



FI000101676B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen(12) PATENTTIJULKAISU  
PATENTSKRIFT

(10) FI 101676 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 14.08.1998

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

A 61K 9/16, 9/08, 9/52, 9/56  
38/02, 38/27, 47/44

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 911531

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 28.03.1991

(24) Alkupaivä - Löpdag 28.03.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 01.10.1991

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

30.03.1990 US 502382 P

(73) Haltija - Innehavare

1. American Cyanamid Company, One Cyanamid Plaza, Wayne, NJ 07470, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Steber, William, 30 Mooney Road, Ledgewood, NJ 07852, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab, Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Parannettu menetelmä stabiilin mikrohelmikoostumuksen valmistamiseksi  
Förbättrat förfarande för framställning av en stabil mikrosfärkomposition

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 873465 (A 61K 37/02, American Cyanamid Co.),  
EP A 0195476 (A 61K 9/52, Procter & Gamble Company)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee stabiileja, parenteraalisesi annettaviksi soveltuvia mikrohelmikoostumuksia, jotka sisältävät rasvaa tai vahaa tai niiden seosta, biologisesti aktiivista proteiinia, peptidiä tai polypeptidiä ja öljyä, puolipehmeätä rasvaa, rasvahappojohdannaista tai niiden seosta. Keksintö koskee myös menetelmää mikrohelmikoostumusten valmistamiseksi.

Uppfinningen avser stabila mikrosfäriska kompositioner, vilka lämpar sig för parenteral administration och vilka innehåller fett eller vax eller blandningar därav; ett biologiskt aktivt protein, en peptid eller polypeptid; och en olja, halvmjukt fett, ett fettsyra-derivat eller blandningar av dessa. Uppfinningen avser även ett förfarande för framställning av de mikrosfäriska kompositionerna.

**Parannettu menetelmä stabiilin mikrohelmikoostumuksen valmistamiseksi**

5 US-patenttijulkaisussa 4 837 381 on esitetty mikrohelmikoostumus, joka sisältää rasvaa tai vahaa tai niiden seosta sekä biologisesti aktiivista proteiinia, peptidiä tai polypeptidiä ja joka soveltuu parenteraalisesti annettavaksi. Patenttijulkaisussa on tuotu esiin koostumusten soveltuvuus proteiinin, peptidin tai polypeptidin hitaaseen vapauttamiseen parenteraalisessa annossa sekä esitety menetelmiä kasvuhormonin tason kohottamiseksi ja korkeampien tasojen säilyttämiseksi käsiteltyjen eläinten veressä pitkään ja siten eläinten painon lisäämiseksi ja maitoa erittävien eläinten maidontuotannon kohottamiseksi keksinnön mukaisia koostumuksia antamalla.

10 Biologisesti aktiivisia makromolekyylejä sisältävien ja niitä hitaasti vapauttavien farmaseuttisten koostumusten kehittämiseen liittyy erityisongelmia, johtuen makromolekyylien koosta ja monimutkaisuudesta. Nämä ongelmat tulevat esille sekoitettaessa makromolekyylejä, erityisesti proteiineja, jotka ovat alttiita kemiallisille ja rakenteellisille muutoksille, farmaseuttisten täyteaineiden kanssa, sekä koostumusten valmistuksen ja varastoinnin yhteydessä. Nämä ongelmat ovat farmaseuttisen formuloinnin asiantuntijoiden tiedossa, ja ne voidaan luokitella kemialliseen stabiilisuuteen liittyviksi ongelmiksi. Makromolekyylien rakenteen irreversiibelistä muuttumisesta ja/tai vuorovaikutuksesta täyteaineiden kanssa seurauksena oleva farmaseuttisten koostumusten riittämätön kemiallinen stabiilisuus voi johtaa koostumuksiin, jotka joko ovat inaktiivisia tai eivät saa aikaan halutun tasoista biologista vastetta.

15 Toisen ongelmaryhmän farmaseuttisten koostumusten tapauksessa muodostaa fysikaalinen stabiilisuus. Yksi itsestään selvä esimerkki on tablettien tai implantaattien

hankautuminen valmistuksen, pakkauksen tai varastoinnin aikana. Toinen esimerkki on voiteen, tahnan tai geelin fysikaalinen erottuminen komponenteikseen, mikä voi johtaa vaikuttavan aineosan epätasaiseen jakautumiseen ja konsistenssin muuttumiseen. Sellaisen formulaa fysikaalisen heikkenemisen seurauksena voi olla toivottujen helppokäyttöisyysominaisuuksien menetys ja ennalta arvaamaton annostus potilaalle. Sellaisia farmaseuttisessa koostumuksessa ilmeneviä muutoksia, jotka eivät ole yhtä selviä, ovat erilaiset täyteaineiden kiderakenteen tai mikroskooppisen rakenteen muutokset. Tämäntyyppiset muutokset voivat johtaa huomattaviin muutoksiin vaikuttavien aineiden vapautumisessa. Lienee selvää, että farmaseuttisissa annostusmuodoissa tapahtuvat fysikaalisen stabiilisuuden muutokset, ovatpa antomuodot sitten tarkoitettuja suun kautta tai parenteraalisesti annettaviksi, olisivat ongelmallisimpia hitaasti vaikuttavaa ainetta vapauttavien valmisteiden yhteydessä. Kaupallisesti menestyksellisten, hitaasti vapauttavien, farmaseuttisten annostusmuotojen ehdoton edellytys on, että ne ovat säilyttäneet vapautusominaisuutensa läpi eri tuotantoerien ja suhteellisen pitkien varastointiaikojenkin jälkeen. Farmaseuttisen annostusmuodon fysikaalisen stabiilisuuden on tarkoitus kuvata sekä käsittelyominaisuuksien, kuten esimerkiksi kovuuden, soluvuuden tai viskositeetin, muuttumattomuutta että farmakologisen tehon muuttumattomuutta.

