30	40	100
" 15	Rasvaemulsio (IV)	30	45	111
" 16	Rasvaemulsio (IV)	120	28	70

Esimerkki 17

Verihiutaleiden kasautumista estävän vaikutuksen arviointi

50 µl Esimerkeissä 1 ja 2 saatuja rasvaemulsioita siirrettiin kutakin 950 µl:aan suolaliuosta tai 2 prosenttista härän seerumin albumiinia (BSA) ja inkuboitiin 37 °C:ssa 1, 3 ja 10 minuuttia. Tämän jälkeen PRP:n ADP verihiutaleiden kasautumista estävä vaikutus määritettiin käyttäen suodatetta, joka oli läpäissyt 0,025 µm suodattimen. Tietty määrä ennen suodattamista laimennettua liuosta lisättiin PRP:hen ja inkuboitiin 37 °C:ssa minuutin ajan. Tämän jälkeen aiheutettiin ADP-kasautuminen annosta vastaavan käyrän tuottamiseksi. Tästä käyrästä laskettiin verihiutaleiden kasautumista estävä vaikutus. Tulokset on esitetty Taulukossa 2.

Taulukko 2. Verihiutaleiden kasautumista estävä vaikutus

Olosuhteet		Verihiutaleiden kasautumista estävä vaikutus (%)			
Liuottimet	Inkubointi-aika (min)	Rasva-emulsio (IV)	Yhdiste (IV)	Rasva-emulsio (I)	Yhdiste (I)
2 % BSA	1	13,7	65,4	87,5	100,1
	3	23,1	NT	83,5	NT
	10	27,1	56,2	90,6	107,7
Suolaliuos	10	-	-	14,1	41,1

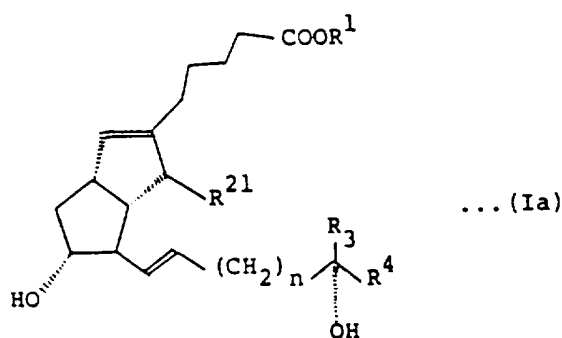
Kuten Taulukosta 2 ilmenee keksinnön mukaisissa rasvaemulsioissa oleva aktiivinen aineosa, prostaglandiini I₂, vapautuu vähitellen ja siten annosmuodot aikaansaavat pitkäaikaisen annostuksen.

Tuleva teollinen käyttö

Keksinnön mukaisilla, prostaglandiineja I₂ sisältävillä rasvaemulsioilla on tehokkaat vaikutukset, ne aikaansaavat pitkäaikaisesti vapautuvan annostuksen, ja ne ovat selektiivisiä vammoja kohti. Tästä johtuen ne voivat aikaansaada tehokkaan hoidon pieninä annoksina ja ne ovat erittäin käyttökelpoisia erilaisten sydänverisuonitautien, kuten veritukossairauksien hoidossa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä prostaglandiini I₂:a sisältävän, lääkinnäisesti tehokkaan rasvaemulsion valmistamiseksi, t u n n e t - t u siitä, että emulgoidaan seos, joka käsittää 5...50 % (w/v) kasviöljyä, 1...50 osaa fosfolipidiä 100 osaa kasviöljyä kohti, 1,0 mg/ml ... 0,2 µg/ml vähintään yhtä seuraavan kaavan (Ia) mukaista prostaglandiini I₂:a ja loput vettä



missä

R¹ on vetyatomi tai alkyyyliryhmä;

R²¹ on vetyatomi;

R³ on vetyatomi, metyyliiryhmä, etyyliiryhmä tai vinyyliiryhmä;

R⁴ on substituoitu tai substituoimaton 1...10 hiiliatomia sisältävä alkyyliiryhmä, substituoitu tai substituoimaton 2...10 hiiliatomia sisältävä alkenyyliiryhmä, substituoitu tai substituoimaton 2...10 hiiliatomia sisältävä alkynyyliiryhmä, tai substituoitu tai substituoimaton 3...8 hiiliatomia sisältävä sykloalkyyliiryhmä, ja

n on 0 tai 1,

missä mainitut alkyyli-, alkenyyli-, alkynyyli- ja sykloalkyyli-ryhmien substituentit on valittu ryhmästä, joka koostuu halogeenista, alemmasta alkoksista, halogeenialkyylistä, substituoimattomasta fenoksista, halogeenisubstituoidusta fenoksista ja alemmalla alkoksilla substituoidusta fenoksista.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä prostaglandiinia I₂:a sisältävän rasvaemulsion valmistamiseksi, t u n n e t - t u siitä, että mainittu substituentti on fluori, kloori, metoksi, etoksi, propoksi, butoksi tai trifluorimetyyli.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä prostaglandiinia I₂:a sisältävän rasvaemulsion valmistamiseksi, t u n n e t - t u siitä, että R⁴ on substituoitu tai substituoimaton 1...10 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä, tai substituoitu ja substituoimaton 3...8 hiiliatomia sisältävä sykloalkyyliryhmä.

