(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 963867 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 963867

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification (IPC^6)
A61K 47/14

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **29.03.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **27.09.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **27.11.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **29.03.1995 PCT/DK1995/000143**

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

30.03.1994 DK 0370/94

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **GS Development AB,** Jägerhillsgatan 15 213 75 Malmö, Sverige, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Hansen, Jens,** Alleroed, TANSKA, (DK)
2 • **Sylvest Nielsen, Lise,** Danmark, TANSKA, (DK)
3 • **Norling, Tomas,** Lyngby, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Rasvahappoestereiden käyttö bioadhesiivisina aineina
Användning av fettsyraestrar som bioadhesiva substanser

Rasvahappoesterien käyttö bioadhesiivisina aineina - Användning av fettsyraestrar som bioadhesiva ämnen

Keksintö liittyy rasvahappoesterien käyttöön bioadhesiivisina aineina. Rasvahappoesterien suhteelliset moolimassat ovat alle noin 1000 daltonia. Lisäksi tämä keksintö liittyy menetelmiin, jotka on tarkoitettu aktiivisen tai suojaavan aineen annostelemiseksi eläimen, kuten ihmisen, vaurioitumattomaan tai vaurioituneeseen ihoon tai limakalvoon annostelun perustuessa aktiivisen tai suojaavan aineen yhdistämiseen bioadhesiiviseen rasvahappoesteriin. Limakalvo voi olla suun, korvien, nenän, keuhkojen, gastrointestinaalialueen, emättimen tai peräsuolen limakalvo. Aineita voidaan myös annostella ruumiinonteloihin, kuten suuonteloon, esimerkiksi annostelemalla näitä poskionteloon.

Keksinnön tausta

Viimeksi kuluneen vuosikymmenen aikana on yhä lisääntyvässä määrin kiinnitetty huomiota mahdollisuuteen käyttää bioadhesiivisia/mukoadhesiivisia polymeerejä lääkeaineiden annostelutarkoituksiin. Useita niitä ongelmia, jotka liittyvät tavanomaisiin lääkeainetta pitkään vapauttaviin annostelujärjestelmiin, arvellaan voitavan vähentää tai poistaa bioadhesiivista/mukoadhesiivista lääkeaineannostelujärjestelmää käyttämällä.

Tavanomaisissa lääkeainetta pitkään vapauttavissa lääkeaineannostelujärjestelmissä ei ole varauduttu siihen, että annostelujärjestelmä saataisiin annostelun jälkeen pysymään määräpaikassaan, minkä lisäksi se aika, jonka lääkeaineannostelujärjestelmä ja tietty nimenomainen vaikutuskohta ovat kosketuksessa keskenään in vivo -olosuhteissa, on usein niin lyhyt, ettei esimerkiksi kudoksen läpäisevyyden modifioimisen voida odottaa tuottavan mitään etuja.

Bioadhesiivisten lääkeaineannostelujärjestelmien arvellaan tavanomaisiin lääkeainetta pitkään vapauttaviin lääkeaineannostelujärjestelmiin verrattuna olevan hyödyllisiä seuraavien ominaisuuksien suhteen:

i) bioadhesiivinen lääkeaineannostelujärjestelmä rajaa lääkeaineen tietylle nimenomaiselle alueelle, mikä tämän vaikutuksesta parantaa ja tehostaa niiden lääkeaineiden biologista hyötyosuutta, joiden biologinen hyötyosuus itsessään voi olla huono,

ii) bioadhesiivisen lääkeaineannostelujärjestelmän käyttö johtaa suhteellisen voimakkaan vuorovaikutuksen syntymiseen bioadhesiivisen aineen ja limakalvon välille; tällainen vuorovaikutus pidentää omalta osaltaan sitä aikaa, jonka lääkeaineannostelujärjestelmä ja kyseessä oleva kudos ovat kosketuksessa keskenään ja sallii lääkeaineannostelujärjestelmän vaikutuksen kohdistamisen tiettyyn nimenomaiseen kohtaan,

iii) bioadhesiivisen lääkeaineannostelujärjestelmän ajatellaan pidentävän lääkeaineiden vapautumista miltei missä tahansa ei-parenteraalisessa annostelutiessä,

iv) bioadhesiivinen lääkeaineannostelujärjestelmä voidaan paikallishoidon antamistarkoituksessa saattaa paikantumaan tiettyyn nimenomaiseen kohtaan esimerkiksi paikallisten sienitautien hoitamiseksi, modifioimaan läpäisevyyttä, inhiboimaan proteaaseja ja muita entsyymejä ja/tai moduloimaan immunologisen järjestelmän toiminnan ilmentymismuotoja,

v) bioadhesiivisen lääkeaineannostelujärjestelmän vaikutukset voidaan saattaa kohdentumaan tiettyihin nimenomaisiin sairaisiin kudoksiin, ja

vi) bioadhesiivista lääkeaineannostelujärjestelmää voidaan käyttää niissä tapauksissa, joihin tavanomainen lääkeainetta

pitkään vapauttava lääkeaineiden annosteluratkaisutapa ei sovellu, toisin sanoen niiden tiettyjen lääkeaineiden tai lääkeaineryhmien kyseessä ollessa, jotka absorboituvat riittämättömästi.

Bioadhesiivisten aineiden (näistä käytetään myös nimitystä mukoadhesiiviset aineet) tiedetään yleisesti olevan materiaaleja, jotka kykenevät sitoutumaan biologiseen membraaniin ja pidättymään tähän membraaniin pitkäksi ajaksi. Bioadhesiiviset lääkeaineannostelujärjestelmät ovat olleet useiden patenttihakemusjulkaisujen aiheina (näitä on käsitelty esimerkiksi julkaisuissa EP-A-0 516 141, WO 93/21 906 ja EP-A-0 581 581), mutta tämän keksinnön tekijöiden tietämän mukaan ainoastaan polymeerien on katsottu olevan bioadhesiivisia aineita. Näitä polymeerejä ovat esimerkiksi akryylihappohomopolymeerit ja -kopolymeerit, hydrofiiliset vinyylipolymeerit, hydrofiiliset selluloosajohdannaiset ja luonnon polymeerit.

Bioadhesiiviset koostumukset perustuvat yleensä siihen, että ne sisältävät tietyn määrän bioadhesiivista ainetta. Kuten edellä mainittiin, ovat tunnetut bioadhesiiviset aineet polymeerisia aineita, joiden suhteellinen moolimassa on suurempi kuin noin 10 000. Polymeeristen aineiden käyttö bioadhesiivisina aineina esimerkiksi farmaseuttisissa koostumuksissa rajoittuu kuitenkin tietyntyyppisiin koostumuksiin, kuten esimerkiksi geeleihin, toisin sanoen koostumuksiin, joiden dynaaminen viskositeetti on suhteellisen suuri. Tämä rajoitus johtuu pääasiassa siitä seikasta, että koostumuksessa on käytettävä tiettyä suhteellisen korkeaa bioadhesiivisen aineen konsentraatiota, jotta koostumus itsessään olisi bioadhesiivinen. Kuten edellä mainittiin, voi bioadhesiivisen lääkeaineannostelujärjestelmän käyttö olla edullista monissa tapauksissa, joissa tavanomaisten lääkeaineannostelujärjestelmien käyttö ei täytä vaatimuksia sen suhteen, että haluttu vaikutus saavutettaisiin ennakolta määrätyn aikavälin sisällä. Tunnettujen bioadhesiivisten

koostumusten käytettävyys on kuitenkin melko rajoitettua, koska ainoastaan suhteellisesti voimakkaasti viskoottiset koostumukset ovat bioadhesiivisia, mikä sulkee ulkopuolelle sen mahdollisuuden, että saatavilla olisi esimerkiksi bioadhesiivinen sumutettava koostumus tai bioadhesiivinen liuos, jonka dynaaminen viskositeetti olisi pieni.

Piirroksen selitys

Kuvio 1 esittää kaaviota laitteesta, jota käytettiin tutkimusmenetelmäksi 1 nimitetyssä tutkimusmenetelmässä, joka on kuvattu yksityiskohdittain tämän keksinnön kokeellisessa osassa. Viitenumerot kuvaavat seuraavaa:

1. Termostoidun veden kulku
2. Pesuliuossäiliö
3. Peristalttinen pumppu
4. Ruostumattomasta teräksestä valmistettu kannatin
5. Mallimembraani
6. Vastaanottoastia pesuliuosten talteenottamiseksi

Kuvio 2A esittää kaaviota laitteesta, jota käytettiin tutkimusmenetelmäksi 2 nimitetyssä tutkimusmenetelmässä, joka on kuvattu yksityiskohdittain tämän keksinnön kokeellisessa osassa. Viitenumerot kuvaavat seuraavaa:

1. Laitteen koetin
2. Paikoillaan pysyvä levy
3. Ensimmäinen pidike
4. Mallimembraani
5. Toinen pidike
6. Liukuva kannake
7. Siirtymämuunnin
8. Säätöyksikkö
9. Henkilökohtainen tietokone.

Kuvio 2B esittää kaaviota sellaisen laitteen muunnelmasta, jota käytettiin tutkimusmenetelmäksi 2 nimitetyssä tutkimusmenetelmässä, joka on kuvattu yksityiskohdittain tämän keksinnön kokeellisessa osassa. Viitenumerot kuvaavat seuraavaa:

1. Laitteen koetin
2. Paikoillaan pysyvä levy
3. Ensimmäinen pidike
4. Mallimembraani
5. Toinen pidike
6. Termostaattisäätöinen lämmitin/sekoitin
7. Astia
8. Liukuva kannake
9. Siirtymämuunnin
10. Säätöyksikkö
11. Henkilökohtainen tietokone.

Kuvio 3 esittää termogrammia, jossa on esitetty GMO:ta ja vettä sisältävän koostumuksen (seossuhde paino-%:eina 85/15) L_α-Q-rakennemuutos (lamellirakenteesta kuutiolliseen rakenteeseen).

Kuvio 4 esittää termogrammia, jossa on esitetty GMO:ta, vettä, lidokaiiniemästä ja lidokaiinihydrokloridia sisältävän koostumuksen (seossuhteet paino-%:eina 62/33/1,7/3,3) L_α-Q-rakennemuutos (lamellirakenteesta kuutiolliseen rakenteeseen).

Kuvio 5 esittää termogrammia GMO:ta, vettä, lidokaiiniemästä ja lidokaiinihydrokloridia sisältävästä koostumuksesta (seossuhteet paino-%:eina 62/33/2,5/2,5); suora viiva osoittaa, että mitään rakenteen muutosta ei tapahdu.

Kuvio 6 esittää valokuvaa GMO:n lamellirakenteesta polaroidun valon esiin tuomassa muodossa. Ulkonäkö muistuttaa piipunpuhdistajan rakennetta.

Kuvio 7 esittää esimerkissä 23 kuvatusta tutkimuksesta saatuja tuloksia. Talteen saatu GMO-määrä on esitetty käsittelyn jälkeen kuluneen ajan funktiona; tutkimukseen osallistui 3 koehenkilöä.

Keksinnön selitys

Kuten edellä olevan perusteella on ilmeistä, on tarpeellista saada tunnistettua, kehitettyä ja/tai valmistettua bioadhesiivisia aineita, joilla on mahdollista kehittää bioadhesiivisia koostumuksia, jotka ovat esimerkiksi sumuttei-

den, liuosten, suspensioiden, emulsioiden ja muiden näitä vastaavien lääkemuotojen muodossa, näiden levittämiseksi eläimen, kuten ihmisen, vaurioitumattomaan tai vaurioituneeseen ihoon tai limakalvoon tai koostumusten saattamiseksi kulkeutumaan näiden läpi.

Tämä keksintö täyttää tämän tarpeen saattamalla käyttöön aineita, joiden suhteellinen moolimassa on verrattain pieni ja joiden bioadhesiiviset ominaisuudet ovat sellaisia, että ne tuottavat bioadhesiivisia ominaisuuksia koostumuksille, jotka ovat valmistettavissa sumutteen, liuoksen ja muiden näitä vastaavien lääkemuotojen muotoon. Tässä keksinnössä on havaittu, että tietyllä aineryhmällä on bioadhesiivisia ominaisuuksia. Tunnetuista bioadhesiivisia ominaisuuksia sisältävistä aineista poiketen nämä uudet aineet eivät ole polymeerejä vaan suhteelliselta moolimassaltaan pieniä yhdisteitä, joiden suhteellinen moolimassa on korkeintaan noin 1000 daltonia.

Termi "bioadhesiivinen aine" määritellään tässä keksinnössä väljästi materiaaliksi, joka kykenee olemaan sitoutuneena biologiseen membraaniin ja pysymään tässä membraanissa pitkän aikaa. Tämän mukaisesti "bioadheesio" on materiaalin kiinnittymistä biologiseen alustaan, kuten biologiseen membraaniin. Termiä "mukoadhesiivinen aine" käytetään yleisesti hyväksytyn terminologian mukaisesti synonyyminä termille "bioadhesiivinen aine". Termi "mukoadhesiivinen" painottaa sitä seikkaa, että jonkin materiaalin ja biologisen membraanin sisältämän limakalvon/liman/mukiinin välille voidaan saada syntymään adhesiivinen sidos.

Aineet, jotka sisältävät tähän mennessä tuntemattomia bioadhesiivisia ominaisuuksia, kuuluvat kaikki rasvahappoesterien ryhmään. Tämä keksintö liittyy yhdessä kohteessaan näiden rasvahappoesterien käyttöön bioadhesiivisina aineina. Kaikilla rasvahappoesterin määritelmän piiriin kuuluvilla yhdisteillä, toisin sanoen rasvahappokomponentin (tai tämän

johdannaisen) ja hydroksiryhmän sisältävän yhdisteen välisen reaktion välityksellä muodostuneilla estereillä, ei ole bioadhesiivisia ominaisuuksia. Tätä kuvaavaksi esimerkiksi voitaisiin ottaa se tässä keksinnössä tehty havainto, ettei esimerkiksi C_{12}- ja C_{18}-rasvahappoesterimonoglyserideistä painosuhteessa 1 : 1 valmistettu yhdistelmä ole tässä keksinnössä esitetyn määritelmän mukaisesti bioadhesiivinen. Tästä syystä sen määrittämiseksi, onko jollakin tietyllä nimenomaisella rasvahappoesterillä bioadhesiivisia ominaisuuksia ja voidaanko tätä siten käyttää bioadhesiivisena aineena tämän keksinnön mukaisesti, on kyseessä olevasta rasvahappoesteristä tarpeellista suorittaa bioadhesiivisuustutkimus. Esimerkkejä sopivista tutkimusmenetelmistä on kuvattu yksityiskohdittain tämän keksinnön kokeellisessa osassa ja tässä keksinnössä on kuvattu vaatimukset, jotka aineen on täytettävä, jotta se tässä yhteydessä katsottaisiin bioadhesiiviseksi aineeksi.

Tämän mukaisesti tämän keksinnön yksi kohde liittyy sellaisen rasvahappoesterin käyttöön, joka tutkittuna bioadheesiotutkimusjärjestelmässä, joka käsittää sen, että

i) sijoitetaan pituussuunnassa leikatun kaniinin tyhjänsuolen segmentti ruostumattomasta teräksestä valmistettuun pidikkeeseen tyhjänsuolen limakalvokerros sillä tavoin ylöspäin suuntautuneena, että tähän voidaan levittää mainittua rasvahappoesteriä,

ii) asetetaan tulokseksi saatu pidike -21 ± 2° kulmassa sylinterimäiseen kammioon, jota pidetään termostoiduissa olosuhteissa 37 ± 0,5 °C:ssa ja säilyttäen suhteellinen kosteus noin 100 %:ssa,

iii) huuhdellaan pidikkeessä olevaa tyhjääsuolta isotonisella 0,02 M fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6,5, 37 °C) 5 minuutin ajan virtausnopeudella 10 ml/min,

iv) levitetään tarkasti punnittu määrä mainittua rasvahappoesterinäytettä (noin 50 - 150 mg, kuten noin 100 mg) tietylle pidikkeessä olevan tyhjänsuolen limakalvon pinnassa olevalle alueelle (noin 0,8 cm x 6 cm),

v) lisätään levitetyn näytteen pinnalle pisaroittain noin 1 ml mainittua fosfaattipuskuriliuosta,

vi) jätetään vaiheesta v) peräisin oleva tulokseksi saatu näyte 10 minuutiksi mainittuun kammioon, jotta näytteellä olisi mahdollisuus päästä vuorovaikutukseen tyhjänsuolen glykoproteiinien kanssa,

vii) huuhdellaan tyhjääsuolta sen sisältämine levitettyine näytteineen mainitulla fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6,5, 37 °C) 30 minuutin ajan virtausnopeudella 10 ml/min,

viii) otetaan talteen vaiheesta vii) peräisin olevat pesuliuokset, ja

ix) lasketaan tyhjänsuolen pinnalla pysyneen näytteen jäljellä oleva määrä määrittämällä pesuliuoksessa olevan näytteen määrä tai määrittämällä tyhjänsuolen pinnalle jäänyt määrä,

tuottaa bioadhesiivisen aineen muodossa jäljellä olevaksi määräksi vähintään 60 paino-%, kuten esimerkiksi vähintään noin 70 paino-%, 80 paino-%, 85 paino-%, 90 paino-% tai 95 paino-%.