Keksinnön kohteena on parannettu menetelmä näiden stabiilien, parenteraaliseen antoon soveltuvien koostumusten valmistamiseksi. Yksi tämän keksinnön päämäärä on vielä tarjota mikrohelmikoostumus, joka voidaan pakata käyttövalmiina formulana, jolla on hyvä säilyvyys. Nämä ja muut tavoitteet selviävät keksinnön kuvauksesta.

Keksinnön kohteena on parannettu menetelmä mikrohelmikoostumuksen valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää rasvan tai vahan tai niiden seoksen ja biologisesti

aktiivisen proteiinin, peptidin tai polypeptidin sekoittamisen keskenään, jolloin muodostuu seos, ja mainitun seoksen rakeistamisen mainitun mikrohelmikoostumuksen muodostamiseksi.

5           Menetelmälle on tunnusomaista, että menetelmän parantamiseksi seokseen lisätään ennen sen rakeistamista noin 1 - 30 % öljyä, puolipehmeätä rasvaa, jonka sulamispiste on sama kuin huoneen lämpötila tai lähellä sitä, rasvahappojohdannaista tai niiden seosta.

10           Koostumukset sisältävät edullisesti noin 30 - 95 paino-% rasvaa tai vahaa tai niiden seosta ja noin 2 - 70 paino-% biologisesti aktiivista proteiinia, peptidiä tai polypeptidiä.

          On yllättäen havaittu, että pienen määrän öljyä, puolipehmeätä rasvaa ja/tai rasvahappojohdannaista lisääminen rasvojen ja/tai vahojen ja biologisesti aktiivisen proteiinin, peptidin tai polypeptidin seokseen ennen rakeistusta kiihdyttää muuttumista alfa-kiderakenteesta beeta-muotoon. Koska beeta-muoto on paljon stabiilimpi, keksinnön mukaisten koostumusten stabiilisuus on suurempi. Tämä keksintö on erityisen yllättävä otettaessa huomioon, että eräitä öljyjä on käytetty väliaineina aikaisemmin tunnetuissa koostumuksissa rakeistuksen jälkeen, mutta ne eivät johtaneet nopeampaan kiteiden muuttumiseen.

20           Koostumukset ovat sopivia annettaviksi parenteraalisesti eläimille. Biologisesti aktiivisiin proteiineihin, peptideihin tai polypeptideihin kuuluvat kasvuhormonit, somatomeidiinit, kasvutekijät sekä muut biologisesti aktiiviset fragmentit ja niiden johdannaiset.

30           Keksinnön mukaiselle menetelmälle saadaan mikrohelmikoostumus, joka voidaan pakata käyttövalmiina formulana, jolla on lisääntyneen stabiilisuutensa ansiosta hyvä säilyvyys.

35           Tämän keksinnön mukaisesti valmistetuissa koostumuksissa käytettäviksi soveltuvien vahojen ja rasvojen

sulamispiste on yleensä korkeampi kuin 40 °C. Keksinnön mukainen vaha voidaan määritellä, niin kuin teoksessa Hawley, The Condensed Chemical Dictionary, 11. painos, on esitetty, matalalla sulavaksi seokseksi tai yhdisteeksi, jolla on suuri moolimassa ja joka on huoneen lämpötilassa kiinteä ja on yleensä koostumukseltaan rasvojen ja öljyjen kaltainen, paitsi että se ei sisällä glyseridejä. Toiset ovat hiilivetyjä ja toiset rasvahappojen ja alkoholien estereitä. Näihin yhdisteisiin kuuluvat tyydyttyt ja tyydyttämättömät, pitkäketjuiset C<sub>10-24</sub>-rasvahapot, alko-

10 lit, esterit, suolat, eetterit ja niiden seokset. Ne luokitellaan lipideihin kuuluviksi. Vahat ovat termoplastisia, mutta koska ne eivät ole korkeita polymeereja, niitä ei katsota muovien ryhmään kuuluviksi. Niiden yleisiä ominaisuuksia ovat vedenhylkimiskyky, tasainen

15 tekstuuri, myrkyttömyys sekä epämiellyttävän hajun ja värin puuttuminen. Ne ovat palavia ja niillä on hyvät dielektriset ominaisuudet. Ne liukenevat useimpiin orgaanisiin liuottimiin ja ovat veteen liukenemattomia. Päätyypit ovat seuraavat:

20

#### I. Luonnolliset

1. Eläinperäiset (mehiläisvaha, lanoliini, sellakkavaha, kiinalainen hyönteisvaha)

25 2. Kasvipäiset (karnaubavaha, kandelillavaha, myrttivilaha, sokeriruokovaha)

#### 3. Mineraaliset

(a) fossiiliset eli maavahat (otsokeriitti, seresiini, montaanivaha)

30 (b) maaöljyvahat (parafiini, mikrokiteinen parafiini, puhdistettu tai öljytön parafiini)

#### II. Synteettiset

1. Etyleeniset polymeerit ja polyolieetteriesterit ("Carbowax", sorbitoli)

2. Klooratut naftaleenit ("Hallowax")

35 3. Fischer-Tropsch-synteetillä saatavat hiilivetytyypit

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetty rasva voidaan määritellä, niin kuin teoksessa Hawley, The Condensed Chemical Dictionary, 11. painos, on esitetty, korkeampien rasvahappojen, kuten esimerkiksi steariini- tai palmitiinihapon, glyseryyliesteriksi. Sellaiset esteerit ja niiden seokset ovat huoneen lämpötilassa kiinteitä ja niillä on kiteinen rakenne. Esimerkkejä ovat laardi ja tali. Rasvan ja öljyn välillä ei ole mitään kemiallista eroavuutta ainoan eron ollessa se, että huoneen lämpötilassa rasvat ovat kiinteitä ja öljyt nestemäisiä. Sana "rasva" tarkoittaa tavallisesti nimenomaan triglyseridejä, kun taas "lipidi" sulkee sisäänsä kaikki.