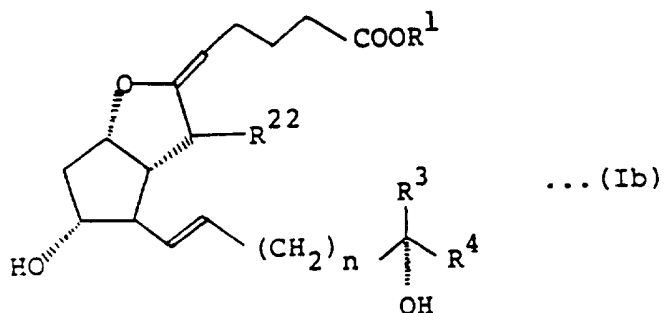
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä prostaglandiinia I₂:a sisältävän rasvaemulsion valmistamiseksi, t u n n e t - t u siitä, että R⁴ on substituoimaton 1...10 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä tai substituoimaton 3...8 hiiliatomia sisältävä sykloalkyyliryhmä.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä prostaglandiinia I₂:a sisältävän rasvaemulsion valmistamiseksi, t u n n e t - t u siitä, että R¹ on alkyyliryhmä.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä prostaglandiinia I₂:a sisältävän rasvaemulsion valmistamiseksi, t u n n e t - t u siitä, että R¹ on alkyyliryhmä, R²¹ on vetyatomi, R³ on vetyatomi, R⁴ on 1...10 hiiliatomia sisältävä substituoimaton alkyyliryhmä tai 3...8 hiiliatomia sisältävä substituoimaton sykloalkyyliryhmä.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä prostaglandiinia I₂:a sisältävän rasvaemulsion valmistamiseksi, t u n n e t - t u siitä, että R¹ on metyyliryhmä, R²¹ on vetyatomi, R³ on vetyatomi, R⁴ on pentyyliryhmä ja n on 0.

8. Menetelmä prostaglandiinia I₂:a sisältävän, lääkinällisesti tehokkaan rasvaemulsion valmistamiseksi, t u n n e t - t u siitä, että emulgoidaan seos, joka käsittää 5...50% (w/v) kasviöljyä, 1...50 osaa fosfolipidiä 100 osaa kasviöljyä kohti, 1,0 mg/ml ... 0,2 µg/ml vähintään yhtä seuraavan kaavan (Ib) mukaista prostaglandiini I₂:a ja loput vettä



missä

R¹ on vetyatomi tai alkyyliryhmä;

R²² on fluoriatomi;

R³ on vetyatomi, metyyliryhmä, etyyliryhmä tai vinyyliryhmä;

R⁴ on substituoitu tai substituoimaton 1...10 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä, substituoitu tai substituoimaton 2...10 hiiliatomia sisältävä alkenyyliryhmä, substituoitu tai substituoimaton 2...10 hiiliatomia sisältävä alkynyyliryhmä, tai substituoitu tai substituoimaton 3...8 hiiliatomia sisältävä sykloalkyyliryhmä, ja

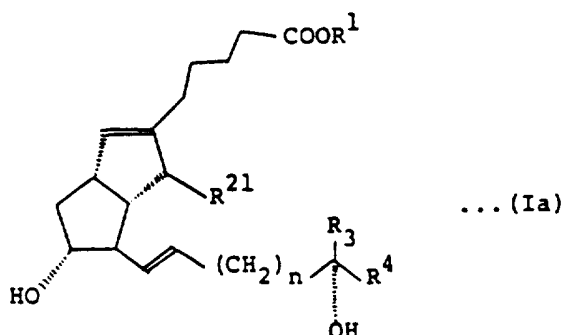
n on 0 tai 1,

missä mainitut alkyyl-, alkenyyl-, alkynyyl- ja sykloalkyyliryhmien substituentit on valittu ryhmästä, joka koostuu halogeenista, alemmasta alkoksista, halogeenialkyylistä, substituoimattomasta fenoksista, halogeenisubstituoidusta fenoksista ja alemmalla alkoksilla substituoidusta fenoksista.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä prostaglandiini I₂:a sisältävän rasvaemulsion valmistamiseksi, t u n n e t - t u siitä, että mainittu substituentti on fluori, kloori, metoksi, etoksi, propoksi, butoksi tai trifluorimetyyli.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en medicinskt effektiv fettemulsion som innehåller prostaglandin I_2 , k ä n n e - t e c k n a t av att man emulgerar en blandning som innefattar 5...50 % (w/v) växtolja, 1...50 delar fosfolipid per 100 delar växtolja, 1,0 mg/ml ... 0,2 µg/ml av minst en prostaglandin I_2 med följande formel (Ia) samt resten vatten



där

R^1 är en väteatom eller en alkylgrupp;