Edellä mainittu bioadheesiotutkimus on kuvattu yksityiskohtaisesti kappaleeseen "Menetelmät" kuuluvassa osassa, jonka otsikkona on "Kaniinin tyhjänsuolen membraaneihin perustuva bioadheesion in vitro -tutkimusjärjestelmä". On huomattava, että edellä kuvatun tutkimusmenetelmän tilalla - ja tämän mukaisesti niiden vaatimusten tilalla, joita tarvitaan sen määrittämiseen, onko rasvahappoesteri bioadhesiivi-

nen vai ei - voidaan käyttää muita tutkimusmenetelmiä, kuten esimerkiksi mitä tahansa niistä tutkimusmenetelmistä, joita on kuvattu tämän keksinnön "Menetelmät"-kappaleessa.

Rasvahappoesterit, jotka ovat ominaisuuksiltaan bioadhesiivisia sellaisen näytön perusteella, jota on hankittu jollakin tässä keksinnössä kuvatuista tutkimusmenetelmistä, ja joita käytetään bioadhesiivisina aineina tämän keksinnön mukaisesti, ovat rasvahappoestereitä (toisin sanoen nämä koostuvat rasvahappokomponentista ja hydroksia sisältävästä komponentista), joissa rasvahappoesterin rasvahappokomponentti on tyydyttynyt tai tyydyttymätön rasvahappo, jonka hiiliatomien kokonaismäärä on C_8:sta C_{22}:een.

Erityisiä esimerkkejä tyydyttyneistä rasvahapoista tämän keksinnön mukaisten rasvahappoesterien komponentteina ovat kapronihappo, kapryylihappo, kapriinihappo, lauriinihappo, myristiinihappo, palmitiinihappo, steariinihappo, maapähkinähappo ja beheenihappo.

Erityisiä esimerkkejä tämän keksinnön mukaisissa rasvahappoestereissä komponentteina olevista tyydyttämättömistä rasvahapoista ovat palmitoleiinihappo, öljyhappo, linolihappo, linoleenihappo ja arakidonihappo.

Erityisen sopivia rasvahappoestereitä käytettäväksi tämän keksinnön mukaisesti ovat rasvahappoesterit, joita ovat polyhydristen alkoholien rasvahappoesterit, hydroksikarboksyylihappojen rasvahappoesterit, monosakkaridien rasvahappoesterit, glyseryylifosfaattijohdannaisten rasvahappoesterit, glyseryylisulfaattijohdannaisen rasvahappoesterit ja näiden seokset. Niissä tapauksissa, joissa rasvahappoesterin hydroksia sisältävä komponentti on polyvalenttinen, voi hydroksia sisältävä komponentti olla osittain tai kokonaan esteröity rasvahappokomponentilla tai rasvahappokomponenttien seoksilla.

Tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi soveltuva rasvahappoesterin polyhydrinen alkoholikomponentti on edullisesti glyseroli, 1,2-propaanidioli, 1,3-propaanidioli, diasyyligalaktosyyliglyseroli, diasyylidigalaktosyyliglyseroli, erytritoli, ksylitoli, adonitoli, arabitoli, mannitoli tai sorbitoli. Tällaisista polyhydrisistä alkoholeista muodostuneet rasvahappoesterit voivat olla mono- tai polyvalenttisia, kuten esimerkiksi divalenttisia, trivalenttisia ja niin edelleen. Erityisesti rasvahappomonoestereillä on osoittautunut olevan bioadhesiivisia ominaisuuksia ja nämä ovat tästä syystä edullisia tämän keksinnön mukaisesti käytettäviä rasvahappoestereitä. Se polyvalenttisen alkoholin asema, johon esterisidos(kset) muodostuu(vat), voi olla mikä tahansa mahdollinen asema. Niissä tapauksissa, joissa rasvahappoesteri on diesteri, triesteri ja niin edelleen, voivat rasvahappoesterin rasvahappokomponentit olla samanlaiset tai erilaiset. Tämän keksinnön edullisimmassa kohteessa polyhydrinen alkoholikomponentti on glyseroli.

Esimerkkejä tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi soveltuvista rasvahappoestereistä ja rasvahappoestereistä, joissa hydroksia sisältävä komponentti on polyhydrinen alkoholi, ovat glyseryylimono-oleaatti, glyseryylimonolinoleaatti, glyserolimonolinolenaatti ja näiden seokset. Näiden rasvahappoesterien bioadhesiiviset ominaisuudet ovat erityisen lupaavia, mistä saa käsityksen tutustumalla tämän keksinnön esimerkkeihin.

Niissä tapauksissa, joissa tämän keksinnön mukaisesti käytettävä rasvahappoesteri muodostuu hydroksikarboksyylihapon (tai tämän johdannaisen) ja rasvahapon (tai tämän johdannaisen) kesken, on rasvahappoesterin hydroksikarboksyylihappokomponentti edullisesti omenahappo, viinihappo, sitruunahappo tai maitohappo. Mielenkiintoinen esimerkki tämän keksinnön mukaisesti käytettävästä rasvahappoesteristä on sitruunahapon rasvahappomonoesteri.

Kuten edellä mainittiin, voi tämän keksinnön mukaisesti käytettävän rasvahappoesterin hydroksia sisältävä komponentti olla myös sakkaridi, kuten monosakkaridi, kuten esimerkiksi glukoosi, mannoosi, fruktoosi, treoosi, guloosi, arabinoosi, riboosi, erytroosi, lyksoosi, galaktoosi, sorboosi, altroosi, talloosi, idoosi, ramnoosi tai alloosi. Niissä tapauksissa, joissa hydroksia sisältävä komponentti on monosakkaridi, on rasvahappoesteri edullisesti sellaisen monosakkaridin rasvahappomonoesteri, joka on sorboosi, galaktoosi, riboosi tai ramnoosi.

Tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi tarkoitetun rasvahappoesterin hydroksia sisältävä komponentti voi myös olla glyseryylifosfaattijohdannainen, kuten esimerkiksi fosfolipidi, joka on fosfatidihappo, fosfatidyyliseriini, fosfatidyylietanoliamiini, fosfatidyylikoliini, fosfatidyyliglyseroli, fosfatidyyli-inositoli tai difosfatidyyliglyseroli.

Erityisen mielenkiintoisia fosfolipidiryhmän sisältäviä yhdisteitä ovat yhdisteet, joissa rasvahappoesteri on glyseryylifosfaattijohdannaisen rasvahappoesteri ja rasvahappokomponentti on lauriinihappo, myristiinihappo, palmitiinihappo, steariinihappo, öljyhappo, linolihappo, linoleenihappo tai beheenihappo. Esimerkkejä näistä käyttökelpoisista rasvahappoestereistä ovat dioleyylifosfatidyylikoliini, dilauryylifosfatidyylikoliini, dimyristyylifosfatidyylikoliini, dipalmitoyylifosfatidyylikoliini, distearoyylifosfatidyylikoliini, dibehenoyylifosfatidyylikoliini, dimyristyylifosfatidyylietanoliamiini, dipalmitoyylifosfatidyylietanoliamiini,dioleyylifosfatidyyliglyseroli, dilauryylifosfatidyyliglyseroli, dimyristoyylifosfatidyyliglyseroli, dipalmitoyylifosfatidyyliglyseroli, distearoyylifosfatidyyliglyseroli, dipalmitoyylifosfatidihappo tai näiden seokset.

Useimmat tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi tarkoitetut rasvahappoesterit ovat tunnettuja kemiallisia yhdisteitä, joita on saatavilla kaupallisesti tai joita voidaan valmistaa tavanomaisin esteröintimenetelmin, joihin sisältyy esimerkiksi se, että rasvahappojohdannainen, kuten esimerkiksi vastaava happokloridi, saatetaan reagoimaan hydroksia sisältävän yhdisteen (tämä on suojattu tarvittaessa sopivilla suojaavilla ryhmillä) kanssa, ja rasvahappoesteri eristetään myöhemmässä vaiheessa mahdollisen suojaavan ryhmän poistamisen jälkeen, mikäli tähän on tarvetta. Elintarviketeollisuudessa käytetään useita kaupallisesti saatavia rasvahappoestereitä eikä tavallisesti ryhdytä toimenpiteisiin noin 100-%:isesti puhtaan rasvahappoesterin aikaansaamiseksi. Esimerkkinä voidaan mainita, että glyseryylimono-oleaatti, joka on hankittu yhtiöstä Grindsted Products A/S, Tanska, on hyvin puhdas tuote, joka sisältää 98 paino-% monoestereitä, joista noin 80 paino-% on glyseryylimono-oleaattia; jäljellä olevat monoesterit ovat glyseryylimonolinoleaattia, glyseryylimonopalmitaattia ja glyseryylimonostearaattia. Tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi soveltuvat rasvahappoesterituotteet voivat siten olla rasvahappoestereiden seoksia.

Bioadhesiivisten ominaisuuksien ohella on monista edellä mainituista rasvahappoestereistä tunnistettu mielenkiintoinen yhteinen ominaisuus, nimittäin niiden kyky muodostaa nestekiderakenne sen jälkeen kun ne on saatettu kosketukseen esimerkiksi vesipitoisen mediumin kanssa. Mihinkään teoriaan rajoittumatta on nykyinen työhypoteesi se, että tietyn nimenomaisen aineen kyky muodostaa nestekiteitä ja tämän saman aineen kyky toimia bioadhesiivisena aineena liittyvät jollakin tavoin toisiinsa.

Termiä "nestekiderakenne" käytetään tässä keksinnössä tarkoittamaan kiinteiden kiteiden ja isotrooppisten nesteiden välistä olomuotoa, jolle ovat luonteenomaisia laajalle alueelle ulottuva järjestyneisyys ja lyhyellä vaikutus-

alueella vallitsevat ominaisuudet, jotka muistuttavat läheisesti yksinkertaisen nesteen tai liuoksen ominaisuuksia (Keller, et al., Handbook of Liquid Crystals, Verlag Chemie, Weinheim, Saksa, 1980).

Esimerkkejä rasvahappoestereistä, joiden bioadhesiiviset ominaisuudet ovat erinomaiset ja joilla on erinomainen kyky muodostaa nestekiderakenne, ovat rasvahappojen glyseryylimonoesterit. Erityisiä esimerkkejä ovat glyseryylimonooleaatti (monoleiini) ja glyseryylimonolinoleaatti. Nämä rasvahappoesterit kykenevät muodostamaan useita erilaisia kiderakenteita sen jälkeen kun ne on saatettu kosketukseen hydrofiilisen mediumin, kuten veden tai glyserolin, kanssa.

Nestekiderakenteita voivat olla kuutiollinen rakenne (tunnetaan kolme kuutiollista rakennetta: 1) tilakeskinen kidehila, ii) alkeistimanttikidehila ja iii) gyroidi), heksagoninen rakenne, käänteinen heksagoninen rakenne tai lamellirakenne. Termi "kuutiollinen rakenne" tarkoittaa tässä keksinnössä termodynaamisesti stabiilia, viskoottista ja optisesti isotrooppista rakennetta, joka muodostuu rasvahappoesteristä ja vesipitoisesta mediumista. Kumpaakin termeistä "heksagoninen rakenne ja "käänteinen heksagoninen rakenne" käytetään, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna, kuvaamaan termodynaamisesti stabiileja, viskoottisia ja optisesti anisotrooppisia rakenteita, joille on luonteenomaista pitkälle ulottuva kaksiulotteinen järjestyneisyys ja jotka ovat muodostuneet rasvahappoesteristä ja vesipitoisesta mediumista. Termille "lamellirakenne" on luonteenomaista pitkälle ulottuva yksiulotteinen järjestyneisyys. Liposomit, jotka sisältävät lipidikaksoiskerroksista muodostuneita pallomaisia kuoria, saavat alkunsa lamellirakenteesta. Useat erilaiset nestekiderakenteet voidaan havaita ja tunnistaa käyttämällä polaroitua valoa tai analysoimalla röntgensädediffraktiokuviota (tätä on käsitelty tämän keksinnön esimerkeissä).

Edellä mainittujen havaintojen mukaisesti voi tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi soveltuva rasvahappoesteri olla rasvahappoesteri, joka kykenee muodostamaan nestekiderakenteen joutuessaan kosketukseen vesipitoisen mediumin kanssa. Vesipitoinen medium on medium, joka sisältää vähintään osaksi vettä. Vesipitoisten liuosten tai dispersioiden lisäksi tällainen medium voi olla mikä tahansa vettä sisältävä ruumiinneste tai erite, kuten esimerkiksi ihmisen ruumiinnesteen kyseessä ollessa sylki, hiki, mahaneste ja muut näitä vastaavat ruumiinnesteet. Ruumiinneste voi saada aikaan nestekiderakenteen muodostumisen saatettaessa rasvahappoesteri kosketukseen tällaisen nesteen kanssa.

Kuten esimerkeissä on tarkasteltu, on nykyinen työhypoteesi se, että bioadheesion muodostuminen limakalvon pinnan ja bioadhesiivisia ominaisuuksia sisältävästä rasvahappoesteristä koostuvan koostumuksen välille, on riippuvainen nestekiderakenteen muodostumisesta in situ -olosuhteissa sen jälkeen kun koostumus on saatettu vesipitoisen mediumin vaikutukselle alttiiksi in situ -olosuhteissa. Bioadheesion muodostuminen johtuu todennäköisimmin kuutiollisen rakenteen muodostumisesta in situ -olosuhteissa. Toisin sanoen tässä yhteydessä lupaavia koostumuksia ovat bioadhesiivista rasvahappoesteriä sisältävät koostumukset, jotka kykenevät toimimaan nestekiderakenteen muodostumiseen johtavana prekursorina in situ -olosuhteissa, toisin sanoen koostumusten on kyettävä muodostamaan nestekiderakenne sen jälkeen kun koostumus on saatettu vesipitoisen ympäristön vaikutukselle alttiiksi tai se on saatettu kosketukseen tällaisen ympäristön kanssa käsittelykohdassa.

Bioadheesion mekanismi voi olla melko epäspesifinen, koska rasvahappoesterit tarttuvat erityyppisiin biologisiin kudoksiin (esimerkiksi poskiontelon limakalvo, mahan limakalvo, suoliston limakalvo, siasta ja kaniinista peräisin oleva limakalvo, vrt. tämän keksinnön esimerkit). Vaikuttaa siltä, että mekanismiin sisältyy kudoksen dehydraatio.

Tämän keksinnön mukaisesti käytettäviksi soveltuvien rasvahappoesterien bioadhesiivisten ominaisuuksien vuoksi nämä rasvahappoesterit ovat sopivia ainesosia koostumuksissa, joita formuloidaan tähdäten bioadhesiivisten koostumusten aikaansaamiseen. Sen lisäksi, että bioadhesiivisen koostumuksen käytöllä on relevanssia lääkeaineiden annostelun alalla (vrt. tämän keksinnön johdanto), on bioadhesiivisilla koostumuksilla myös mielenkiintoa kosmetiikan, eläinlääketieteen ja maatalouskemikaalien valmistuksen alalla. Tämän keksinnön mukaista kosmeettista käyttöä varten ovat erityisesti ihoon levitettäväksi tarkoitetut koostumukset relevantteja. Tämän keksinnön mukaista maatalouskemiallista käyttöä varten ovat erityisesti viljakasveihin, satokasveihin, rikkakasveihin, hyönteisiin tai hyönteistuhoeläimiin tarttuvat koostumukset tärkeitä.

Farmaseuttisissa, kosmeettisissa, eläinlääketieteellisissä tai maatalouskemiallisissa koostumuksissa käytetään tämän keksinnön mukaiseen käyttöön tarkoitettua rasvahappoesteriä tavallisesti konsentraatiossa, joka on noin 1 - noin 90 paino-% tai noin 95 paino-% koostumuksen perusteella laskettuna. Rasvahappoesteri(e)n konsentraatio farmaseuttisissa koostumuksissa on edullisesti alueella noin 5 - 95 paino-%, kuten konsentraatio, joka on vähintään 6 paino-%, kuten esimerkiksi vähintään noin 10 paino-%, 15 paino-%, 20 paino-%, 25 paino-%, 30 paino-%, 35 paino-%, 40 paino-%, 45 paino-% tai 50 paino-%, ja konsentraatio, joka on korkeintaan noin 90 paino-%, kuten esimerkiksi korkeintaan 85 paino-%, 80 paino-%, 75 paino-%, 70 paino-%, 65 paino-%, 60 paino-% tai 55 paino-%.

Kuten edellä johdannossa mainittiin, on farmaseuttisen koostumuksen viskositeetti tärkeä koostumuksen käytettävyyttä määräävä parametri. Tämän keksinnön mukaisten suhteelliselta moolimassaltaan pienten bioadhesiivisten rasvahappoesterien käyttö on tehnyt mahdolliseksi valmistaa bioadhesiivisia koostumuksia, joiden dynaaminen viskositeet-

ti on suhteellisen pieni, mikä viittaa siihen, että nämä aineet soveltuvat mahdollisesti käytettäväksi formuloitaessa koostumuksia sumutteiden, liuosten, suspension, emulsioiden ja muiden vastaavien lääkemuotojen muotoon. Tämän keksinnön mukaisten bioadhesiivisten rasvahappoestereiden käyttö bioadhesiivisten koostumusten valmistamiseen ei kuitenkaan rajoitu koostumuksiin, joiden dynaaminen viskositeetti on verrattain pieni.