Rasva koostuu edullisesti pitkäketjuisten  $C_{10-24}$ -rasvahappojen mono-, di- tai triglyseryyliestereistä. Mono-, di- tai triglyseridit, jotka koostuvat pääasiallisesti stearaateista, palmitaateista, lauraateista, linoleaateista, linolenaateista, oleaateista tai niiden seoksista ja joiden sulamispiste on yli  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ovat edullisimpia. Eräs mitä edullisin rasva on glyseryylitristearaatti. Sopivia ovat lisäksi myös rasvahappojen lipofiiliset suolat, kuten esimerkiksi magnesiumstearaatti ja vastaavat.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävä öljy, puolipehmeä rasva tai rasvahappojohdannainen on aine, joka liukenee sulatettuun kovaan rasvaan ja kiihdyttää kovan kiteisen rasvan fysikaalista muuttumista epästabiilimmista muodoista stabiilimpiin muotoihin huoneen lämpötilassa tai lähellä sitä, sen jälkeen kun sulatettu kova rasva tai vaha on rakeistettu. Öljy tai puolipehmeä rasva voi sisältää edullisesti sellaisten mono-, di- tai triglyseridien seoksia tai suhteellisen puhtaita muotoja, joissa rasvahapporyhmät ovat lyhyt- tai keskipitkäketjuisia, ts. sisältävät 2 - 18 hiiliatomia. Puolipehmeillä rasvoilla tarkoitetaan glyseryyliestereitä, joiden sulamispiste on sama kuin huoneen lämpötila tai lähellä. Rasvahappojohdannaisiin kuuluvat lyhyt- ja keskipitkäketjuiset rasvahapot,

alkoholit, esterit, eetterit, suolat ja niiden seokset. Erityisen sopivia ovat glyseridiöljyt ja puolipehmeät rasvat, koska ne ovat kehon fysiologisia rakenneosia ja ovat biologisesti sopivia sekä biologisesti hajoavia.

5           Keksinnön mukaisesti valmistetut mikrohelmet voidaan dispergoida edelleen farmaseuttisesti ja farmakologisesti hyväksyttävään nesteeseen parenteraalisesti annettavaksi soveltuvan, vaikuttavaa ainetta hitaasti vapauttavan koostumuksen aikaansaamiseksi. Väliaine voi olla  
10   vesipohjainen puskuroitu systeemi ja öljysysteemi. Öljysysteemi voi olla eläin- tai kasvipöeräinen tai synteettinen. Edullisia väliaineita ovat neutraalit mono-, di- ja triglyseridినesteet sekä niiden seokset. Neutraali öljy on sellainen öljy, jossa ei ole jäljellä happoa.  
15   Sopiviin väliaineisiin kuuluvat vesipohjaiset systeemit, kuten esimerkiksi puskuroidut fysiologiset suolaliuokset, orgaaniset liuottimet, kuten esimerkiksi glykolit ja alkoholit, sekä veden kanssa sekoittumattomat nesteet, kuten esimerkiksi öljyt, annettavan vaikuttavan aineosan  
20   liukoisuudesta riippuen.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistetuissa koostumuksissa käyttökelpoisiin biologisesti aktiivisiin proteiineihin, peptideihin ja polypeptideihin kuuluvat kasvuhormonit, somatomeidiinit, kasvutekijät sekä muut  
25   biologisesti aktiiviset fragmentit ja niiden johdannaiset. Edullisia proteiineja ovat naudan, lampaan, hevosen, sian, linnun ja ihmisen kasvuhormonit, ja niihin on tarkoitus sisältyä luonnollista, synteettistä, yhdistelmä-DNA-tekniistä ja biosynteettistä alkuperää olevat hormonit.  
30   Keksinnön mukaiseen koostumukseen sisällytettäväksi soveltuvat lisäksi biologisesti aktiivisiin proteiineihin, peptideihin ja polypeptideihin liittyneet metallit tai metallisuolat samoin kuin happosuolat, johdannaiset ja kompleksit sekä hydratoitumista estävät aineet.

Haluttaessa keksinnön mukaisesti valmistettuihin koostumuksiin voidaan sisällyttää stabilaattoreita, säilöntäaineita, pinta-aktiivisia aineita, suoloja, pusku-reita tai niiden seoksia. Edullisia stabilaattoreita ovat  
5 dehydroetikkahappo, salisyylilanilidi, sorbiinihappo, boori-  
rihappo, bentsoehappo ja niiden suolat, natriumnitriitti  
ja natriumnitraatti. Sopivia mainittujen aineiden määriä,  
jos niitä halutaan käyttää, tämän keksinnön yhteydessä  
käytettäväksi ovat määrät noin 0,1 paino-%:sta  
10 20 paino-%:iin.