R^{21} är en väteatom;

R^3 är en väteatom, en metylgrupp, etylgrupp eller vinylgrupp;

R^4 är en substituerad eller osubstituerad alkylgrupp med 1...10 kolatomer, en substituerad eller osubstituerad alkenylgrupp med 2...10 kolatomer, en substituerad eller osubstituerad alkynylgrupp med 2...10 kolatomer, eller en substituerad eller osubstituerad cykloalkylgrupp med 3...8 kolatomer, och n är 0 eller 1,

där substituenterna för nämnda alkyl-, alkenyl-, alkynyl- och cykloalkylgrupper är valda ur en grupp som består av halogen, lägre alkoxi, halogenalkyl, osubstituerad fenoxi, halogen-substituerad fenoxi och med lägre alkoxi substituerad fenoxi.

2. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av en fettemulsion som innehåller prostaglandin I_2 , k ä n n e - t e c k n a t av att nämnda substituent är fluor, klor, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi eller trifluormetyl.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av en fettemulsion som innehåller prostaglandin I_2 , k ä n n e - t e c k n a t av att R^4 är en substituerad eller osubstituerad alkylgrupp med 1...10 kolatomer eller en substituerad eller osubstituerad cykloalkylgrupp med 3...8 kolatomer.

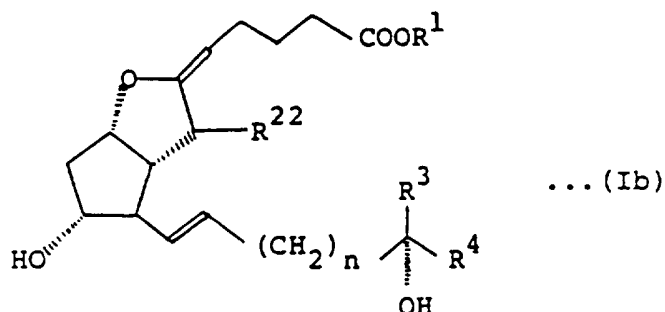
4. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av en fettemulsion som innehåller prostaglandin I_2 , k ä n n e - t e c k n a t av att R^4 är en osubstituerad alkylgrupp med 1...10 kolatomer eller en osubstituerad cykloalkylgrupp med 3...8 kolatomer.

5. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av en fettemulsion som innehåller prostaglandin I_2 , k ä n n e - t e c k n a t av att R^1 är en alkylgrupp.

6. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av en fettemulsion som innehåller prostaglandin I_2 , k ä n n e - t e c k n a t av att R^1 är en alkylgrupp, $R^{2,1}$ är en väteatom, R^3 är en väteatom, R^4 är en osubstituerad alkylgrupp med 1...10 kolatomer eller en osubstituerad cykloalkylgrupp med 3...8 kolatomer.

7. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av en fettemulsion som innehåller prostaglandin I_2 , k ä n n e - t e c k n a t av att R^1 är en metylgrupp, $R^{2,1}$ är en väteatom, R^3 är en väteatom, R^4 är en pentylgrupp och n är 0.

8. Förfarande för framställning av en medicinalt effektiv fettemulsion som innehåller prostaglandin I_2 , k ä n n e - t e c k n a t av att man emulgerar en blandning som innefattar 5...50% (w/v) växtolja, 1...50 delar fosfolipid per 100 delar växtolja, 1,0 mg/ml ... 0,2 μ g/ml av minst en prostaglandin I_2 med följande formel (Ib) och resten vatten



där

R¹ är en väteatom eller en alkylgrupp;

R²² är en fluoratom;

R³ är en väteatom, en metylgrupp, etylgrupp eller vinylgrupp;

R⁴ är en substituerad eller osubstituerad alkylgrupp med 1...10 kolatomer, en substituerad eller osubstituerad alkenylgrupp med 2...10 kolatomer, en substituerad eller osubstituerad alkynylgrupp med 2...10 kolatomer eller en substituerad eller osubstituerad cykloalkylgrupp med 3...8 kolatomer, och n är 0 eller 1,

där de nämnda alkyl-, alkenyl-, alkynyl- och cykloalkylgruppernas substituent är valda ur gruppen som består av halogen, lägre alkoxi, halogenalkyl, osubstituerad fenoxi, halogensubstituerad fenoxi och lägre alkoxisubstituerad fenoxi.

9. Förfarande enligt patentkravet 8 för framställning av en fettemulsion som innehåller prostaglandin I₂, k ä n n e - t e c k n a t av att nämnda substituent är fluor, klor, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi eller trifluormetyl.