Vielä yhdessä kohteessa tämä keksintö liittyy bioadhesiivisen rasvahappoesterin käyttöön farmaseuttisissa, kosmeettisissa tai maatalouskemiallisissa koostumuksissa, joissa koostumuksen dynaaminen viskositeetti on korkeintaan 3500 mPa · s, kuten esimerkiksi korkeintaan noin 3000 mPa · s, 2000 mPa · s, 1500 mPa · s tai 1000 mPa · s, määritettynä 20 ± 5 °C:n lämpötilassa leikkausnopeudella 120 s^{-1}. Sellaisten koostumusten dynaaminen viskositeetti, joita on tarkoitus käyttää sumutteen, liuoksen, suspension, dispersion tai emulsion tai muiden näitä vastaavan lääkemuodon muodossa, on edullisesti korkeintaan 500 mPa · s, kuten korkeintaan 450 mPa · s, 400 mPa · s, 350 mPa · s tai niinkin pieni kuin enintään 100 mPa · s, määritettynä 20 ± 0,5 °C:n lämpötilassa leikkausnopeudella 120 s^{-1}. Niissä tapauksissa, joissa koostumus on melko kiinteä tai joissa koostumuksen dynaaminen viskositeetti 20 °C:ssa on suurempi kuin noin 2000 mPa · s, voi täsmällistä dynaamista viskositeettia 20 °C:n lämpötilassa olla vaikea määrittää. Dynaaminen viskositeetti voidaan näissä tapauksissa määrittää 37 °C:ssa ja dynaamisen viskositeetin on tällöin oltava edullisesti korkeintaan 500 mPa · s, korkeintaan 450 mPa · s, 400 mPa · s, 350 mPa · s tai niinkin pieni kuin enintään 100 mPa · s, määritettynä 37 ± 0,5 °C:n lämpötilassa leikkausnopeudella 120 s^{-1}. Tiettyjen koostumusten dynaamisen viskositeetin määritys on kuvattu tämän keksinnön kokeellisessa osassa. Dynaaminen viskositeetti määritetään laimentamattomasta koostumuksesta.

Tämän keksinnön mukaista bioadhesiivista rasvahappoesteriä sisältävät farmaseuttiset koostumukset ovat tarkoitettuja levitettäväksi eläimen, kuten ihmisen, kynteen tai vaurioitumattomaan tai vaurioituneeseen ihoon tai limakalvoon tai näiden läpi. Limakalvo on edullisesti suun, nenän, emättimen, peräsuolen, korvan, keuhkojen tai gastrointestinaalialueen limakalvo. Iho tai limakalvo voi olla myös tulehtunut. Koostumusta voidaan myös annostella ruumiinonteloihin, kuten suuonteloon tai käyttämällä annostelua poskiontelon kautta.

Lisäksi tämän keksinnön mukaista bioadhesiivista rasvahappoesteriä sisältävää farmaseuttista koostumusta voidaan myös levittää eläimen, kuten ihmisen, kynteen.

Kuten edellä mainittiin, voivat tämän keksinnön mukaista bioadhesiivista rasvahappoesteriä sisältävät koostumukset olla itsessään bioadhesiivisia. Tämän keksinnön edullisessa kohteessa ovat koostumukset bioadhesiivisia sellaisten todisteiden mukaisesti, joita on saatu käyttämällä vähintään yhtä tämän keksinnön kokeellisessa osassa kuvatuista tutkimusmenetelmistä. Tämän keksinnön mukaista bioadhesiivista rasvahappoesteriä sisältävää bioadhesiivista koostumusta levitetään edullisesti kohteeseen, kuten limakalvokohteeseen, jossa siihen kohdistuvat mekaanisiin tekijöihin perustuva poistovaikutus ja huuhtoutumiseen perustuva poistovaikutus, jollaisia ovat esimerkiksi värekarvaliikkeet nenäontelossa tai syljen vaikutus suuontelossa ja muut näitä vastaavat vaikutukset.

Lisäksi kuten johdannossa esitetyn tarkastelun perusteella on ilmeistä, voidaan tämän keksinnön mukaista bioadhesiivista rasvahappoesteriä sisältävä koostumus valmistaa sumutteen muotoon.

Keksintö liittyy myös bioadhesiivisten rasvahappoesterien käyttöön koostumuksissa, joita käytetään useasta kerta-annoksesta muodostuvan koostumuksen muodossa.

Keksintö liittyy muissa kohteissa menetelmiin, jotka soveltuvat aktiivisen tai suojaavan aineen antamiseen eläimen, kuten ihmisen, vaurioitumattomaan tai vaurioituneeseen ihoon, limakalvoon tai kynteen tai näiden läpi, joka menetelmä käsittää sen, että kohteeseen levitetään koostumusta, joka sisältää rasvahappoesteriin yhdistettyä aktiivista tai suojaavaa ainetta ja joka tutkittuna bioadheesion tutkimusjärjestelmässä, joka sisältää sen, että

i) asetetaan pitkittäissuuntaisesti leikatun kaniinin tyhjänsuolen segmentti ruostumattomasta teräksestä valmistettuun pidikkeeseen siten, että tyhjänsuolen limakalvokerros tulee ylöspäin siten, että mainittua rasvahappoesteriä kyetään levittämään tähän,

ii) asetetaan valmiiksi saatu pidike -21 ± 2° kulmassa sylinterimäiseen kammioon, jota pidetään termostoituna 37 ± 0,5 °C:ssa ja jonka suhteellista kosteutta pidetään noin 100 %:ssa,

iii) huuhdellaan pidikkeessä olevaa tyhjääsuolta isotonisella 0,02 M fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6,5, 37 °C) 5 minuutin ajan virtausnopeudella 10 ml minuutissa,

iv) levitetään tarkasti punnittu määrä mainittua rasvahappoesterinäytettä (noin 50 - 150 mg, kuten noin 100 mg) pidikkeessä pidettävän tyhjänsuolen limakalvon pinnalla olevalle alueelle (noin 0,8 x 6 cm),

v) lisätään levitetyn näytteen pinnalle pisaroittain noin 1 ml mainittua fosfaattipuskuriliuosta,

vi) jätetään vaiheesta v) tulokseksi saatu näyte 10 minuutiksi mainittuun kammioon, jotta näytteellä on mahdollisuus päästä vuorovaikutukseen tyhjänsuolen glykoproteiinien kanssa,

vii) huuhdellaan levitettyä näytettä sisältävää tyhjääsuolta mainitulla fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6,5, 37 °C) 30 minuutin ajan virtausnopeudella 10 ml minuutissa,

viii) otetaan vaiheesta vii) tuloksena olevat pesuliuokset talteen, ja

ix) lasketaan tyhjänsuolen pinnalle jääneen näytteen jäljellä oleva määrä määrittämällä näytteen määrä pesuliuoksessa tai määrittämällä tyhjänsuolen pinnalle jäänyt määrä,

tuottaa jäljelle jääneeksi määräksi vähintään 60 paino-%, kuten esimerkiksi vähintään noin 70 paino-%, 80 paino-%, 85 paino-% tai 90 paino-%,

ja aktiivista tai suojaavaa ainetta ja rasvahappoesteriä sisältävä koostumus on sellainen, että tulokseksi saatu koostumus on todisteiden perusteella itsessään bioadhesiivinen siinä mielessä, että se täyttää vähintään yhden bioadheesiokriteereistä, jotka ovat:

a) koostumuksen käyttö tuottaa rasvahappoesterin jäljelle jääneeksi määräksi vähintään 40 paino-%, kuten vähintään 45 paino-%, 50 paino-% tai 55 paino-%, tai aktiivisen tai suojaavan aineen määräksi vähintään 40 paino-%, kuten vähintään 45 paino-%, 50 paino-% tai 55 paino-%, silloin kun koostumusnäyte tutkitaan edellä mainitussa vaiheet i) - ix) sisältävässä bioadheesion tutkimusjärjestelmässä,

b) koostumus on tensiometrisella tutkimusmenetelmällä, kuten tässä keksinnössä kuvatulla tensiometrisellä menetelmällä,

tutkittuna tässä keksinnössä määritellyn bioadheesiovaatimuksen mukainen,

c) koostumus täyttää tässä keksinnössä määritellyt bioadheesiovaatimukset, kun sen bioadheesio on tutkittu in vivo -mallissa, kuten sellaisessa in vivo -mallissa, johon liittyy koostumuksesta suoritettu tutkimus, jolla määritetään sen huuhtoutuvuus iholta.

Edellä mainitussa tutkimuksessa on pantava merkille, että kohdassa a) esitetty aktiivisen tai suojaavan aineen jäljellä olevaa määrää koskeva vaatimus on asianmukainen ainoastaan silloin, jos käytetään aktiivista tai suojaavaa ainetta, jonka vesiliukoisuus on sitä luokkaa, että suurin osa tästä on jäänyt liukenematta tutkimuksen aikana.

Tässä yhteydessä termi "aktiivinen tai suojaava aine" on tarkoitettu merkisemään mitä tahansa biologisesti tai farmakologisesti aktiivista ainetta tai antigeenia sisältävää materiaalia; tämä termi sisältää lääkeaineet, joilla on käyttöä eläimiin tai ihmisiin vaikuttavien tautien tai sairauksien hoidossa tai ehkäisemisessä tai minkä tahansa eläimellä tai ihmisellä olevan fysiologisen tilan säätelyssä ja siihen sisältyy myös biologisesti aktiivinen yhdiste tai koostumus, jolla tehokkaana määränä annosteltuna on vaikutus eläviin soluihin tai organismeihin.

Aktiivisia aineita, mukaan lukien niiden fysiologisesti ja farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat ja esilääkeaineet, joita voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisesti, voivat olla tätä keksintöä rajoittamatta sellaisiin ryhmiin kuuluvat aineet, jotka ovat:

kipulääkkeet, kuten esimerkiksi buprenorfiini, kodeiini, fentanyyli, morfiini, hydromorfoni ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

anti-inflammatoriset lääkkeet, kuten esimerkiksi ibuprofeeni, indometasiini, naprokseeni, diklofenaakki, tolfenaamihappo, piroksikaami ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

rauhoittavat lääkkeet, kuten esimerkiksi diatsepaami, droperiodoli, fluspirileeni, haloperidoli, loratsepaami ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

sydänglykosidit, kuten esimerkiksi digoksiini, ouabaiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

narkoottisten aineiden antagonistit, kuten esimerkiksi naloksoni, nalorfiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

parkinsonismilääkkeet, kuten esimerkiksi bromokriptiini, biperidiini, bentsheksoli, bentstropiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

depressiolääkkeet, kuten esimerkiksi imipramiini, nortriptyliini, pritiptyleeni ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

antineoplastiset aineet ja immunosupressiivit, kuten esimerkiksi bleomysiini, syklosporiini A, fluorourasiili, merkaptopuriini, metotreksaatti, mitomysiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

viruslääkkeet, kuten esimerkiksi idoksuridiini, asykloviiri, interferonit, vidarabiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

antibiootit, kuten esimerkiksi klindamysiini, erytromysiini, fusidiinihappo, gentamisiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

sienilääkkeet, kuten esimerkiksi mikonatsoli, ketokonatsoli, klotrimatsoli, amfoterisiini B, nystatiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

mikrobilääkkeet, kuten esimerkiksi metronidatsoli, tetrasykliinit ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

ruokahalua hillitsevät lääkkeet, kuten esimerkiksi fenfluramiini, matsindoli, fentermiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

antiemeetit, kuten esimerkiksi metoklopramidi, droperidoli, haloperidoli, prometatsiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

antihistamiinit, kuten esimerkiksi klorfeniramiini, terfenadiini, triprolidiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

migreenilääkkeet, kuten esimerkiksi dihydroergotamiini, ergotamiini, pitsotyliini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

sydänverisuonia, aivoverisuonia tai periferaalisia verisuonia laajentavat aineet, kuten esimerkiksi nifediipini, diltiatseemi ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

angina pectoris -lääkkeet, kuten esimerkiksi glyseryylinitraatti, isosorbididinitraatti, molsidomiini, verapamiili ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

kalsiumkanavanestäjät, kuten esimerkiksi verapamiili, nifedipiini, diltiatseemi, nikardipiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

hormonaaliset aineet, kuten esimerkiksi estradioli, estroni, estrioli, polyestradioli, polyestrioli, dienestroli, dietyylistilbestroli, progesteroni, dihydroergosteroni, syproteroni, danatsoli, testosteroni ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

ehkäisylääkkeet, kuten esimerkiksi etinyyliestradioli, lynestrenoli, etynodioli, noretisteroni, mestranoli, nor-

gestreeli, levonorgestreeli, desogestreeli, medroksiprogesteroni ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

antitromboottiset aineet, kuten esimerkiksi hepariini, warfariini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

diureetit, kuten esimerkiksi hydroklorotiatsidi, flunaritsiini, minoksidiili ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

verenpainelääkkeet, kuten esimerkiksi propanololi, metoprololi, klonidiini, pindololi ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

lääkkeet, jotka vaikuttavat riipuvuuteen huumaavista aineista, kuten esimerkiksi nikotiini, metadoni ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

paikallisanesteetit, kuten esimerkiksi lidokaiini, prilokaiini, bentsokaiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

kortikosteroidit, kuten esimerkiksi beklometasoni, beetametasoni, klobetasoli, desonidi, desoksimetasoni, deksametasoni, diflukortoloni, flumetasoni, fluosinoloniasetonidi, fluosinonidi, hydrokortisoni, metyyliprednisoloni, triamsinoloniasetonidi, budesonidi, halsinonidi ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

ihotautilääkkeet, kuten esimerkiksi nitrofurantoiini, ditranoli, kliokinoli, hydroksikinoliini, isotretioniini, metoksaleeni, metotreksaatti, tretioniini, trioksaleeni, salisyylihappo, penisillamiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

vitamiinit ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

silmälääkkeet, kuten esimerkiksi pilokarpiini, epinefriini, timololi, atropiini ja muut näitä vastaavat lääkkeet;

Muita erityisiä esimerkkejä tämän keksinnön mukaiseen käyttöön soveltuvista aktiivisista ainesosista ovat:

steroidit, kuten esimerkiksi estradioli, progesteroni, noretindroni, levonorgestroli, etynodioli, levenorgestreeli, norgestimaatti, gestaniini, desogestreeli, 3-ketonidesogestreeli, demegestoni, prometoestroli, testosteroni, spironolaktoni sekä näiden esterit,

atsolijohdannaiset, kuten esimerkiksi imidatsolit ja matsolit ja näiden johdannaiset,

nitroyhdisteet, kuten esimerkiksi amyylinitraatit, nitroglyseriini ja isosorbidinitraatit,

amiiniyhdisteet, kuten esimerkiksi pilokaiini, oksiabutyniinikloridi, lidokaiini, bentsokaiini, nikotiini, klorfeniramiini, terfenadiini, triprolidiini, propanololi, metoprololi ja näiden suolat,

oksikaamijohdannaiset, kuten esimerkiksi piroksikaami,

mukopolysakkaridit, kuten esimerkiksi tiomukaasi,

opioidiyhdisteet, kuten esimerkiksi morfiini ja morfiinia muistuttavat lääkeaineet, kuten buprenorfiini, oksimorfoni, hydromorfoni, levorfanoli, fentanyyli ja fentanyylijohdannaiset ja analogit,

prostaglandiinit, kuten esimerkiksi jokin yhdisteryhmään PGA, PGB, PGE tai PGF kuuluvista jäsenistä, kuten esimerkiksi misoprostoli tai enaprostiili,

bentsamidi, kuten esimerkiksi metoklopramidi, skopolamiini,

peptidi, kuten esimerkiksi kasvuhormonia vapauttavat tekijät, kasvutekijät (epidermikasvutekijä (EGF), hermokasvu-

tekijä (NGF), TGF, PDGF, insuliinikasvutekijä (IGF), fibroblastikasvutekijä (aFGF, bFGF ja niin edelleen), ja muut näitä vastaavat peptidit), somatostatiini, kalsitoniini, insuliini, vasopressiini, interferonit, IL-2, urokinaasi, serratiopeptidaasi, superoksididismutaasi (SOD), tyrotropiinia vapauttava hormoni (TRH), luteinisoivaa hormonia vapauttava hormoni (LH-RH), kortikotrofiinia vapauttava hormoni (CRF), kasvuhormonia vapauttava hormoni (GHRH), oksitosiini, erytropoietiini (EPO), pesäkestimulaatiotekijä (CSF), ja muut näitä vastaavat peptidit,

ksantiini, kuten esimerkiksi kofeiini, teofylliini,

katekoliamiini, kuten esimerkiksi efedriini, salbutamoli, terbutaliini,

dihydropyridiini, kuten esimeriksi nifedipiini,

tiatsidi, kuten esimerkiksi hydroklorotiatsidi, funaritsiini,

sydnonimini, kuten esimerkiksi molsidomini,

sulfatoitu polysakkaridi, kuten esimerkiksi hepariini.

Edellä mainitut aktiiviset tai suojaavat aineet on myös lueteltu kuvaavia tarkoituksia varten; tämä keksintö on sovellettavissa bioadhesiivisiin koostumuksiin, kuten farmaseuttisiin ja/tai kosmeettisiin koostumuksiin katsomatta siihen, mitä aktiivista ainetta tai aineita siihen on lisätty.