Pinta-aktiiviset aineet, jotka ovat edullisia tämän keksinnön mukaisesti valmistetuissa biologisesti aktii-  
visia makromolekyylejä sisältävissä koostumuksissa käy-  
tettäväksi, ovat luonteeltaan ionittomia, kuten esimerkik-  
15 si polyoksietyleenisorbitaanimonoleaatti (etoksylointi-  
aste 20) sekä etyleenioksidin ja propyleenioksidin muodos-  
tamattamat segmenttikopolymeerit. Sopivia pinta-aktiivisten  
aineiden määriä tämän keksinnön yhteydessä käytettäväksi  
ovat määrät noin 0,1 paino-%:sta 10,0 paino-%:iin.

20 On todettu, että antamalla eläimille keksinnön  
mukaisesti valmistettuja koostumuksia ruiskeina sopivassa  
väliaineessa voidaan saavuttaa korkeampi kasvuhormonien  
taso veressä ja säilyttää se pitempään samoin kuin saavut-  
taa suurempi painon lisääntyminen ja suurempi maidontuo-  
25 tanto maitoa erittäväillä eläimillä. Yleensä biologisesti  
aktiivisten proteiinien, peptidien ja polypeptidien korke-  
ampiin tasoihin veressä liittyy hyödyllisiä ja/tai tera-  
peuttisia vaikutuksia ja sellaisia tasoja havaitaan niiden  
yhteydessä. Kyseisiä vaikutuksia ovat painon lisääntymi-  
30 nen, suurempi kasvunopeus, kohonnut maidontuotanto maitoa  
erittäväillä eläimillä ja siihen liittyvä maidon parempi  
saatavuus käsiteltyjen eläinten jälkeläisten imetykseen,  
lihaskoon paraneminen, parantunut ravintohyötysuhde, ras-  
van väheneminen ruumiissa sekä rasvattoman lihan ja rasvan  
35 suhteen paraneminen. Kohonneiden tasojen säilyminen veres-

sä on osoitus vaikuttavan aineosan hitaasta vapautumisesta. Kun vaikuttavan aineosan korkeampi taso veressä saadaan säilymään, havaitaan yleensä sellaisia ominaisuuksia kuin lisääntynyt maidontuotanto, kohonnut kasvunopeus, parantunut ravintohyötysuhde ja kohonnut rasvattoman lihan osuus. Keksinnön mukaisesti valmistettuja koostumuksia voidaan käyttää maidontuotannon parantamiseen, eläinten kasvunopeuden kohottamiseen, ravintohyötysuhteen parantamiseen, rasvattoman lihan osuuden kohottamiseen eläimissä, hormonitasojen kohottamiseen eläinten verenkierrossa ja korkeampien tasojen ylläpitämiseen.

Eräs edullinen tämän keksinnön mukainen toteutusmuoto käsittää biologisesti aktiivisen proteiinin, peptidin tai polypeptidin yhdistämisen rasva- tai vahamikrohelmiin ja öljyyn tai puolipehmeään rasvaan, jotka voivat sisältää myös osan edellä kuvatuista täyteaineista ja koko täyteainemäärän, jotka sitten dispergoidaan väliaineeseen. Mikrohelmet, edullisesti rasvamikrohelmet, voivat olla läpimitaltaan korkeintaan 1 000  $\mu\text{m}$  massakeskimääräisen koon 25 - 300  $\mu\text{m}$  ollessa edullinen parenteraalista antamista ajatellen. Mikrohelmistä, jotka sisältävät korkeintaan noin 70 % biologisesti aktiivista proteiinia, peptidiä tai polypeptidiä, vapautuminen tapahtuu hitaasti vaihtelevan pituisen ajanjakson ajan vaikuttavan aineosan liukoisuudesta sekä käytettävän vahan tai rasvan, pinta-aktiivisen aineen, puskurin ja väliaineen luonteesta riippuen.

Keksinnön mukaisella menetelmällä saadaan vaikuttava ainetta hitaasti vapauttava koostumus, joka sisältää rasvasta tai vahasta tai niiden seoksesta, biologisesti aktiivisesta proteiini-, peptidi- tai polypeptidilääkeaineesta ja öljystä, puolipehmeästä rasvasta, rasvahapojohdannaisesta tai niiden seoksesta koostuvan seoksen dispergoituna farmaseuttisesti ja farmakologisesti hyväksyttävään väliaineeseen. Hitaasti vapauttavassa koostumuksessa voi esiintyä mikrohelmiä ja päällystettyjä

proteiinihiukkasia. Koostumus voi olla rasvaan tai öljyyn liuotettu proteiini, tai kysymyksessä saattaa olla hydrofobinen vuorovaikutus tai vaikuttavan aineen sitoutuminen rasvaan tai vahaan. Mitä tulee hormonin antamiseen, koostumukset, jotka sisältävät noin 1 - 70 paino-% kasvuhormonia, somatomeidiinia, kasvutekijää tai niiden biologisesti aktiivista fragmenttia tai johdannais- ta, jonka massakeskimääräinen hiukkaskoko on edullisesti alle 20  $\mu\text{m}$ ; noin 5 - 60 paino-% ja edullisesti noin 10 - 48 paino-% rasvaa, vahaa tai niiden seosta; noin 1 - 30 paino-% ja edullisesti 5 - 20 paino-% öljyä ja mahdollisesti korkeintaan noin 15 paino-% täyteaineita, kuten esimerkiksi pinta-aktiivisia aineita, stabilaattoreita, säilöntäaineita, suoloja tai puskureita tai niiden seoksia yhdistettynä riittävään määrään jotakin farmaseuttisesti ja farmakologisesti hyväksyttävää nestemäistä väliainetta, jotta kokonaismääräksi tulee 100 %. Väliaine on edellä esitetyn kaltainen vesipohjainen puskuroitu systeemi tai öljysysteemi.