Kuten tämän keksinnön esimerkeistä saatavat todisteet osoittavat, ei aktiivinen tai suojaava aine vaikuta merkittävästi kantaja-aineen bioadhesiivisiin ominaisuuksiin edellyttäen, että aktiivisen tai suojaavan aineen konsentraatio on suhteellisen pieni, kuten alle noin 10 - 15 paino-% tai alle

noin 8 - 10 paino-%. Se maksimikonsentraatio, joka voidaan lisätä kantaja-aineeseen vaikuttamatta merkittävästi koostumuksen bioadhesiivisiin ominaisuuksiin, on riippuvainen luonnollisesti aktiivisen aineen laadusta, (rakenteesta, suhteellisesta moolimassasta, koosta, fysikokemiallisista ominaisuuksista, käyttömäärästä, pK_a:sta ja muista vastaavista tekijöistä). Tässä keksinnössä esitetyissä esimerkeissä on myös osoitettu, että aktiivinen aine paikantuu rasvahappoesterin nestekiderakenteeseen ja aktiivisen aineen liukoisuus vaikuttaa todennäköisimmin tämän rakenteen bioadhesiivisiin ominaisuuksiin sekä koostumuksen lääkeainetta vapauttaviin ominaisuuksiin.

Kuten edellä mainittiin, koostumusta on tarkoitus levittää ihoon tai limakalvolle. Luonnollisesti asiaankuuluvia voivat myös olla muut levitystavat, kuten esimerkiksi levittäminen hammasproteeseihin, proteeseihin ja levittäminen ruumiinonteloihin, kuten suuonteloon. Limakalvo on edullisesti suun, nenän, korvien, keuhkojen, peräsuolen, emättimen tai gastrointestinaalialueen limakalvo.

Niissä tapauksissa, joissa tämän keksinnön mukaista menetelmää aiotaan käyttää aktiivisen tai suojaavan aineen annosteluun vaurioitumattomaan tai vaurioituneeseen suun, nenän, peräsuolen, korvien tai emättimen limakalvoon tai tämän läpi, niin aktiivista tai suojaavaa ainetta ja rasvahappoesteriä sisältävän koostumuksen viskositeetti voi olla korkeintaan 3500 mPa · s, kuten korkeintaan 3000 mPa · s, 2000 mPa · s tai 1000 mPa · s määritettynä 20 ± 0,5 °C:n lämpötilassa leikkausnopeudella 120 s^{-1}. Kuten edellä mainittiin, viskositeetti voi olla jopa niinkin pieni kuin korkeintaan 450 mPa · s, erityisesti silloin, kun koostumus on valmistettu sumutteen, liuoksen tai muiden näitä vastaavien lääkemuotojen muotoon. Lisäksi bioadhesiivinen koostumus, joka on tarkoitettu levitettäväksi suun, nenän, peräsuolen, korvien tai emättimen limakalvoon, sisältää koostumuksessa edullisesti vähintään 6 paino-% rasvahappoesteriä koostu-

muksen perusteella laskettuna. Alan ammattikirjallisuudessa on kuvattu ientaskuun oraalisesti käytettäviä glyseryylimono-oleiinia sisältäviä koostumuksia, joita on käsitelty esimerkiksi julkaisussa US 5 143 934. Koostumuksia, jotka sisältävät esimerkiksi glyseryylimono-oleiinia, on myös kuvattu julkaisuissa EP-B-0 126 751 ja EP-B-0 267 617. Viimeksi mainitussa julkaisussa on lueteltu koostumuksia, joiden koostumukset ovat GMO/etanoli/propranololi-HCl (seossuhteet paino-%:eina 80/15/5), GMO/etanoli/fentanyylisitraatti (seossuhteet paino-%:eina 78/20/2), GMO/etanoli/neomysiinisulfaatti (seossuhteet paino-%:eina 75/20/5), GMO/etanoli/fentermiini-HCl (seossuhteet paino-%:eina 60/30/10) ja GMO/etanoli/naprokseeninatrium (seossuhteet paino-%:eina 70/20/10).

Tämän keksinnön mukaisesti annosteltavaksi tarkoitettu bioadhesiivinen koostumus voi myös olla monesta kerta-annoksesta yhdistetyn koostumuksen muodossa. Monesta kerta-annoksesta yhdistettyä koostumusta voidaan annostella ihoon tai limakalvoon, ja limakalvo on edullisesti suun, nenän, peräsuolen, korvien, emättimen, keuhkojen tai gastrointestinaalialueen limakalvo. Edullisin on bioadhesiivinen koostumus, joka on tarkoitettu annettavaksi maha-suolikanavaan.

Monesta kerta-annoksesta yhdistetyn koostumuksen yksittäiset kerta-annokset, jotka on tarkoitettu annettavaksi tämän keksinnön mukaisesti, sisältävät rasvahappoesteriä esimerkiksi sillä tavoin, että yksittäiset kerta-annokset on päällystetty rasvahappoesterillä. Yksittäisissä kerta-annoksissa voidaan myös käyttää lisäkerrosta, kuten kalvopäällystettä tai enteropäällystettä, joko sen maha-suolikanavan kohdan määräämiseksi, jossa aktiivisen tai suojaavan aineen on määrä vapautua, tai sen vapautumistuloksen määräämiseksi, minkä mukaan aktiivinen tai suojaava aine vapautuu koostumuksesta.

Monesta kerta-annoksesta yhdistetty koostumus voidaan valmistaa jauheen muotoon tai sellaisen tabletin tai kapselin muotoon, jossa voidaan mahdollisesti käyttää päällystettä, kuten kalvopäällystettä tai enteropäällystettä.

Monesta kerta-annoksesta yhdistetyn koostumuksen yksittäisten kerta-annosten ydin voi sisältää inertin ytimen, kuten biologisesti hajoavan ytimen, joka sisältää polysakkaridia, joka on karboksimetyyliselluloosa (carmelose), kitosaani, jokin pektiini, jokin ksantaanikumi, jokin karrageenan, karobikumi, arabikumi, jokin gelatiinityyppi, jokin alginaatti, jokin dekstraani tai jokin näiden suoloista.

Tämän keksinnön mukaisesti ihoon annosteltavaksi tarkoitettua bioadhesiivista koostumusta ei käytetä edullisesti laastarin muodossa ja bioadhesiivisen rasvahappoesterin konsentraatio on korkeintaan 60 paino-%, kuten korkeintaan 55 paino-% koostumuksen kokonaispainosta laskettuna. Julkaisussa EP-B-0 267 617 on mainittu, että ihoon levitettäväksi tarkoitetut koostumukset sisältävät rasvahappoesteriä, kuten glyseryylimono-oleaattia. Glyseryylimono-oleaattia käytetään kuitenkin tunkeutumista edistävänä aineena yli 60 paino-%:isessa konsentraatiossa.

Tämän keksinnön mukaisesti ihoon levitettäväksi soveltuvien bioadhesiivisten koostumusten sisältämän bioadhesiivisen rasvahappoesterin tai bioadhesiivisten rasvahappoesterien seosten pitoisuus on tavallisesti vähintään 6 paino-% koostumuksen perusteella laskettuna. Koostumusta voidaan levittää edullisesti vaurioituneeseen ihoon, kuten haavoihin. Ihoon ja erityisesti haavoihin levitettäväksi tarkoitetut koostumukset sisältävät edullisesti polysakkaridia konsentraatiossa, joka on vähintään 15 paino-% koostumuksen kokonaispainon perusteella laskettuna. Polysakkaridi on edullisesti karmelloosi (karboksimetyyliselluloosa), kitosaani, jokin pektiineistä, jokin ksantaanikumeista, jokin karrageenanaeista, karobikumi, arabikumi, jokin gelatiineis-

ta, jokin alginaateista tai jokin dekstraaneista tai jokin näiden suoloista. Koostumuksia on helppo levittää haavaan ja niiden arvellaan kykenevän erottamaan veden haavasta ja kuivaamaan tämän avulla haavan.

Julkaisussa EP-B-0 126 751 kuvataan toisaalta asetyylisalisyylihappoa sisältäviä ja toisaalta insuliinia sisältäviä koostumuksia, joita on tarkoitus annostella inhalaation avulla. Näiden koostumusten ei ole kuvattu olevan bioadhesiivisia. Insuliinikoostumus koostuu yhdistelmästä, joka sisältää 10 paino-% kylläistä insuliiniliuosta ja 90 paino-% nestemäistä monolinoleiinia, ja asetyylisalisyylihappokoostumus sisältää 80 paino-% monogalaktoyylidiglyseridiä. Tämän mukaisesti sellaisen tämän keksinnön mukaisen bioadhesiivisen koostumuksen kokoonpano, joka on tarkoitettu levitettäväksi sumutteena keuhkojen limakalvolle, ei ole edellä mainitun kokoonpanon mukainen.

Aktiivisen tai suojaavan aineen ja bioadhesiivisen rasvahappoesteriaineen lisäksi tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi tarkoitetut bioadhesiiviset koostumukset voivat sisältää farmaseuttisesti tai kosmeettisesssa käytössä hyväksyttäviä lisäaineita.

Bioadhesiiviset koostumukset voivat olla esimerkiksi sumutteen, liuoksen, dispersion, suspension, emulsion, tablettien, kapseleiden, pillereiden, jauheiden, granulaattien, geelien, mukaan lukien hydrogeelit, tahnojen, voiteiden, rasvavoiteiden, lääkejuomien, annostelulaitteiden, peräpuikkojen, peräruiskeiden, implanttien, aerosolien, mikrokapseleiden, mikrosfäärien, nanopartikkelien tai liposomien muodossa tai jossakin muussa sopivassa muodossa.

Bioadhesiiviset koostumukset voidaan formuloida tavanomaisen farmaseuttisen formulointikäytännön mukaisesti, tätä on käsitelty esimerkiksi teoksissa "Remington's Pharmaceutical Sciences" ja "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology",

toim. Swarbrick, J. & Boylan, J. C., Marcel Dekker, Inc., New York, 1988.

Farmaseuttisesti hyväksyttäviä lisäaineita, jotka on tarkoitettu käytettäväksi tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi tarkoitetuissa bioadhesiivisissa koostumuksissa, voivat olla esimerkiksi

inertit laimentimet tai täyteaineet, kuten sakkaroosi, sorbitoli, sokeri, mannitoli, mikrokiteinen selluloosa, natriumkarboksimetyyliselluloosa, metyyliselluloosa, hydroksipropyylimetyyliselluloosa, etyyliselluloosa, tärkkelykset, mukaan lukien perunatärkkelys, kalsiumkarbonaatti, natriumkloridi, laktoosi, kalsiumfosfaatti, kalsiumsulfaatti tai natriumfosfaatti;

rakeistusaineet ja hajoamista edistävät aineet, esimerkiksi selluloosajohdannaiset, mukaan lukien mikrokiteinen selluloosa, tärkkelykset, mukaan lukien perunatärkkelys, natriumtärkkelysglykolaatti, silloitettu natriumkarboksimetyyliselluloosa (croscarmellosenatrium), silloitettu polyvinyylipyrrolidoni (crospovidone), alginaatit tai algiinihappo;

sideaineet, esimerkiksi sakkaroosi, glukoosi, sorbitoli, arabikumi, algiinihappo, natriumalginaatti, gelatiini, tärkkelys, esigelatinoitu tärkkelys, mikrokiteinen selluloosa, magnesiumaluminiumsilikaatti, natriumkarboksimetyyliselluloosa, metyyliselluloosa, hydroksipropyylimetyyliselluloosa, etyyliselluloosa, polyvinyylipyrrolidoni, polyvinyylialkoholi tai polyetyleeniglykoli; ja

voiteluaineet, mukaan lukien liukuaineet ja adheesionestoaineet, esimerkiksi magnesiumstearaatti, sinkkistearaatti, steariinihappo, silikat, vedytetyt kasviöljyt tai talkki.

Muita farmaseuttisesti hyväksyttäviä lisäaineita voivat olla väriaineet, aromiaineet, pehmitteet, kosteutteet,

puskurointiaineet, solubilisointiaineet, vapautumista muuttavat aineet ja muut näitä vastaavat aineet.

Niissä tapauksissa, joissa bioadhesiivinen koostumus on useista kerta-annoksista yhdistetyn koostumuksen muodossa, niin yksittäiset kerta-annokset tai yksittäisiä kerta-annoksia sisältävä tabletti tai kapseli voidaan päällystää esimerkiksi sokeripäällysteellä, kalvopäällysteellä (esimerkiksi hydroksipropyylimetyyliselluloosaan, metyyliselluloosaan, metyylihydroksietyyliselluloosaan, hydroksipropyyliselluloosaan, karboksimetyyliselluloosaan, johonkin akrylaattikopolymeeriin (Eudragit), johonkin polyetyleeniglykoliin ja/tai polyvinyylipyrrolidoniin perustuvalla päällysteellä) tai enteropäällysteellä (esimerkiksi metakryylihappokopolymeeriin (Eudragit), selluloosa-asetaattiftalaattiin, hydroksipropyylimetyyliselluloosaftalaattiin, hydroksipropyylimetyyliselluloosa-asetaattisukkinaatttiin, polyvinyyliasetaattiftalaattiin, sellakkaan ja/tai etyyliselluloosaan perustuvalla päällysteellä). Lisäksi voidaan käyttää lääkeaineen vapautumista viivästävää materiaalia, kuten esimerkiksi glyseryylimonostearaattia tai glyseryylidistearaattia.

Päällyste voidaan levittää kiinteään lääkemuodon pinnalle menetellen samalla tavoin kuin mitä on kuvattu artikkelissa 'Aqueous film coating", James A. Seitz, teoksessa "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Vol 1, pp. 337 - 349, toim. Swarbrick, J. & Boylan, J. C., Marcel Dekker, Inc., New York, 1988.

Koostumusten levittämiseksi peräsuolen tai emättimen limakalvolle ovat tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi soveltuvia sopivia koostumuksia peräpuikot (emulsio- tai suspensiotyyppiset peräpuikot), liuokset, peräruiskeet ja peräsuolessa käytettävät gelatiinikapselit (liuokset tai suspensiot). Sopivia farmaseuttisesti hyväksyttäviä peräpuikkojen perusaineita ovat kaakaovoi, esteröidyt rasva-

hapot, glyseriiniä sisältävä gelatiini ja useat erilaiset vesiliukoiset tai veteen dispergoituvat perusaineet, kuten polyetyleeniglykoli ja polyoksietyleenisorbitaanirasvahappoesterit. Koostumuksiin voidaan lisätä useita erilaisia lisäaineita, kuten esimerkiksi lääkeaineiden vaikutuksia tehostavia aineita tai pinta-aktiivisia aineita.

Koostumuksen levittämiseksi nenän limakalvolle ovat tämän keksinnön mukaiseen käyttöön soveltuvia sopivia koostumuksia nenäsumutteet ja inhalaatio-aerosolit. Tyypillisesti nenään käytettäväksi tarkoitetussa formulaatiossa aktiiviset ainesosat liuotetaan tai dispergoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. Kaikki koostumuksessa käytettävät farmaseuttisesti hyväksyttävät kantaja-aineet ja lisäaineet ja mahdollisesti muut farmaseuttisesti hyväksyttävät materiaalit, kuten laimentimet, vaikutusta voimistavat aineet, aromiaineet, säilyteaineet ja muut näitä vastaavat aineet, valitaan tavanomaisessa farmaseuttisten valmisteiden valmistuksessa vallitsevan käytännön mukaisesti farmaseuttisten valmisteiden formuloinnin alan ammattikokemuksen perusteella selvällä tavalla.

Tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi tarkoitetut koostumukset, jotka on tarkoitettu levitettäväksi ihoon tai kynteen, voivat tavanomaisesti sisältää ei-toksisia farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantaja-aineita ja lisäaineita, mikrosfäärit ja liposomit mukaan luettuna. Formulaatioita ovat rasvavoiteet, voiteet, vedet, linimentit, geelit, hydrogeelit, liuokset, suspensiot, puikot, sumutteet ja tahnat. Farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantaja-aineita tai lisäaineita voivat olla emulgointiaineet, antioksidantit, puskurointiaineet, säilyteaineet, kosteutteet, tunkeutumista edistävät aineet, kelatoivat aineet, geeliä muodostavat aineet, voidepohjat, hajusteet ja ihoa suojaavat aineet.

Esimerkkejä emulgointiaineista ovat luonnonkumit, esimerkiksi arabikumi tai traganttikumi, luonnossa esiintyvät

fosfatidit, esimerkiksi soijapavun lesitiini, ja sorbitaani-mono-oleaattijohdannaiset.

Esimerkkejä antioksidanteista ovat butyloitu hydroksianisoli (BHA), askorbiinihappo ja tämän johdannaiset, tokoferoli ja tämän johdannaiset, butyloitu hydroksianisoli ja kysteiini.

Esimerkkejä säilyteaineista ovat parabenit, kuten metyyli-, etyyli- tai propyyli-p-hydroksibentsoaatti, bentsalkonium-kloridi ja bentsyylialkoholi.

Esimerkkejä kosteutteista ovat glyseriini, propyleeni-glykoli, sorbitoli ja urea.

Esimerkkinä solubilisointiaineesta (tämä voi toimia aktiivisen tai suojaavan aineen ja/tai bioadhesiivisen rasvahappo-esterin solubilisointiaineena) on bentsyylialkoholi.

Esimerkkejä sopivista lääkeaineen vapautumista muuttavista aineista, jotka on tarkoitettu käytettäväksi tämän keksinnön mukaisesti, ovat glyseroli, seesamiöljy, soijaöljy, lesitiini ja kolesteroli.

Esimerkkejä tunkeutumista edistävistä aineista ovat propyleeniglykoli, DMSO, trietanoliamiini, N,N-dimetyyli-asetamidi, N,N-dimetyyliformamidi, 2-pyrrolidoni ja sen johdannaiset, tetrahydrofurfuryylialkoholi ja atsoni.

Esimerkkejä kelatoivista aineista ovat natrium-EDTA, sitruunahappo ja fosforihappo.

Esimerkkejä muista lisäaineista, jotka soveltuvat käytettäväksi tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi tarkoitetuissa koostumuksissa, ovat ruokaöljyt, kuten manteliöljy, risiiniöljy, kaakaovoi, kookosöljy, maissiöljy, puuvillan-siemenöljy, pellavansiemenöljy, oliiviöljy, palmuöljy, maapähkinäöljy, unikonsiemenöljy, rypsiöljy, seesamiöljy,

soijaöljy, auringonkukkaöljy ja teeöljy; ja esimerkkejä polymeereistä sellaiset aineet, kuten karmelloosi, natriumkarmelloosi, hydroksipropyylimetyyliselluloosatyypit, hydroksietyyliselluloosa, hydroksipropyyliselluloosa, kitosaani, pektiini, ksantaanikumi, karrageenan, karobikumi, arabikumi, gelatiini ja alginaatit, sekä liuottimista aineet, kuten esimerkiksi glyseroli, etanoli, propyleeniglykoli, polyetyleeniglykolit, kuten PEG 200 ja PEG 400, Pluronic, polysorbaatti ja etyleeniglykoli.

Esimerkkejä voidepohjista ovat mehiläisvaha, parafiini, setyylipalmitaatti, kasviöljyt, rasvahappojen sorbitaaniesterit (Span), polyetyleeniglykolit ja sellaiset kondensaatiotuotteet, kuten esimerkiksi polyoksietyleenisorbitaanimono-oleaatti (Tween), jotka on muodostettu rasvahappojen sorbitaaniesterien ja etyleenioksidien kesken.

Kuten on selvää, niin tämän keksinnön menetelmäkohdetta koskevat yksityiskohdat ja erityispiirteet vastaavat edellä tarkasteltujen käyttökohteiden yksityiskohtia ja erityispiirteitä tai ne ovat analogisia näiden suhteen, mikä tarkoittaa sitä, että, bioadhesiivisia rasvahappoestereitä, niiden valmistusta, parannettuja ominaisuuksia ja käyttöä koskeva asiasisältö vastaa asiaankuuluvilta osiltaan vastavuoroisesti tämän keksinnön annostelua koskevien kohteiden kyseessä ollessa eri menetelmissä käytettyjä koostumuksia.

Keksintöä kuvataan seuraavaksi seuraavaksi esitetyissä käyttöesimerkeissä.

Materiaalit

Glyseryylimono-oleaatti (monoleiini), yhtiön Grindsted Products A/S, Tanska, valmistama tuote; käytetyn tuotteen rasvahappomonoesterien kokonaispitoisuus oli vähintään noin 96 %. Tässä keksinnössä kuvatuissa esimerkeissä käytetyn tuotteen rasvahappomonoesterikoostumus oli:

glyseryylimono-oleaatti	noin 84 paino-%
glyseryylimonolinoleaatti	noin 7 paino-%
glyseryylimonopalmitaatti	noin 3 paino-%
glyseryylimonostearaatti	noin 4 paino-%

Seuraavissa esimerkeissä käytetään termiä "GMO" nimityksenä, joka viittaa edellä mainitun glyseryylimono-oleaattituotteen käyttöön, toisin sanoen sellaisen tuotteen käyttöön, joka sisältää vähintään noin 84 paino-% glyseryylimono-oleaattia.

Voidaan myös käyttää muita kaupallisesti saatavilla olevia glyseryylimono-oleaattituotteita (esimerkiksi tuotteita, kuten Myverol® 18-99, joka on saatavissa yhtiöstä Kodak Eastman, USA), joka rasvahappomonoesterikoostumukseltaan poikkeaa edellä kuvatusta tuotteesta.

Glyseryylimonolinoleaatti (Dimodan® LS), tätä tuotetta valmistaa Grindsted Products A/S; käytetyn tuotteen kokonaisrasvahappomonoesteripitoisuus on vähintään noin 90 paino-%, kuten noin 96 paino-%. Tässä keksinnössä kuvatuissa esimerkeissä käytetyn tuotteen rasvahappomonoesterikoostumus oli:

glyseryylimonopalmitaatti	noin 6 paino-%
glyseryylimonostearaatti	noin 6 paino-%
glyseryylimono-oleaatti	noin 22 paino-%
glyseryylimonolinoleaatti	noin 63 paino-%

Voidaan myös käyttää muita kaupallisesti saatavilla olevia glyseryylimonolinoleaattituotteita (esimerkiksi tuotetta kuten Myverol® 18-92, joka on saatavissa yhtiöstä Kodak Eastman, U.S.A), jotka rasvahappomonoesterikoostumukseltaan poikkeavat edellä kuvatusta tuotteesta.

Mikonatsoliemäs, joka on saatavilla yhtiöstä Mediplast SPA, Milano, Italia

Propranololihydrokloridi, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Lidokaiinihydrokloridi, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Lidokaiiniemäs, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Metoklopramidi, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Isosorbididinitraatti, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Isosorbidimononitraatti, joka on saatavilla yhtiöstä Luso-chemica,

Proklorperatsiini, joka on saatavilla yhtiöstä Diosynth

Nikotiini, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Nifedipiini, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Buprenorfiini, joka on saatavilla yhtiöstä Diosynth

Asykloviiri, joka on saatavilla yhtiöstä Heumann Pharma

Indometasiini, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co.,St. Louis, U.S.A.

Diklofenaakki, joka on saatavilla yhtiöstä Heumann Pharma

Estradioli, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Progesteroni, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Triklosaani, joka on saatavilla yhtiöstä Ciba Geigy

Natriumfluoridi, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis

Tetrasykliinihydrokloridi, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Klindamysiinifosfaatti, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Metronidatsoli, joka on saatavilla yhtiöstä A/S Dumex, Kööpenhamina

Etanoli, joka on saatavilla yhtiöstä Danisco A/S, Tanska ja joka täyttää DLS-standardin vaatimukset (98,8 - 100 paino-% etanolia)

Propyleeniglykoli, joka on saatavilla yhtiöstä BASF Aktiengeselschaft, Saksa

Seesamiöljy, joka on saatavilla yhtiöstä Nomeco, Tanska

Soijaöljy, joka on saatavilla yhtiöstä Nomeco, Tanska

Polysorbat 20, joka on saatavilla yhtiöstä Nomeco, Tanska

Polysorbat 80, joka on saatavilla yhtiöstä Nomeco, Tanska

Glykofuroli, joka on saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Glyseroli, joka on saatavilla yhtiöstä Joli Handel ApS, Tanska

Lecithin Epicuron 200, joka on hankittu yhtiöstä Lucas Meyer tai lesitiini, joka on hankittu yhtiöstä Arhus Olie Fabrik

Bentsyylialkoholi, joka on saatavilla yhtiöstä Merck AG, Saksa

Vesi, puhdistettua tai tislattua vettä

Elyzol® hammasgeeli, joka on saatavilla yhtiöstä A/S Dumex

DEAE-dekstraani (mp. = 500 000), joka saatavilla yhtiöstä Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Natriumalginaatti (Sobalg FD 120), joka on saatavilla yhtiöstä Grindsted Products A/S, Tanska

Hydroksipropyylimetyyliselluloosa (Methocel K15MCR Premium USP), joka on saatavilla yhtiöstä Colorcon Limited, U.S.A.

Carbopol 934, joka on saatavilla yhtiöstä The BF Goodrich Company, U.S.A.

Menetelmät

Bioadheesion tutkimusjärjestelmät

1. Kaniinin tyhjänsuolen membraaneihin perustuva bioadheesion in vitro -tutkimusjärjestelmä

Seuraavaksi kuvattava bioadheesion tutkimusjärjestelmä on Ranga Rao'n & Burin [Int. J. Pharm. 52 (1989) 265 - 270] kuvaamasta menetelmästä modifioitu järjestelmä.

Koiraspuolisten albinokaniinien (3 - 4 kg, New Zealand White Rabbit SSC:CPH) annettiin olla ravinnotta 20 tuntia, minkä jälkeen ne tapettiin injektoimalla niihin pentobarbitaalinatriumia. Kaniinien suolet irrotettiin kirurgisesti ja ne pantiin huoneenlämpöiseen (noin 18 °C) isotoniseen 0,9-%:iseen natriumkloridiliuokseen. Tyhjätsuolet irrotettiin 30 minuutin kuluessa tästä ja ne pestiin 0,9-%:isella

natriumkloridiliuoksella. Suolten onteloita pestiin varovasti fysiologisella suolaliuoksella siihen asti kunnes ne saatiin puhtaiksi. Tyhjätsuolet leikattiin noin 8 - 9 cm:n pituisiksi paloiksi ja nämä pakastettiin (-20 °C) välittömästi. Tyhjiäsuolia varastoitiin ennen käyttöä korkeintaan 3 kk (suoritettaessa edempänä kuvattua tutkimusta havaittiin, että käyttämällä tuoretta juuri valmistettua tyhjääsuolta tai toisena vaihtoehtona korkeintaan 3 kk pakastettua tyhjääsuolta saatiin toistettavat ja merkitsevästi samanlaiset tulokset). Tyhjänsuolen segmentti sulatettiin varovasti ennen tutkimuksen aloittamista.

Tyhjänsuolen segmentti leikattiin pituussuuntaisesti. Se asetettiin ruostumattomasta teräksestä valmistettuun pidikkeeseen (2 cm:n läpimittainen putki, joka oli leikattu pituussuunnassa keskustan suhteen yhdensuuntaista akselia pitkin) siten, että limakalvokerros tuli päälle päin ja tyhjäsuoli pysyi levitettynä paikallaan pidikkeessä oman adhesiivisuutensa avulla. Pidike tyhjinesuolineen asetettiin noin -5°:sta noin -25°:seen olevassa kulmassa, kuten -7°:n tai -21°:n kulmassa (käytetystä kulmasta on esimerkeissä käytetty nimitystä "kulma") 37 °C:seen termostoituun sylinterimäiseen kammioon. Kammio on kuvattu kaaviona kuviossa 1. Termostoidun kammion suhteellinen kosteus pidettiin noin 100 %:ssa. Tyhjääsuolta huuhdeltiin sen tasapainottamiseksi puskurilla ja irtonaisen limakalvon huuhtelemiseksi pois sitten peristalttisen pumpun avulla mediumilla, joka sisälsi isotonista 0,02 M fosfaattipuskuriliuosta (pH 6,5, 37 °C), 2 tai 5 minuutin ajan (tätä on nimitetty tuonnempana "huuhteluajaksi kokeen alussa") näitä aikoja vastaavilla virtausnopeuksilla, jotka olivat 5 tai 10 ml/min (tätä on nimitetty tuonnempana "huuhtelunopeudeksi kokeen alussa"). Tarkasti punnittu määrä näytettä, josta bioadhesiiviset ominaisuudet oli määrä tutkia (noin 50 - 150 mg), levitettiin tasaisesti tyhjänsuolen limakalvon pinnalle (noin 0,8 x 6 cm). Noin 1 ml puskuriliuosta lisättiin varovasti pisaroittain levitetyn näytteen pinnalle tasaiseen tahtiin sen

varmistamiseksi, että tällainen nestekiderakenne saatiin muodostumaan, mikäli tällaisen muodostuminen oli mahdollista tapahtua (mono-oleiinin kyseessä ollessa voi nestekiderakenne olla kuutiollinen rakenne, heksagoninen rakenne, käänteinen heksagoninen rakenne, misellirakenne tai lamellirakenne). [Niissä tapauksissa, joissa tutkittavan näytteen viskositeetti on suhteellisen korkea tai silloin kun on tapahtunut saostumista, näyte sulatetaan varovasti lämpölevyllä tai GMO:n tai GML:n kyseessä ollessa lämpökaapissa korkeintaan 60 °C:n lämpötilassa ja jäähdytetään korkeintaan noin 40 °C:n lämpötilaan ennen näytteen levittämistä kaniinin tyhjänsuolen pinnalle]. Välittömästi tämän jälkeen segmentit jätettiin kammioon 5 - 20 minuutiksi, kuten esimerkiksi 10 minuutiksi, minkä johdosta näytteellä oli mahdollisuus päästä vuorovaikutukseen tyhjänsuolen glykoproteiinien kanssa ja minkä tarkoituksena oli estää liman kuivuminen. Segmenttejä huuhdeltiin 10 minuutin kuluttua tasaisella nopeudella isotonisella 0,02 M fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6,5, 37 °C) 15 - 60 minuutin, kuten esimerkiksi 30 minuutin, ajan käyttäen virtausnopeutena 5 - 15 ml minuutissa, kuten 10 ml minuutissa (tästä käytetään esimerkeissä nimitystä "virtaus"). Puskuriliuosta tuovan putken kärki sijoitettiin 3 - 4 mm tyhjänsuolen yläpuolelle sen varmistamiseksi, että neste virtasi tasaisesti limakalvon pinnalle. Pesuliuokset koottiin talteen dekantointilasiin. Tyhjänsuolen pinnalle jääneen bioadhesiivisen komponentin määrä laskettiin joko määrittämällä dekantointilasiin saadun näytteen määrä tai määrittämällä tyhjäänsuoleen jäljelle jääneen näytteen määrä sopivan analyysimenetelmän, esimerkiksi HPLC:n, avulla.

Kokeen päätyttyä tarkistettiin tyhjänsuolen pinnalle jäljelle jäänyt näyte atuloilla väärien positiivisten tulosten paljastamiseksi.

Kymmenestä suoritetusta kokeesta havaittiin 1 - 2 kokeessa vääriä negatiivisia tuloksia, jotka mahdollisesti johtuivat

kaniinin tyhjänsuolen pinnalla olevasta irtonaisesta limakalvokerroksesta.

Menetelmää tutkittaessa ja sen paikkansapitävyyttä osoitettaessa muuteltiin edellä esitettyjä parametrejä (esimerkiksi käytettyä kulmaa, virtausnopeutta, käytettyä määrää ja muita vastaavia parametrejä). Väärien negatiivisten ja väärien positiivisten tulosten poissulkemiseksi havaittiin tyydyttäviksi olosuhteet, jotka olivat:

Esihydraation kesto ennen näytteen lisäystä: 10 min
Lisätty näytemäärä: noin 50 - 150 mg (tutkimukset ovat osoittaneet, että kun levitetyn näytteen määrä vaihtelee noin 25 mg:sta noin 225 mg:aan ulottuvalla alueella, niin määrä ei vaikuta merkittävästi saataviin tuloksiin)
Kulma: -21°
Virtausnopeus: 10 ml/min
Virtauksen kesto: 30 minuuttia (havaittiin, että vähintään 10 minuutin mittainen virtauksen kesto tuottaa toistettavia tuloksia ja keston lisääminen noin 50 minuutiksi ei muuta tulosta merkittävästi)

Lisäksi havaittiin olevan edullista, että menetelmä antaa mahdollisuuden huuhdella tyhjänsuolen pinnalle levitettyä näytettä vesipitoisella mediumilla, mikä siten mahdollistaa nestekiderakenteen muodostumisen. Menetelmällä on myös mahdollista levittää nestemäisiä näytteitä ja rakeita.

<u>Tutkittavan näytteen bioadhesiivisuuden määrittäminen</u>

Niissä tapauksissa, joissa tutkittava näyte on rasvahappoesteri, niin rasvahappoesterin katsotaan olevan bioadhesiivinen, jos jäljelle jäänyt määrä on vähintään noin 60 paino-%, kuten vähintään noin 65 paino-%, noin 70 paino-%, noin 75 paino-%, noin 80 paino-%, noin 85 paino-%, 90 paino-% tai noin 95 paino-%.

Niissä tapauksissa, joissa tutkittava näyte on koostumus, joka sisältää rasvahappoesterin ja aktiivisen tai suojaavan aineen yhdistelmää, niin koostumuksen katsotaan olevan bioadhesiivinen, jos jäljelle jäänyt määrä (rasvahappoesterin tai aktiivisen/suojaavan aineen määrä) on vähintään noin 40 paino-%, kuten vähintään noin 45 paino-%, noin 50 paino-%, 55 paino-%, 60 paino-%, 65 paino-%, 70 paino-%, 75 paino-% tai 80 paino-%.