20 Kasvuhormonien, kuten esimerkiksi naudan kasvuhormonin, parenteraalisessa antamisessa on osoittautunut, että mikrohelmet, jotka sisältävät noin 5 - 40 paino-% kiinteätä hormonia, jonka massakeskimääräinen hiukkaskoko on edullisesti alle 20  $\mu\text{m}$ , ja korkeintaan noin 20 paino-% edellä kuvattuja muita täyteaineita rasvassa tai vahassa tai niiden seoksessa, jonka määrä on noin 40 - 95 paino-%, ja joiden massakeskimääräinen hiukkaskoko on 25 - 300  $\mu\text{m}$ , vapauttavat hormonia hitaasti ja kohottavat maidontuotantoa lypsylehmillä yhtämittaisesti noin kahden viikon ajaksi, ja sellaiset mikrohelmet ovat edullisia. Nämä edulliset koostumukset ovat osoittaneet selvästi maidontuotannon kohoamisen olevan verrattavissa siihen, joka saavutetaan antamalla päivittäin ruiskeina naudan kasvuhormonia.

35 Vesiliukoisia proteiineja, peptidejä tai polypeptidejä, kuten esimerkiksi naudan kasvuhormonia sisältäviä

koostumuksia annettaessa veden kanssa sekoittumattomat nesteet ovat edullisia, öljyjen tai nestemäisten rasvojen sekä veteen sekoittumattomien alkoholien ja glykolin ja niiden seosten ollessa vielä edullisempia. Väliaineet va-  
 5 litaan niin, että ne sekä dispergoivat ja päällystävät mikrohelmiä että antavat injektoitavalle seokselle sopivan viskositeetin, käyttäen niiden valinnassa kriteereinä HLB-arvoja (hydrofiilisyyden-lipofiilisyyden tasapainoarvoja) ja viskositeettia.

10 Tällä perusteella voidaan väliaineina tämän keksinnön mukaisesti valmistetuissa koostumuksissa käyttää rasvahappoglyseridejä ja niiden seoksia, jotka ovat nestemäisiä ympäristön lämpötilassa, mukaan luettuina synteettiset öljyt, kasviöljyt, kuten esimerkiksi oliivi-,  
 15 seesami-, maapähkinä-, auringonkukka-, soija-, puuvillansiemen-, maissi-, saflori-, palmu-, rapsi- ja kookosöljy, eläinperäiset öljyt, kuten esimerkiksi kala-, kalanmaksa- ja valaanpääöljyt, sekä niistä saatavat jakeet ja niiden seokset, joiden HLB-arvo on 1 - 5 ja viskositeetti Brookfield-viskosimetrillä RTV akselia nro 1 käyttäen mitattuna  
 20 10 - 1 000 cP.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä mikrohelmet voidaan valmistaa sisällyttämällä vaikuttava aineosa, jolla on haluttu hiukkaskoko, ja muut täyteaineet sulaan rasvaan, vahaan tai niiden seokseen, sekoittamalla mukaan  
 25 öljy, puolipehmeä rasva ja/tai rasvahappojohdannainen ja muodostamalla tulokseksi saadusta seoksesta sen jälkeen mikrohelmiä erilaisilla tekniikoilla, kuten esimerkiksi emulgoimalla tai hajottamalla sumuksi (tai rakeistamalla) seos tai käsittelemällä aineosista ja sulasta rasvasta, vahasta tai niiden seoksesta muodostettu seos mekaanisesti ja jäädyttämällä se esimerkiksi sentrifugilautasta käyttäen. Vaihtoehtoisesti seos, joka sisältää vaikuttavia aineosia, täyteaineita, rasvaa, vahaa tai niiden seosta ja  
 30 öljyä, voidaan jäädyttää kiinteäksi materiaaliksi, joka

voidaan sitten käsitellä esimerkiksi jauhamalla, hienontamalla tai vastaavasti.

5 Injektoitaviksi soveltuvia seoksia on helppo valmistaa dispergoimalla proteiini, peptidi tai polypeptidi, täyteaineet, rasva, vaha tai niiden seos sekä öljy korotetussa lämpötilassa suoraan väliaineeseen ja jäädyttämällä dispersio.

10 Useimmista rasvoista ja rasvojen ja/tai vahojen seoksista saadaan, kun valmistetaan mikrohelmiä suihkuhajotuksella kuumasta sulatteesta, hiukkasia, joiden kide-  
muoto on DSC-analyysin pääsiallisesti epästabiili alfa-  
muoto. Suihkutushajotetut kovat rasvat, kuten esimerkiksi  
15 tristeariini ja tripalmitiini, säilyttävät alfa-kidemuotonsa useita kuukausia, kun niitä säilytetään tyypillisessä huoneen lämpötilassa. Yllättävää kyllä, sulasekoitettuna ja rakeiden tai mikrohelmien muodostamiseksi suihkutushajotettuina kovien rasvojen ja nestemäisten rasvojen seoksilla on muuttuminen alfa-kidemuodosta beeta-muotoon nopeutunut ja niillä on huomattavasti parantunut  
20 fysikaalinen stabiilisuus, ja ne saavat siten aikaan poikkeukselliset ominaisuudet farmaseuttisille parenteraalisille koostumuksille. Seoksesta riippuen muuttuminen on suurin piirtein täydellistä ajassa, joka vaihtelee muutamasta tunnista useaan vuotokauteen. Sopivia koostumuksia, jotka sisältävät kovia ja nestemäisiä rasvoja, ovat seuraavat: 70 - 99 osaa kovia rasvoja, jotka ovat  
25 sellaista rasvahappojen mono-, di- tai triglyseryyliestereitä, jotka sisältävät pääsiallisesti tyydytettyjä  $C_{10-22}$ -hiilivetyketjuja, edullisesti  $C_{14-18}$ -hiilivetyketjuja, ja 1 - 30 osaa öljyä tai öljyjä, jotka ovat  
30 sellaista rasvahappojen mono-, di- tai triglyseryyliestereitä, joissa hiilivetyketjun pituus on 2 - 10 hiiliatomia.