Tässä yhteydessä voidaan aineen bioadhesiivisten ominaisuuksien määritys myös suorittaa käyttämällä edellä olevaa tutkimusmenetelmää ja edellä olevia tutkimusolosuhteita, joita on kuitenkin modifioitu membraanin tyypin, tutkittavan näytteen levitetyn määrän, tutkimuksessa käytettävän kulman, virtausnopeuden, mediumin ja muiden vastaavien tekijöiden suhteen. Tämän keksinnön yhteydessä on suoritettu tutkimuksia niiden vaikutusten määrittämiseksi, joita eri membraaneilla on tutkimuksessa saataviin tuloksiin. Käyttäen edellä mainittuja tutkimusolosuhteita (kulma: -21°, virtausnopeus: 10 ml/min ja virtauksen kesto: 30 min) ja levittämällä GMO:ta membraanille, saatiin tulokset, jotka olivat:

Membraani paino-%	Bioadheesio Jäljellä oleva määrä %
Kaniinin tyhjäsuoli	90
Sian sykkyräsuoli	106*
Sian maha	106*
Sian poskiontelon limakalvo	88

* korkea tulos johtuu todennäköisimmin suolen tai mahan aiheuttamasta häiriöstä.

2. Bioadheesion tutkimusjärjestelmä in vitro -olosuhteissa tensiometriaa käyttäen

Seuraavaksi kuvattava bioadheesiotutkimusjärjestelmä on tutkijoiden Tobyn, M., Johnson J., & Gibson S. [artikkelissa

"Use of a TA.XT2 Texture Analyser in Mucoadhesive Research", International Labmate 1992, XVII (issue VI) 35 - 38], kuvaamasta menetelmästä modifioitu järjestelmä.

Tutkimusjärjestelmä sisältää sen, että määritetään se jännitysvoima, joka tarvitaan mallimembraanin ja tutkittavan näytteen (toisin sanoen näytteen, jonka bioadhesiivisia ominaisuuksia parhaillaan tutkitaan), välisen adhesiivisen sidoksen katkaisemiseen.

Seuraavassa tarkastelussa käytettävä tutkimuslaite on TA.XT2 Texture analyser (Stable Micro System Ltd., Haslemere, UK) (kuvio 2), joka on varustettu 5 kg:n kuormakammiolla ja joka on liitetty IBM PC -tietokoneeseen, jossa käytetään XT-RA dimension software -ohjelmistoa ja tämän DOS-versiota. Tutkimuksella kyetään määrittämään sen adheesiosidoksen lujuus, joka on muodostunut saattamalla mallimembraani, toisin sanoen tässä tapauksessa sian suolen segmentti, ja tutkittava näyte kosketukseen keskenään. Voidaan myös käyttää tämän laitteen suhteen analogista tutkimuslaitetta.

TA.XT2 Texture analyser -laite on varustettu laitteen koetinpäällä 1 (ks. kuvio 2), jota kyetään liikuttamaan pystysuuntaan muutettavissa olevalla nopeudella. Niin kutsutun tutkimuksen vetovaiheen aikana laitteen koetinpää saatetaan liikkumaan ylöspäin vakionopeudella irtoamiseen asti (tätä on tarkasteltu alla). Laite on lisäksi varustettu paikoillaan pysyvällä levyllä 2, johon ensimmäinen pidike 3 on asetettu. Ennen koetta ja sen aikana on mallimembraani 4 kiinnitettynä tähän pidikkeeseen esimerkiksi kiinnityslaipalla tai kaksipuolisella teipillä tai liimalla. Tutkittavana olevan pinta-alan suuruus voidaan määrittää koettimen pinta-alan perusteella (tämä on edullinen menettely tässä tapauksessa) tai tutkittavien näytteiden (esimerkiksi päällystetty peitinlasi) pinta-alan perusteella tai näytepäähän kiinnitetyn pidikkeen pinta-alan perusteella. Tutkittavan

pinta-alan tarkkaa suuruutta käytetään adheesiolujuuden laskemisessa (tätä on tarkasteltu edempänä).

Kuten edellä mainittiin, tutkimukseen sisältyy se, että siinä käytetään mallimembraania, joka on ensisijaisesti peräisin eläimestä. Membraani voisi olla esimerkiksi kaniinin, rotan tai sian mahalaukun limakalvo; kaniinin, rotan tai sian suolen segmentti, esimerkiksi kaniin tyhjänsuolen segmentti; kaniinin tai sian poskiontelon limakalvon segmentti; tai kaniinin, rotan tai sian suolien segmentti, josta limakalvokerros on poistettu ennen tutkimusta; tai eläimestä peräisin oleva iho (olennaisesti kaiken ihonalaisen rasvan poiston jälkeen); tai se voi olla keinotekoinen tai kaupallisesti saatavilla oleva mukiini.

Edempänä kuvatuissa tutkimuksissa käytettiin juuri teurastetuista sioista peräisin olevaa pohjukaissuolta, tyhjääsuolta ja sykkyräsuolen yläosaa. Suoli varastoitiin jäissä siihen asti, kunnes se pestiin 0,9 paino-%:isella natriumkloridiliuoksella, mikä tapahtui kahden tunnin kuluessa. Suolen onteloa huuhdeltiin varovasti fysiologisella suolaliuoksella siihen asti kunnes suolet olivat puhtaita. Suoli leikattiin 3 - 4 cm:n suuruisiksi kappaleiksi, jotka pakastettiin välittömästi (-20 °C). Suolia varastoitiin ennen käyttöä korkeintaan 2 kuukauden ajan. Ennen tutkimusta segmentit sulatettiin varovasti. Suolen segmentti avattiin suoliliepeen rajaa myöten. Herakalvokerros ja lihaskerros poistettiin vetämällä nämä irti atuloilla huolehtien samalla limakalvokerroksen säilymisestä ehyenä. Tästä oli tuloksena se, että alun perin poimuilla ollut limakalvopinta oikeni. Kudos tasapainotettiin ennen käyttöä tutkimukseen käytettävässä mediumissa noin 10 minuutin ajan, joka oli riittävän pituinen kudoksen lämpötilan tasapainottamiseksi ja sen pH-paperin avulla määritetyn pH:n tasapainottamiseksi.

Jos tulokset oli saatu käyttämällä useiden eri aineiden tai yhdistelmien bioadhesiivisten ominaisuuksien tutkimiseen

muuta membraania kuin jotakin edellä mainittua membraania, niin tuloksiin voitiin ottaa mukaan referenssiyhdisteestä saadut tulokset. Kuten edempänä on tarkasteltu, voidaan myös referenssinäyte tutkia rutiininomaisesti. Polykarbophil'in ja Carbopol 934:n havaittiin soveltuvan referenssiyhdisteeksi.

Tarkasti määritetty määrä tutkittavaa näytettä (noin 25 - 500 mg) levitetään tasaiseksi kerrokseksi joko

i) ensimmäiseen pidikkeeseen asetetun mallimembraanin ontelopuolelle,

ii) suoraan laitteen koetinpään pinnalle, mikäli tällainen oli tarpeellista, kiinnityslaipan, kaksipuolisen teipin tai liiman avulla, jota on levitetty laitteen näytepäähän ennen tutkittavan näytteen levittämistä,

iii) sellaisen peitinlasin pinnalle, joka asetetaan laitteen koetinpäähän siten, että tutkittava näyte suuntautuu alaspäin, tai

iv) sellaisen koettimen välityksellä, jota on modifioitu siten, että sen tekee mahdolliseksi levittää viskositeetiltaan suhteellisen pientä tai puolikiinteää näytettä; ja modifioitu koetin tekee mahdolliseksi myös tarvittavan vesipitoisen mediumin lisäämisen.

Niissä tapauksissa, joissa tutkittavaa näytettä ei ole mahdollista kiinnittää laitteen koettimeen, voidaan laitteessa käyttää toista pidikettä 5, johon toinen mallimembraani kiinnitetään. Tällaisissa tapauksissa ovat kahdessa pidikkeessä käytettävät mallimembraanit tavallisesti samantyyppiset. On myös mahdollista kiinnittää toinen mallimembraani suoraan laitteen koetinpäähän esimerkiksi käyttämällä kaksipuolista teippiä, liimaa tai kiinnityslaippaa.

Kudos (sian suolen limakalvo), jonka suuruus oli noin 3 x 3 cm, kiinnitettiin adheesiotutkimusta varten kudoksen pidikkeeseen 3 limakalvokerros ylöspäin. Ennen kudoksen asettamista paikoilleen pantiin heti kudoksen pidikkeen päälle sideharsokappale ja kudos asetettiin tämän päälle. Tämä varotoimenpide tehdään kosketusvoiman stabiloimiseksi. Kudoksen kostuttamiseksi ja näytteen hydraamiseksi lisättiin kudokseen noin 0,5 ml isotonista 0,05 M fosfaattipuskuria, jonka pH oli 6,0. Tällainen lisäys tekee myös mahdolliseksi kuutiollisen rakenteen muodostumisen. Laitteen koetin näytteineen (ks. alla) laskettiin alaspäin tutkimuksessa käytetyllä nopeudella 0,1 mm/s, jotta kudos ja näyte saataisiin tuotua kosketukseen vakiovoimalla. Kosketuspinta-ala oli näytteen valmistusmenetelmän mukaan joko 1,33 cm^2 (peitinlasi) tai 1,27 cm^2 (koetin). Kosketusvoimaksi asetettiin 0,2 N ja kosketuksessaoloaika oli 30 min. 30 minuutin kuluttua umpeen vedettiin koetinta irti nopeudella 0,1 mm/s (nopeus tutkimuksen jälkeen) 10 mm:n matkan. Esikokeet osoittivat, että tällä etäisyydellä päästiin hyvällä marginaalilla sen pisteen ohi, jossa näyte ja limakalvo erottuivat toisistaan koetinta irti vedettäessä.

Irrotusvoiman huippuarvo ja voima/aika-käyrän alla oleva pinta-ala laskettiin automaattisesti käyttäen XT-RA dimension -ohjelmistoa. Tuloksista laskettiin adheesiotyö (mJ cm^{-2}), jonka on sanottu olevan kaikkein tarkin mukoadheesiotehokkuutta ennustava tekijä.

Näytteen esikäsittely

Referenssinä käytettyjen polymeerien levitysmenetelmä:

Peitinlaseja, joiden läpimitta oli 13 mm (pinta-ala 1,33 cm^2), päällystettiin tutkittavilla polymeereillä pipetoimalla lasilevyjen keskelle 100 μl metanoliin tai veteen valmistettua 1 paino-%:ista liuosta. Kun näytteitä oli kuivattu 2 tuntia 60 °C:ssa lämpökaapissa, niin jäljelle jäi ohut polymeerikalvo. Yksi peitinlasi kiinnitettiin koetti-

meen (halkaisija 12,7 mm) päällystämättömän puolensa avulla kaksipuolisella teipillä.

Peitinlaseja ja limakalvoa käytettiin vain kerran (toisin sanoen yhteen määritykseen)

Rasvahappoesterikoostumusten levittäminen:
A. Kiinteä tai puolikiinteä koostumus sulatetaan (mikäli mahdollista) ja koetin kastetaan tähän (tätä menetelmää käytetään ainoastaan silloin kun sulatusmenetelmä ei muuta koostumuksen ominaisuuksia). Näyte (25 - 100 mg) levitettiin koettimeen tasaiseksi kerrokseksi kastamalla koetin sulatettuun GMO:hon. Näyte kiinteytyi huoneenlämmössä tai, mikäli tarpeellista, jäähdyttämällä.

B. 25 - 100 mg näytettä levitetään suoraan koettimen pinnalle.

C. Näyte kiinnitetään kiinnityslaipan, kaksipuolisen teipin tai liiman avulla

Tutkimusajot suoritettiin sen jälkeen kun kudos oli tasapainottunut vesipitoisessa mediumissa huoneenlämmössä 5 - 20 minuutin ajan. Tämän jälkeen kudos poistettiin vesipitoisesta mediumista ja kiinnitettiin tutkimuslaitteeseen, minkä jälkeen tutkimus suoritettiin.

Joissakin tapauksissa voi olla asiaankuuluvaa käyttää edellä olevan menetelmän muunnelmia esimerkiksi suorittamalla koe vesipitoisessa mediumissa tai suorittamalla koe huoneenlämmöstä poikkeavassa lämpötilassa, kuten 37 °C:ssa.

Tutkimuksessa käytettäviä parametrejä voidaan lisäksi vaihdella esimerkiksi seuraavasti:

Hydraatioaika:	0 - 20 min
Kosketuksessaoloaika:	60 s - 50 min
Kosketusvoima:	0,05 - 0,4 N
Tasapainotusmedium	
Tutkimuksessa käytetty nopeus:	0,02 - 1 mm/s
Nopeus tutkimuksen jälkeen:	0,02 - 1 mm/s

Tutkimuksen suorituslämpötilaa voidaan muuttaa käyttämällä sopivaa lämpötilaltaan säädettävää lämpökaappia, kuten esimerkiksi SMTC/04:ää, joka on saatavissa yhtiöstä Stable Microsystems, Haslemere, UK.

Tutkittavan näytteen bioadhesiivisten ominaisuuksien määrittäminen

Sen tutkimiseksi, onko tutkittava näyte bioadhesiivinen, suoritetaan kaksi tutkimusajoa:

1. Tutkimusajo käyttäen levitettyä tutkittavaa näytettä (tulos: adheesiotyö WA_S)

2. Tutkimusajo käyttäen tunnettua ja erinomaista bioadhesiivista näytettä (esimerkiksi polykarbofiilia) (tulos: adheesiotyö WA_R)

Kummassakin tapauksessa lasketaan adheesiotyö ja tutkittavan näytteen katsotaan olevan bioadhesiivinen, jos WA_S/WA_R x 100 % on vähintään 30 %, kuten 35 %, 40 %, 45 %, 50 % tai 55 %. Näyte luokitellaan tavallisesti heikosti bioadhesiiviseksi, jos tulos on alle noin 30 %, keskinkertaisesti bioadhesiiviseksi, jos tulos on noin 30 - 50 %, ja voimakkaasti bioadhesiiviseksi, jos tulos on vähintään 50 %.

Polycarbophil (Noveon™ AA-1, BF Goodrich, Hounslow, U.K.) on suhteelliselta moolimassaltaan suuri polyakryylihappokopolymeeri, joka on silloitettu höllästi divinyyliglykolilla. Tämä polymeeri toimii referenssinä tunnettujen erinomaisten

mukoadhesiivisten ominaisuuksiensa perusteella. Ennen edellä mainitussa tensiometrisessä tutkimuksessa suoritettavaa tutkimusta valmistetaan polykarbofiiligeeli yhdistämällä polykarbofiili veteen tai metanoliin (tulokseksi saatava konsentraatio noin 10 - 20 mg ml^{-1}) ja seoksen annetaan hydroitua huoneenlämmössä 24 tuntia. Polymeeriliuosta sekoitetaan aika ajoin. Tulokseksi saatua geeliä levitetään peitinlasille ja tämä tutkitaan edellä kuvatulla tavalla ja saatua tulosta käytetään erinomaisesti bioadhesiivisten aineiden referenssiarvona.

Samalla tavoin tutkitaan muita aineita, jotka ovat tunnettuja bioadhesiivisia aineita, kuten esimerkiksi kitosaania, traganttia, hydroksipropyylimetyyliselluloosaa (HPMC), natriumalginaattia, hydroksipropyyliselluloosaa (HPC), karaijakumia, karboksimetyyliselluloosaa (CMC), gelatiinia, pektiiniä, arabikumia, PEG 6000:tta, polyvinyylipyrrolidonia (povidone) tai DEAE-dekstraania (tämä on vähemmän bioadhesiivinen kuin polykarbofiili). Kun valitaan useita erilaisia bioadhesiivisuusasteita sisältäviä tutkittavia aineita, niin voidaan laatia arviointiasteikko ja tutkittavan näytteen tehokkuus bioadhesiivisuuden suhteen voidaan määrittää. Tässä keksinnössä ajatellaan, että seuraava asteikko on sovellettavissa, edellyttäen, että tällöin käytetään edellä esitettyjä tutkimusolosuhteita. On selvää, että jos tutkimusolosuhteita muutetaan, niin voi olla asiaankuuluvampaa käyttää jotakin muuta asteikkoa. Tällöin on sopivan asteikon perustuttava erinomaisesti bioadhesiiviselle polykarbofiilille ja heikosti bioadhesiiviselle materiaalille, kuten DEAE-dekstraanille, saatuihin arvoihin.

Bioadhesiiviset ominaisuudet	Adheesiotyö (mJ cm^{-2})
ei ollenkaan	alle 0,005
heikko	noin 0,005 - noin 0,012
kohtalainen	noin 0,012 - noin 0,020
hyvä	noin 0,020 - noin 0,04
erinomainen	yli 0,04

Tutkittaessa joitakin tunnettuja bioadhesiivisia yhdisteitä ja GMO:ta, saatiin kuuden kokeen keskiarvona ilmoitettuna tulokset, jotka olivat:

Tutkittava aine	Adheesiotyö (mJ cm^{-2})
DEAE-dekstraani	0,010
Natriumalginaatti	0,015
GMO/vesi, seossuhde paino-%;eina 85/15*	0,028
HPMC	0,036
Carbopol 934	0,031
GMO	0,047
Polycarbophil	0,060

*: lamellirakenne

3. Bioadheesion tutkimusjärjestelmä in vivo -olosuhteissa - huuhtoutuvuus iholta

Vesiliukoista väriainetta (Edicol Sunset Yellow, E 110, Amaranth E-123 tai Brilliant Blue E 131) ja/tai lipidiliukoista väriainetta (Waxoline violet A FW (Maximex), Colur flavus insolubilis, DAK 63 tai Edilake tartrazin NS) lisättiin tutkittavaan näytteeseen ja nämä yhdistettiin ja niistä muodostettiin homogeeninen seos. Niissä tapauksissa, joissa käytettiin vesiliukoista väriä, väri liuotettiin edullisesti vesipitoiseen mediumiin ennen yhdistämistä. Noin 0,05 - 0,5 g tulokseksi saatua seosta levitettiin yhtenäiseksi kerrokseksi noin 4 cm^2:n suuruiselle alueelle käden tai

ranteen ihoa. Tutkittavia näytteitä voitiin lisätä kuivalle iholle sekä kostutetulle iholle. Joissakin tapauksissa voitiin tutkittavaan levitettävään näytteeseen lisätä 5 minuuttia ennen kokeen suorittamista pieni määrä vettä. Iholla olevalle tutkittavalle näytteelle tehtiin välittömästi sen levittämisen jälkeen pesuja vedellä, joka tuli tiputuskärjestä (virtausnopeus vastasi noin 6 - 8 litraa minuutissa ja lämpötila oli noin 35 - 40 °C). Pesuja suoritettiin noin kolmen minuutin ajan. Tämän jälkeen arvioitiin missä määrin tutkittava näyte pysyy iholla. Arviointi suoritetaan visuaalisesti käyttämällä alueelta 1 - 5 olevaa asteikkoa, jossa 5 edustaa iholle levitetyn tutkittavan näytteen täydellistä pysymistä ja 1 edustaa sitä, että tutkittava näyte ei pysynyt iholla.

Tutkittava näyte määritetään tässä yhteydessä bioadhesiivisia ominaisuuksia sisältäväksi, jos edellä kuvatun tutkimuksen tulos on vähintään 4.

Edellä kuvattu tutkimus on osoittautunut olevan sopiva tutkittaessa koostumusten bioadhesiivisuutta sekä kyseessä olevien koostumusten viskositeetin ollessa suhteellisen suuri, mikä tekee vaikeaksi levittää näitä koostumuksia kaniinin tyhjäsuolimalliin.

<u>Viskositeetin määrittäminen</u>

Tutkittavan näytteen tai koostumuksen dynaaminen viskositeetti määritetään käyttäen RheoStress RS 100 Rheometer -laitetta, HAAKE (Saksa), joka on varustettu RS100 1.2 -ohjelmistopaketilla. Määritys suoritetaan 20 ± 0,5 °C:ssa tai vaihtoehtoisesti 37 ± 0,5 °C:ssa käyttäen olosuhteita, jotka ovat: koetin: levy (d = 20 mm), rako: 0,5 mm, leikkausnopeus: 120 sek^{-1}, aika: 300 s. Viskositeetit luetaan hetkellä t = 180 s.

<u>Glyseryylimono-oleaatin ja glyseryylimonolinoleaatin kvantitatiiviset määritykset HPLC:llä</u>

Glyseryylimono-oleaatti tai glyseryylimonolinoleaatti määritettiin kvantitatiivisesti korkean suorituskyvyn nestekromatografialla (HPLC) käyttäen Shimadzu LC-6A -HPLC-pumppua, Shimadzu SPD-6A -UV-detektoria, Shimadzu C-5A -integraattoria ja automaattista Shimadzu SIL-6B -näytteenottolaitetta.

Kolonni (25 cm x 4 mm i.d.) oli pakattu Supelcosil LC-18 DM:lla ja se eluoitiin isokraattisesti ympäristön lämpötilassa liikkuvalla faasilla, joka koostui seoksesta, jonka koostumus oli metanoli:vesi:asetaattipuskuri (pH 3,5) ja seossuhteet (840 : 120 : 40 paino-osaa). Joissakin tapauksissa voi kuitenkin esiintyä jostakin muusta aineesta peräisin olevaa häiriötä jolloin voi olla tarpeellista tehdä vähäisiä muutoksia eluaatin koostumukseen.

Kolonniin injektoidun näytteen suuruus oli 20 µl ja virtausnopeus oli 1,2 ml/ml. Kolonnin efluenttia seurattiin 214 nm:n kohdalta.

<u>Ennen limakalvon sisältämien glyseryylimono-oleaatin tai glyseryylimonolinoleaatin analysointia käytettävä uuttomenetelmä</u>

Kyseessä oleva limakalvo (tämä sisältää rasvahappoesteriä, esimerkiksi glyseryylimono-oleaattia) lisätään 50,00 ml:aan metanolia ja seosta ravistellaan kahden tunnin ajan. Seos suodatetaan 0,45 µm suodatinmembraanin (tämä on peräisin Millipore 16555Q:sta) läpi ja suodokselle suoritetaan HPLC-analyysi käyttäen edellä kuvattua menetelmää.

<u>Talteen saatava määrä</u>

Niissä tapauksissa, joissa analyysi suoritetaan bioadhesiivisuustutkimuksen nro 1 (edellä) yhteydessä kaniinin tyhjänsuolen segmentin pinnalla jäljellä olevan rasvahappoesterin (esimerkiksi glyseryylimono-oleaatin) määrän määrittämiseksi, otetaan jäljellä olevan määrän laskennassa huomioon asiaankuuluva korjaus talteen saadun määrän suh-

teen. Tämä korjaus saadaan selville sen perusteella, että tarkka määrä rasvahappoesteriä levitetään ensin kaniinin tyhjänsuolen segmentin pinnalle ja tämän jälkeen määritetään jäljelle jääneen rasvahappoesterin määrä (tämä tutkimus toistetaan 5 kertaa ja talteen saatu määrä esitetään keskiarvona).

Tutkittiin määrää, joka saatiin talteen noin 125 mg:sta kaniinin tyhjänsuolen pinnalle levitettyä GMO/etanoli-seosta, jonka seossuhde oli paino-%:eissa ilmoitettuna 60/40. Talteen saadun määrän havaittiin olevan noin 90 %. Talteen saatavaa määrää ei määritetty niistä muista GMO:n ja etanolin seoksen määristä, joiden seossuhde paino-%:eissa ilmoitettuna oli 60/40, eikä sitä määritetty niistä GMO- tai GML-formulaatioista, joihin oli lisätty lääkeaineita tai lisäaineita.

Esimerkit

Seuraavat esimerkit 1 - 13 liittyvät tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi tarkoitettujen bioadhesiivisten koostumusten tai bioadhesiivisten kantaja-aineiden valmistukseen.

Ellei toisin ole mainittu, ovat kaikki prosenttiosuudet painoprosentteja.

Kaikissa esimerkeissä glyseryylimono-oleaatti (tästä käytetään seuraavassa lyhennystä GMO) (ja asiaankuuluvissa tapauksissa nimitystä Dimodan® LS) sulatetaan varovasti lämpölevyllä tai lämpökaapissa ja saatu neste (sulatetun nesteen korkein lämpötila on noin 60 °C) jäähdytetään noin 40 °C:een ennen sen yhdistämistä muihin ainesosiin. Monoglyseridiseokset ja ainesosat yhdistettiin sekoittamalla tai ravistelemalla. Niissä tapauksissa, joissa koostumus sisältää aktiivista ainetta GMO/etanoli- tai GML/etanoli-kantaja-aineessa, käytettiin yhtä seuraavista menetelmistä:

1. Aktiivinen aine liuotettiin tai dispergoitiin etanoliin ja yhdistettiin sitten sulatettuun GMO:hon seosta samalla sekoittaen.

2. Aktiivinen aine liuotettiin tai dispergoitiin sulatettuun GMO:hon ja tämän jälkeen lisättiin etanolia seosta samalla sekoittaen

3. Aktiivinen aine liuotettiin tai dispergoitiin GMO:n ja etanolin seokseen.

Kun formulaatioita varastoitiin huoneenlämmössä (22 °C), niin jotkin niistä muuttuivat epähomogeenisiksi. Asiaankuuluvissa tapauksissa formulaatiot sulatettiin ja niitä sekoitettiin homogeenisen seoksen aikaansaamiseksi ennen käyttöä.

Niissä tapauksissa, joissa suoritetaan bioadheesiotutkimus, ovat esitetyt arvot 2 - 4 tutkimuksesta saatuja kesiarvoja. On pantava merkille, että esimerkeissä esitettyihin arvoihin ei ole tehty korjausta talteen saadun määrän suhteen, toisin sanoen nämä arvot ovat minimiarvoja. Jos tulokset korjataan talteen saadun määrän suhteen, niin nämä arvot suurenevat.

Seuraavissa esimerkeissä 1 - 13 tutkimusolosuhteet bioadhesiivisuustutkimuksen nro 1 suorittamiseksi olivat:

Kulma:	-7°
Huuhteluaika kokeen alussa:	2 minuuttia
Huuhtelunopeus kokeen alussa:	5 ml/min
Virtausnopeus:	5 ml/min
Virtausaika:	30 minuuttia

Seuraavissa esimerkeissä 14 - 21 bioadhesiivisuustutkimuksen nro 1 suorittamiseen käytetyt tutkimusolosuhteet olivat:

Kulma:	21°
Huuhteluaika kokeen alussa:	5 minuuttia
Huuhtelunopeus kokeen alussa:	10 ml/min
Virtausnopeus:	10 ml/min
Virtausaika:	30 minuuttia

Esimerkki 1

Aktiivisena aineena lidokaiinihydrokloridia sisältävän sumutettavan koostumuksen valmistus

Valmistettiin seuraavat koostumukset 1A ja 1B ainesosista, jotka olivat:

	1A	1B
GMO	48 g	57 g
Etanoli	32 g	38 g
Lidokaiinihydrokloridi	20 g	5 g

GMO yhdistettiin etanoliin ja lidokaiinihydrokloridi lisättiin seokseen sitä samalla sekoittaen.

Koostumuksesta tutkittiin bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 1. Tutkimuksen jälkeen havaittiin koostumusten 1A ja 1B jäljellä olevan määrän olevan noin 71 paino-% ja 84 paino-% GMO:ta.

Esimerkki 2

Sellaisen puolikiinteän (väritön geeli) koostumuksen valmistaminen, joka ei sisällä lainkaan aktiivista ainetta

Valmistettiin koostumus ainesosista, jotka olivat:

GMO	65 g
Vesi	35 g

GMO ja vesi yhdistettiin ravistelemalla. Saadun geelin nestekiderakenne on polaroitua valoa käyttäen saatujen todisteiden perusteella kuutiollinen.

Koostumuksesta tutkittiin bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 3 (huuhtoutuvuus). Yhdisteen saamien arvostelupisteiden havaittiin olevan 4 - 5, mikä viittaisi siihen, että koostumus oli bioadhesiivinen.

Esimerkki 3

Sellaisen puolikiinteän koostumuksen valmistaminen, joka ei sisältänyt aktiivista ainetta

Valmistettiin koostumus ainesosista, jotka olivat:

GMO	85 g
Vesi	15 g

GMO ja vesi yhdistettiin toisiinsa ravistellen, mikä johti polaroitua valoa käyttäen saatujen todisteiden perusteella GMO:n lamellirakenteen muodostumiseen.

Koostumuksesta tutkittiin bioadheesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 1. Tutkimuksen jälkeen havaittiin jäljellä olevan määrän olevan noin 84 paino-% GMO:ta.

Koostumuksesta tutkittiin myös bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 3 (huuhtoutuvuus). Tämän tuottaman pistemäärän havaittiin olevan 4, mikä viittaisi siihen, että koostumus on bioadhesiivinen.

Esimerkki 4

Vettä sisältävän sumutettavan koostumuksen valmistus

Valmistettiin koostumus ainesosista, jotka olivat:

GMO	50 g
Etanoli	40 g
Vesi	10 g

GMO lisättiin etanolin ja veden seokseen. Seosta ravisteltiin lopuksi voimakkaasti

Esimerkki 5

Sellaisen puolikiinteän koostumuksen (värittömän geelin) valmistaminen, joka ei sisällä aktiivista ainetta

Valmistettiin koostumus ainesosista, jotka olivat:

GMO	65 g
Glyseroli	35 g

GMO ja glyseroli yhdistettiin ravistelemalla.

Saadun geelin nestekiderakenne on polaroitua valoa käyttäen saatujen todisteiden perusteella kuutiollinen.

Koostumuksesta tutkittiin bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 3 (huuhtoutuvuus). Arvostelupisteitä havaittiin kertyvän 4 - 5, mikä viittaisi siihen, että tämä koostumus on bioadhesiivinen

Esimerkki 6

Sellaisen nestemäisen koostumuksen valmistaminen, joka ei sisällä aktiivista ainetta

Valmistettiin koostumus ainesosista, jotka olivat:

GMO	50 g
Etanoli	30 g
Glyseroli	20 g

GMO yhdistettiin etanoliin ja glyseroli lisättiin tulokseksi saatuun seokseen sitä samalla sekoittaen.

Koostumuksesta tutkittiin bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 1. Tutkimuksen jälkeen havaittiin jäljellä olevaksi määräksi noin 81 paino-% GMO:ta.

Esimerkki 7

Sellaisen nestemäisen koostumuksen valmistus, joka ei sisällä aktiivista ainetta

Valmistettiin koostumus ainesosista, jotka olivat:

GMO	60 g
Etanoli	30 g
Bentsyylialkoholi	10 g

GMO yhdistettiin etanoliin ja bentsyylialkoholi lisättiin tulokseksi saatuun seokseen tätä samalla sekoittaen.

Koostumuksesta tutkittiin bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 1. Tutkimuksen jälkeen havaittiin jäljellä olevaksi määräksi noin 87 paino-% GMO:ta.

Esimerkki 8

Sellaisen puolikiinteän koostumuksen valmistaminen, joka ei sisällä aktiivista ainetta

Valmistettiin koostumus ainesosista, jotka olivat:

Dimodan® LS	65 g
Vesi	35 g

Vettä lisättiin Dimodan® LS:ään seosta samalla voimakkaasti sekoittaen.

Koostumuksesta tutkittiin bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 3 (huuhtoutuvuus). Arviointipisteiden havaittiin olevan 4 - 5, mikä viittasi siihen, että koostumus on bioadhesiivinen.

Esimerkki 9

Sellaisen sumutettavan koostumuksen valmistaminen, joka ei sisällä aktiivista ainetta

Valmistettiin koostumus ainesosista, jotka olivat:

Dimodan® LS	60 g
Etanoli	40 g

Etanoli lisättiin Dimodan LS:ään ja seosta sekoitettiin.

Koostumuksesta tutkittiin bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 1. Tutkimuksen jälkeen havaittiin jäljellä olevan GMO-määrän olevan noin 95 paino-%.

Esimerkki 10

GMO:ta sisältävien rakeiden (nämä vastaavat 11 paino-% GMO:ta) valmistus

Tehoton ydin, jonka partikkelikoko oli noin 100 - 200 µm, päällystettiin kahdella eri kalvoa muodostavalla materiaalilla. Sisimmäinen päällystys oli Surelease (Colorcon), joka on vesipitoinen kolloidisen etyyliselluloosan ja pehmittimen dispersio. Ulommainen päällyste oli GMO:ta, jota levitettiin etanoliin valmistettuna 80-%:isena liuoksena.

Koostumuksesta tutkittiin bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 1. Lisätty määrä oli 55 mg rakeita. Tutkimuksen jälkeen havaittiin GMO:n jäljellä olevaksi määräksi noin 72 paino-%.

Esimerkki 11

GMO:ta sisältävien rakeiden (nämä vastaavat 18 paino-% GMO:ta) valmistus

Tehoton ydin, jonka partikkelikoko oli noin 100 - 200 µm, päällystettiin kahdella eri kalvoa muodostavalla materiaalilla. Sisimmäinen päällyste oli Surelease (Colorcon), joka on kolloidisen etyyliselluloosan ja pehmittimen vesipitoinen dispersio. Ulommainen päällyste oli GMO:ta, jota levitettiin etanoliin valmistettuna 80-%:isena liuoksena.

Koostumuksesta tutkittiin bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 1. Lisätty määrä oli 55 mg rakeita. Tutkimuksen jälkeen havaittiin GMO:n jäljellä olevaksi määräksi noin 68 paino-%.

Esimerkki 12

Sellaisen sumutettavan koostumuksen valmistus, joka ei sisällä aktiivista ainetta

Valmistettiin koostumus ainesosista, jotka olivat:

GMO	60 g
Etanoli	40 g

Etanoli lisättiin GMO:hon ja seosta sekoitettiin.

Koostumuksesta tutkittiin bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 1. Jäljellä olevan GMO:n määrän havaittiin tutkimuksen jälkeen olevan noin 81 paino-%.

Esimerkki 13

Sellaisen sumutettavan koostumuksen valmistus, joka ei sisällä aktiivista ainetta

Valmistettiin koostumus ainesosista, jotka olivat:

GMO	60 g
Etanoli	40 g

Etanoli lisättiin GMO:hon ja seosta sekoitettiin.

Koostumuksesta tutkittiin bioadhesiivisuus tutkimusjärjestelmässä nro 1. Tutkimusjärjestelmää modifioitiin siinä mielessä, että käytettiin sellaista kaniinin tyhjänsuolen segmenttiä, josta limakalvokerros oli poistettu. Jäljelle jääneen GMO-määrän havaittiin tutkimuksen jälkeen olevan noin 82 paino-%.