35 Suspendoitaessa mikrohelmet, jotka on valmistettu kovista ja nestemäisistä rasvoista vaikuttavien aineiden

ollessa mukana tai ilman niitä, väliaineeseen viskositeetin kohoaminen on mikrohelmien kiderakenteen nopeamman spontaanin muuttumisen seurauksena paljon hitaampaa, kun suspensiota säilytetään tyypillisessä huoneen lämpötilassa tai tyypillisissä jääkaappilämpötiloissa. Erityisen sopivia farmaseuttisiksi täyteaineiksi ovat C<sub>2-12</sub>-rasvahappojen muodostamat nestemäiset glyseridiesterit, koska ne ovat biologisesti poikkeuksellisen sopivia ja biologisesti hajoavia. Mikrohelmillä, jotka on valmistettu tällä tavalla epästabiilin alfa-kidemuodon nopean muuttumisen termodynaamisesti stabiilimpaan beeta-kidemuotoon aikaansaamiseksi, on myös seuraavat ominaisuudet: jauheiden soluvuus on hyvä, tahmeus vähäinen, taipumus agglomeroitua varastoinnin aikana pieni, tiheys aikaisempaa suurempi ja fysikaalisen käsittelyn kesto suurempi. Lisäksi näitä parannettuja mikrohelmiformuloita voidaan käyttää proteiinien, peptidien ja polypeptidien hidastettuun antamiseen parenteraalisesti ja niiden korotetun tason säilyttämiseen veressä paremman painon nousun ja/tai suuremman maidontuotannon saavuttamiseksi samalla tavalla kuin US-patenttijulkaisussa 4 837 381 on esitetty. Ja lopuksi, näiden mikrohelmien fysikaalisen käsittelyn ja stabiilisuuden huomattava parantuminen tekee mahdolliseksi valmistaa ja pakata käyttövalmis, kaupallisesti tyydyttävä formula, jolla on erinomaiset säilyvyysominaisuudet. Keksintöä valaistaan tarkemmin seuraavien esimerkkien avulla, jotka eivät ole rajoittavia.

#### **Esimerkit 1 - 7**

#### **Mikrohelmien fysikaalinen stabiilisuus neutraalissa öljyväliaineessa**

Nämä esimerkit valaisevat joukkoa mikrohelmikoostumuksia, jotka on saatu stabiloiduiksi huomattavassa määrin sisällyttämällä ne koostumukseen, joka sisältää 2 - 15 % öljyjä, puolikiinteätä rasvaa tai niiden seosta. Fysikaalinen stabiloituminen mitataan suspendoimalla mikrohelmet

neutraaliin triglyseridiöljyväliaineeseen ja asettamalla suspensio alttiiksi testausolosuhteille, joiden on tarkoitus jäljitellä suspension varastointia lämpimissä ympäröivissä olosuhteissa, joissa lämpötila on joko 30 °C (86 °F) tai 38 °C (100 °F). Tämän esimerkin mukaisessa testissä 3 g mikrohelmiä suspendoidaan 7,5 ml:aan neutraalia triglyseridiöljyä ja suspensiota pyöritetään hitaasti (2 - 6 kierrosta/min) vakiolämpötilassa, kunnes suspensio ei enää juokse säiliössä. Hyytymisaika on suunnilleen sama kuin aika, joka kuluu siihen, että suspensio ei ole enää juoksevaa. Tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa 1. Hyytymisajalle on annettu vaihtelurajat, kun tarkkaa aikaa ei havaittu. Aika on annettu tunteina, ellei toisin ole mainittu. Stabilointiaste ei ollut sama kunkin erän, lähteen ja kovan rasvan tyyppin tapauksessa; päinvastoin hyytymisaika riippui kovan rasvan valinnasta ja mikrohelmi-koostumukseen lisätyn öljyn tai puolipehmeän rasvan määrästä ja tyyppistä. Kuten tuloksista ilmenee, öljyn tai puolipehmeän rasvan lisäys pidensi kuitenkin huomattavasti hyytymisaikaa kunkin erän, lähteen ja kovan rasvan tyyppin tapauksessa. Mikrohelmien ikä on myös esitetty alla olevassa taulukossa hakasuluissa, sillä se on tärkeä hyytymisaikaan vaikuttava tekijä, koska kiteiden muuttuminen epästabiilimmista alfa-muodoista stabiilimpiin beeta-muotoihin on ajasta riippuvaista.

Taulukko 1

Rasva GTS <sup>1</sup>	Öljy tai puoli- pehmeä rasva	Hyytynisaika (h) Mikrohelmien ikä (d)	
		30 °C:ssa	38 °C:ssa
1.a.	ei lainkaan	1,5[1]	
b.	ei lainkaan	6-24[14]	10 min[29]
c.	10% Miglyol <sup>2</sup> 812 <sup>®</sup>	>168[1]	6[15]
d.	5% GDS		6-24[21]
2.a.	ei lainkaan		7 min[1]
b.	10% Miglyol 812 <sup>®</sup>		1[1]
c.	10% Miglyol 812 <sup>®</sup>		2[80]
3.a.	ei lainkaan	<1[1]	
b.	ei lainkaan	1,3[6]	7 min[39]
c.	2% Miglyol 812 <sup>®</sup>	2[8]	
d.	5% Miglyol 812 <sup>®</sup>	1,3[8]	12 min[22]
e.	10% Miglyol 812 <sup>®</sup>	6-24[8]	1[29]
f.	15% Miglyol 812 <sup>®</sup>	24[1]	
g.	2% GDS	<2[1]	
h.	5% GDS	3[21]	7 min[39]
i.	10% GDS	1,3[1]	
j.	5% triasetiini	8-24[1]	1,25[8]
k.	2% GDS ja 10% Miglyol 812 <sup>®</sup>	8-24[1]	
4.a.	ei lainkaan	1,6[1]	
b.	10% Miglyol 812 <sup>®</sup>	24[1]	
5.a.	ei lainkaan	6-24[21]	
b.	10% Miglyol 812 <sup>®</sup>	>168[1]	
6.a.	ei lainkaan	5 min[1]	
b.	10% Miglyol 812 <sup>®</sup>	6-24[1]	
GDS <sup>3</sup>			
7.a.	ei lainkaan		1,1[120]
b.	10% Miglyol 812 <sup>®</sup>		2[0]

<sup>1</sup> Esimerkeissä 1 - 5 käytettiin eri GTS-eriä, jota GTS:ää myy Huls of America kauppanimellä Dynasan 118. Esimerkissä 6 käytettiin ainetta, jota myy Pfaltz & Bauer.

<sup>2</sup> Miglyol 812<sup>R</sup> on neutraali triglyseridiöljy, jota myy Huls of America.

<sup>3</sup> Aineen hankintalähde: Gattefosse, kauppanimi Gelucire 64/02.

### Esimerkki 8

Valmistetaan stabiloimaton, glyseryyli-  
tristearaattia (GTS) sisältävä mikrohelmiformula ja stabiloitu GTS-  
mikrohelmiformula, joilla on seuraavat koostumukset:

Stabiloimattomat mikrohelmet:

28 % naudan somatotropiinia

2 % natriumbentsoaattia

0,14 % Pluronic F68<sup>R</sup>:aa (etyleenioksidin ja propyleenioksidin segmenttikopolymeeri, jota myy BASF Corporation)

70 % glyseryyli-  
tristearaattia

Stabiloidut mikrohelmet:

28 % naudan somatotropiinia

2 % natriumbentsoaattia

0,14 % Pluronic F68<sup>R</sup>:aa

63 % glyseryyli-  
tristearaattia

7 % Miglyol 812<sup>R</sup>:ta

Molemmat mikrohelmiformulat suspendoidaan samaan määrään neutraalia öljyväliainetta, ja niitä säilytetään 25 °C:ssa tai 4 °C:ssa. Näistä varastoitavista formuloista otetaan ajoittain näytteitä, joiden annetaan lämmentä huoneen lämpötilaan (22 - 25 °C) ennen viskositeetin mittausta (Brookfield-viskosimetri T, akseli C, 100 kierrosta/minuutti). Alla olevassa taulukossa 2 esitetyt tulokset osoittavat, että tyypillisissä varastointiolosuhteissa stabiloidun formulon viskositeetin kohoaminen ajan funktiona on huomattavasti hitaampaa.

Taulukko 2

Stabiloimattoman ja stabiloidun GTS-mikrohelmiformulan viskositeetin vertailu

aika	Viskositeetti (cP) 25 °C:ssa mitattuna			
	varastointi 25 °C:ssa stabiloimaton	stabiloitu	varastointi 4 °C:ssa stabiloimaton	stabiloitu
0	66	66	66	66
1 d	452	--	168	--
5 d	2300	--	159	--
1 vk	7300	119	159	70
2 vk	--	195	159	71
4 vk	--	442	--	79
8 vk	--	1971	164	82
13 vk	--	2629	270	74
26 vk	--	2629	624	70
39 vk	--	5280	741	71

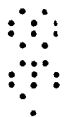
15

**Esimerkki 9****Maidontuotannon vertailu ja analysointi**

Valmistetaan mikrohelmiä, joilla on sama koostumus kuin stabiloimattomilla ja stabiloiduilla mikrohelmillä esimerkiksi 8, ja ne testataan lypsylehmillä tarkoituksena arvoida niiden vaikutus maidontuotantoon. Injektointia varten mikrohelmet suspendoidaan Miglyol 812<sup>R</sup>:een, neutraaliin triglyseridiöljyyn. Tässä esimerkissä käsitelyt vaihdetaan ristiin kahden 2-viikkoisen käsittelyjakson jälkeen. Toisin sanoen ryhmään B kuuluvat lehmät saavat ensimmäisten 4 viikon ajan stabiloimatonta formulaa ja ruiskeet annetaan viikkojen 1 ja 3 alussa. Viikkojen 5, 7 ja 9 alussa näille lehmille annetaan ruiskeina stabiloitua formulaa. Ryhmään C kuuluvat lehmät saavat stabiloitua formulaa viikkojen 1 ja 3 alussa ja sen jälkeen stabiloimatonta formulaa viikkojen 5, 7 ja 9 alussa. Tämän kokeen tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa 3. Näiden kahden formulon tilastollinen vertailu tapahtuu määrittämällä kunkin lehmän keskimääräisen maidontuotannon, kun lehmille annetaan sta-

35

bilomatonta formulaa, ja keskimääräisen maidontuotannon, kun lehmille annetaan stabiloitua formulaa, välillä ilmenevä keskimääräinen vasteiden ero. Maidontuotantoa viikkojen 5 ja 6 aikana ei oteta mukaan tilastolliseen analyysiin, koska tämän jakson aikana saattaisi esiintyä molempien formuloiden välistä vuorovaikutusta. Keskimääräinen ero on  $-0,9 \pm 4,7 \%$ , joka ei ole tilastollisesti merkittävä,  $p > 0,05$ . Johtopäätöksenä on, että molempien formuloiden aikaansaama maidontuotanto on hyvin lähellä toisiaan.



2005 4:10

Taulukko 3

Maidontuotannon vertailu ja analysointi: Stabiloimaton vs. stabiloitu, hitaasti vaikuttavaa ainetta vapauttava mikrohelmiformula

Maidontuotannon lisääntyminen

2 viikon jaksot Ryhmä B	Cow	Maidontuotannon lisääntyminen					Ero*
		1	2	3	4	5	
		Formula 1		Formula 2			
1	1	18,5	24,2	24,6	15,5	15,4	5,9
2	2	12,4	15,3	7,3	9,7	6,3	5,9
3	3	5,6	14,3	13,8	9,9	9,8	0,2
4	4	6,4	2,7	12,9	7,3	12,2	-5,2
5	5	0,9	4,5	12,8	7,9	8,1	-5,3
6	6	-4,5	8,3	8,1	8,0	13,9	-9,0
7	7	8,5	31,9	33,4	21,7	24,4	-2,9
8	8	4,7	10,9	4,5	7,9	9,9	-1,1
9	9	7,4	16,7	16,4	14,3	14,3	-2,3
10	10	18,5	19,2	23,5	21,3	22,3	-3,0



\* Ero on ero kullakin lehmällä ja ero keskimääräisten maidontuotantojen välillä formulaa 1 (stabiloimaton) annettaessa 2 viikon jaksojen 1 ja 2 aikana ryhmän B tapauksessa tai 2 viikon jaksojen 4 ja 5 aikana ryhmän C tapauksessa ja toisaalta formulaa 2 (stabiloitu) annettaessa 2 viikon jaksojen 4 ja 5 aikana ryhmän B tapauksessa ja 2 viikon jaksojen 1 ja 2 aikana ryhmän C tapauksessa. Kolmannen 2 viikon jakson alussa tapahtuvan käsittelyjen ristikkäisvaihdon ansiosta koe säilyttää tasapainonsa annostusjärjestyksen suhteen. Tuloksia kolmannelta 2 viikon jaksolta ei käsitellä tilastollisesti sen mahdollisuuden pienentämiseksi, että jonkin käsittelyn vaikutus siirtyisi seuraavalle viikolle. Keskimääräinen ero kuvastaa kyseisten kahden formulan aikaansaamien vasteiden välistä eroa.



## Patenttivaatimukset

1. Parannettu menetelmä mikrohelmikoostumuksen valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää rasvan tai vahan tai  
5 niiden seoksen ja biologisesti aktiivisen proteiinin, peptidin tai polypeptidin sekoittamisen keskenään, jolloin muodostuu seos, ja mainitun seoksen rakeistamisen mainitun mikrohelmikoostumuksen muodostamiseksi, t u n n e t t u  
10 siitä, että menetelmän parantamiseksi seokseen lisätään ennen sen rakeistamista noin 1 - 30 % öljyä, puolipehmeätä rasvaa, jonka sulamispiste on sama kuin huoneen lämpötila tai lähellä sitä, rasvahappojohdannaista tai niiden seosta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että seos sisältää noin 30 - 95 %  
15 rasvaa tai vahaa tai niiden seosta ja noin 2 - 70 % biologisesti aktiivista proteiinia, peptidiä tai polypeptidiä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen proteiini on naudan, sian tai linnun kasvuhormoni.

20 4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että seos sisältää noin 5 - 20 % neutraalia triglyseridiöljyä.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikrohelmikoostumus suspensio-  
25 doidaan edelleen farmaseuttisesti ja farmakologisesti hyväksyttävään nestemäiseen väliaineeseen.

## Patentkrav

1. Förbättrat förfarande för framställning av en mikrosfärkomposition, vilket förfarande omfattar blandande av ett fett eller ett vax eller en blandning därav och ett biologiskt aktivt protein, en peptid eller en polypeptid med varandra, varvid bildas en blandning, och granulering av nämnda blandning för bildande av nämnda mikrosfärkomposition, k ä n n e t e c k n a t därav, att för förbättrande av förfarandet sätts till blandningen före granuleringen ca 1 - 30 % av en olja, ett halvhårt fett, vars smältpunkt är samma som rumstemperatur eller nära rumstemperatur, ett fettsyra derivat eller en blandning av dessa.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att blandningen innehåller ca 30 - 95 % fett eller vax eller en blandning därav och ca 2 - 70 % av ett biologiskt aktivt protein, en peptid eller en polypeptid.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att det biologiskt aktiva proteinet är ett nöt-, svin- eller fågeltillväxthormon.

4. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att blandningen innehåller ca 5 - 20 % av en neutral triglyceridolja.

5. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k a t därav, att mikrosfärkompositionen vidare suspenderas i ett farmaceutiskt och farmakologiskt godtagbart vätskeartat medium.