Esimerkki 14

Bioadhesiivisuuteen kohdistuvan aktiivisen aineen konsentraation vaikutuksen tutkiminen

Valmistettiin koostumuksia lisäämällä eri mikonatsolimääriä GMO:n ja etanolin liuokseen, jonka seossuhde paino-%:eina oli 60/40, tai GML:n ja etanolin liuokseen, jonka seossuhde

paino-%:eina oli 60/40, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna. Bioadhesiivisuutta koskevat tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa tutkimusjärjestelmässä nro 1 suoritetun koostumusten tutkimisen jälkeen.

Mikonatsolin konsentraatio (paino-%)	Bioadheesio (jäljellä oleva määrä %)			
	GMO:hon perustuva		GML:ään perustuva	
	I*	II**	I*	II**
0		85	96	95
2	88		98	
3	87			
4	87	72	84	86
5	89			41
6	61	72	88	
8	21	33	90	
10			30	4
15	12		12	
25	1			

I*: Kokeet suoritettiin käyttäen seuraavia koeolosuhteita: huuhteluaika kokeen alussa: 2 min, huuhtelun virtausnopeus kokeen alussa: 5 ml/min, kulma -7°, virtausnopeus: 5 ml/min, virtausaika 30 min.

II*: Kokeet suoritettiin käyttäen seuraavia koeolosuhteita: huuteluaika kokeen alussa: 5 min, huuhtelun virtausnopeus kokeen alussa: 10 ml/min, kulma: -21°, virtausnopeus: 10 ml/min, virtausaika: 30 min.

Tulokset osoittavat, että mikonatsolia korkeintaan noin 6 - 8 paino-%:isissa konsentraatioissa sisältävät koostumukset ovat bioadhesiivisia. Koostumuksessa käytetty suuri lääkeainekonsentraatio näyttää vaikuttavan bioadhesiivisuuteen negatiiviseen suuntaan.

Monissa tapauksissa on havaittu, että aktiivinen aine liukenee kuutiolliseen rakenteeseen. Kun aktiivisen aineen liu-

koisuus kuutiolliseen rakenteeseen ylittyy, niin kuutiollisen muodon kiderakenne häiriintyy ja voi muodostua toinen nestekiderakenne. Edellä esitetyt tulokset viittaavat siihen, että GMO:n ja GML:n kuutiollinen rakenne on eniten bioadhesiivinen kiderakenne in situ - olosuhteissa muodostuneena.

Esimerkki 15

Sellaisen bioadhesiivisen koostumuksen valmistus, joka sisältää aktiivisena aineena metoklopramidia

Valmistettiin koostumuksia, jotka sisälsivät useita eri konsentraatioita metoklopramidia, lisäämällä asiaankuuluva määrä metoklopramidia GMO:n ja etanolin liuoksen, jonka seossuhde paino-%:eina oli 60/40, ja sekoittamalla seosta tämän jälkeen. Koostumuksista tutkittiin niiden bioadhesiiviset ominaisuudet tutkimalla ne tutkimusjärjestelmässä nro 1. Tulokset on kuvattu alla:

Metoklopramidin konsentraatio paino-%	Bioadheesio (jäljellä oleva määrä %)
1	81
3	77
5	70

Tulokset osoittavat, että koostumukset, jotka perustuvat GMO:n ja etanolin seokseen, jonka seossuhde on paino-%:eina 60/40 paino-%, ja jotka sisältävät vähintään 5 paino-% metoklopramidia, ovat bioadhesiivisia.

Esimerkki 16

Isosorbididinitraattia sisältävien bioadhesiivisten koostumusten valmistaminen

Koostumukset valmistettiin pääasiassa edellä esimerkissä 15 kuvatulla tavalla lukuunottamatta sitä, että metoklopramidin sijaan käytettiin isosorbididinitraattia. Isosorbididinitraattia on kuitenkin saatavilla ainoastaan laktoosiin sekoitettuna. Tästä syystä koostumuksen valmistaminen sisäl-

si sen, että etanoliin niukkaliukoinen laktoosi suodatettiin isosorbididinitraatti/laktoosi-seoksen ja etanolin seoksesta (isosorbididinitraatti liukenee rajoituksetta etanoliin). Kun laktoosi oli erotettu suodattamalla, seokseen lisättiin sulatettua GMO:ta sitä samalla sekoittaen.

Koostumuksen bioadhesiivisuustulokset tutkimusjärjestelmää nro 1 käyttäen on esitetty alla ja ne antoivat samanlaisen kuvan kuin esimerkissä 15 saatu tulos, nimittäin sen, että bioadhesiiviseen seokseen (esimerkiksi GMO:n ja etanolin seokseen) perustuvat koostumukset säilyttävät bioadhesiivisuutensa jopa silloinkin, kun lääkeainetta, kuten esimerkiksi isosorbididinitraattia, lisätään seokseen vähintään 5 paino-%:iseen konsentraatioon.

Isosorbidi-dinitraatin konsentraatio paino-%	Bioadheesio Jäljellä oleva määrä %
2	85
5	88

Esimerkki 17

Bioadhesiivisiin kantaja-aineisiin perustuvien ja aktiivista lääkeainetta sisältävien koostumusten tutkiminen

Yleistä menetelmää käyttäen valmistettiin koostumuksia, jotka sisälsivät useita eri konsentraatioita erilaisia aktiivisia lääkeaineita. Valmistetut koostumukset perustuvat GMO:n ja etanolin seoksiin konsentraatioissa, jotka ovat osoittautuneet olevan itsessään bioadhesiivisia. Aktiivista lääkeainetta sisältävistä koostumuksista tutkittiin bioadhesiivisuus käyttäen tutkimusjärjestelmää nro 1. Tulokset on esitetty alla:

Koostumus paino-%	Bioadheesio Jäljellä oleva määrä %
GMO/etanoli/nikotiini:	
59,7/39,8/0,5	87
59,4/39,6/1	89
58,8/39,2/2	92
GMO/etanoli/vesi/nikotiini	
49/39,2/9,8/2	83
GMO/etanoli/dikloorifenaakki:	
58,8/39,2/2	74
57/38/5	11
54/36/10	0
GMO/etanoli/lidokaiini HCl/lidokaiiniemäs:	
57/38/5/0	83
54/36/10/0	61
57/38/0/5	89
54/36/0/10	21
57/38,2/2,5/2,5	84
54/36/5/5	78
GMO/etanoli/burprenorfiini:	
59,4/39/6/1	85
58,8/39,2/2	71
GMO/etanoli/estradioli:	
59,4/39,6/1	87*
58,2/38,8/3	77
GMO/etanoli/progesteroni:	
59,4/39,6/1	104
58,2/38,8/3	103
57/38/5	98
GMO/etanoli/indometasiini:	

Koostumus paino-%	Bioadheesio Jäljellä oleva määrä %
58,2/38,8/2	91
57/38/5	98
54/36/10	25
GMO/etanoli/nifedipiini:	
58,2/38,8/2	94
GMO/etanoli/triklosaani:	
59,4/39,6/1	101
58,2/38,8/3	109
57/38/5	105
GMO/asykloviiri**:	
98/2	108
95/5	108
GMO/etanoli/isosorbidimononitraatti:	
58,8/39,2/2	84
57/38/5	81
54/36/10	32
GMO/natriumfluoridi**:	
98/2	87
95/5	76
GMO/proklorperatsiini**:	
98/2	78
95/5	90

*talteen saadun määrän määritettiin olevan 79 %

** koostumukset olivat suspensioita

Tulokset osoittavat, että kaikkien tutkittujen koostumusten ominaisuudet olivat bioadhesiiviset, mikä viittaa siihen, ettei millään käytetyistä aktiivisista aineista ole mainituissa konsentraatioissa negatiivista vaikutusta käytetyn kantaja-aineen bioadhesiivisuuteen (lukuun ottamatta iso-

sorbidimononitraattia ja dikloorifenaakkia suhteellisen suurissa konsentraatioissa). Tämä havainto viittaa siihen, että aktiiviset aineet, jotka oli tutkittu edellä esitetyissä konsentraatioissa, eivät vaikuta merkittävästi nestekiderakenteen (todennäköisimmin kuutiollisen rakenteen) muodostumiseen in situ -olosuhteissa. Yleinen työhypoteesi on, että bioadheesion muodostuminen limakalvon pinnan ja bioadhesiivisia ominaisuuksia sisältävän rasvahappoesteristä koostuvan koostumuksen välille on riippuvainen nestekiderakenteen muodostumisesta in situ -olosuhteissa sen jälkeen kun koostumusta on käsitelty in situ -olosuhteissa vesipitoisella mediumilla. Bioadheesion muodostuminen johtuu todennäköisimmin kuutiollisen rakenteen muodostumisesta in situ -olosuhteissa. Tästä syystä useat tekijät, kuten esimerkiksi aktiivisen aineen tyyppi ja rakenne, aktiivisen aineen fysikokemialliset ominaisuudet ja aktiivisen aineen konsentraatio kyseessä olevassa koostumuksessa, voivat tästä syystä vaikuttaa koostumuksen bioadhesiivisuuteen. Jos aktiivisen aineen konsentraatio nostetaan liian suureksi, niin tällä voi olla negatiivinen vaikutus koostumuksen bioadhesiivisen nestekiderakenteen muodostumiskykyyn.

Esimerkki 18

Tutkimus, joka koskee eri lisäaineiden tai liuottimien vaikutusta GMO:hon tai GML:ään perustuvien koostumusten bioadhesiivisuuteen

Tutkittiin useiden eri lisäaineiden ja liuottimien vaikutusta. Useat eri koostumukset valmistettiin edellä kuvatulla tavalla ja bioadhesiivisuus tutkittiin käyttäen tutkimusjärjestelmää nro 1. Saatiin seuraavat tulokset:

Koostumus, paino-%	Bioadheesio Jäljellä oleva määrä %
GMO[a]	90
GML[a]	65*
GMO/GML[a] 40/60***	56*
Seokset liuottimien kanssa:	
GMO/vesi 85/15[b]	94
GML/etanoli 60/40	95**
GMO/etanoli/propyleeniglykoli/vesi:	
45/30/10/15	93
Seokset solubilisointiaineiden tai säilyteaineiden kanssa	
GMO/etanoli/bentsyylialkoholi:	
60/30/10	87**
GMO/etanoli/bentsyylialkoholi/vesi:	
60/20/5/15	80
50/20/10/20	89
Seokset lääkeaineen vapautumista muuttavien aineiden kanssa	
GMO/etanoli/glyseroli:	
50/30/20	97
GMO/etanoli/seesamiöljy:	
59/40/1	96
58/40/2	93
50/40/10	14
50/30/20	0**
GMO/etanoli/soijaöljy:	
59/40/1	98
58/40/2	93
50/40/10	22
40/20/40	0**
GMO/etanoli/lesitiini:	

Koostumus, paino-%	Bioadheesio Jäljellä oleva määrä %
55/40/5	99
45/40/15	97

[a] sulatettu varovasti ennen levittämistä

[b] lamellirakenne

* tulokset ovat matalampia kuin odotettua; tämä johtuu todennäköisesti seoksen analyysissä käytetyistä referenssiarvoista

** tutkimusolosuhteet samanlaiset kuin esimerkeissä 1 - 13

*** GMO/GML-seos vastaa suunnilleen yhtä suuria määriä glyserolimono-oleaattia ja glyserolimonolinoleaattia

Edellä esitetyt tulokset osoittavat, että kun seokseen lisätään sopivia lisäaineita tai liuottimia, kuten esimerkiksi aineita, jotka ovat aktiivisten aineiden tunnettuja solubilisointiaineita tai aineita, joiden tiedetään olevan vapautumista muuttava aine (toisin sanoen aineita, jotka seokseen lisättynä tekevät mahdolliseksi säätää tai säännöstellä aktiivisen aineen vapautumista koostumuksesta), niin nämä eivät vaikuta merkittävästi koostumuksen bioadhesiivisuuteen silloin kun aineita (lisäaineita tai liuottimia) lisätään suhteellisen pieninä konsentraatioina (alle noin 10 paino-%). Siten aktiivisen aineen vapautumista koostumuksesta, jonka on osoitettu sisältävän bioadhesiivisia ominaisuuksia, voidaan säännöstellä säätämällä vapautumista muuttavan aineen, kuten esim glyserolin, seesamiöljyn, soijaöljyn, lesitiinin, kolesterolin ja muiden näitä vastaavien aineiden) määrää. Lisäksi aktiivisen aineen tai bioadhesiivisessa koostumuksessa käytettäväksi tarkoitetun rasvahappoesterin solubilisoituminen voidaan tarvittaessa lisäksi saada aikaan käyttämällä esimerkiksi bentsyylialkoholia vaikuttamatta merkittävästi koostumuksen bioadhesiivisiin ominaisuuksiin. Yhteenvetona on todettavissa, että tämän keksinnön mukaisilla bioadhesiivisilla periaatteilla on erittäin suuri potentiaali sellaisten bioadhesiivisten

lääkeainekoostumusten kehittämisen suhteen, joilla on sellainen lääkeaineen paikantumismahdollisuus, sellainen lääkeaineen vapautumisprofiili ja sellainen vaikutuksen kesto, joka on haluttua tai välttämätöntä tietyissä olosuhteissa. Siten tässä keksinnössä on löydetty hyvin joustava periaate bioadhesiivisen lääkeaineiden vapautumisjärjestelmän aikaansaamiseksi.

Esimerkki 19

Tutkimus, joka koskee aktiivisen aineen esiintymistä GMO:n nestekiderakenteessa

Tämä tutkimus suoritettiin sen tutkimiseksi, johtaako aktiivisen aineen lisääminen sellaiseen kantaja-aineeseen, joka kykenee muodostamaan nestekiderakenteen, myös siihen, että aktiivinen aine liittyy nestekiderakenteeseen.

Tämä tutkimus suoritettiin lisäksi sen tutkimiseksi, kuinka paljon lisättyä näytettä saadaan talteen.

Kaniinin tyhjäänsuoleen perustuvaan bioadhesiivisuuden tutkimusmalliin (tutkimusjärjestelmään nro 1) levitettiin lipofiilistä aktiivista ainetta (mikonatsoli) ja hydrofiilistä aktiivista ainetta (lidokaiinihydrokloridi). Käytettiin kantaja-ainetta, joka sisälsi GMO:n ja etanolin seosta, jonka seossuhde paino-%:eissa oli 60/40 ja joka sisälsi 2 paino-% joko mikonatsolia tai lidokaiinihydrokloridia. GMO/etanoli-kantaja-aine on itsessään bioadhesiivinen. Kun virtauksen on annettu jatkua 10 sekuntia (tämä vastaa hetkeä t = 0), niin lisätty näyte poistetaan ja siitä tutkitaan lisätyn aktiivisen aineen pitoisuus. Koe toistettiin levittämällä sama määrä koostumusta, joka sisälsi GMO:n, etanolin ja aktiivisen aineen seosta, mutta tällä kerralla virtauksen annettiin jatkua 30 minuuttia tavanomaiseen tapaan (kokeen loppuun asti).

Kuten edellä mainittiin, näytteestä analysoitiin mikonatsolipitoisuus ja lidokaiinihydrokloridipitoisuus, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna. Käytettiin seuraavia määrityksiä:

Lidokaiini-HCl

Lidokaiini-HCl:n pitoisuus määritettiin HPLC-menetelmällä.

T: Liuotetaan formulaatio 30 ml:aan metanolia ja siirretään se kvantitatiivisesti 50 ml:n mittapulloon. Pulloon lisätään metanolia siten, että tilavuudeksi saadaan 50,00 ml.

R: Punnitaan 100,00 mg lidokaiini-HCl:aa 100 ml:n mittapulloon. Laimennetaan 1000 µl 50,00 ml:ksi liikkuvalla faasilla.

T ja R analysoidaan sopivalla nestekromatografilla, joka on varustettu UV-detektorilla ja integraattorilla.

Kolonni: Teräskolonni, pituus 25 cm x 4,6 mm, i.d.
Stationaarinen faasi: Nucleosil C-18, 10 µm
Liikkuva faasi: metanoli R: etikkahappo : trietyyliamiini : vesi (50 : 1,5 : 0,5 : 48)
Virtausnopeus: 1,5 ml/min
Lämpötila: huoneenlämpö
Havaitseminen: 254 nm
Injektio: 20 µl:n silmukka
Retentioaika: Lidokaiini-HCl: noin 3 min
Laskutoimitukset:

$$\text{Talteen saatu lidokaiini-HCl:n määrä, \%: } \frac{A_T \times n(g)}{A_R \times x\ m(g) \times \%\ \text{lidokaiini-HCl}} \times 100\ \%$$

jossa
A_T on tutkittavan liuoksen T pinta-ala;
A_R on standardiliuoksen R pinta-ala;
n on punnittu standardimäärä (g);
m on suolen pinnalle levitetyn formulaation määrä (g);
% lidokaiini-HCl on lidokaiini-HCl:n pitoisuus formulaatiossa paino-%:eina ilmoitettuna.

Mikonatsoli

Mikonatsolipitoisuus määritetään myös HPLC-menetelmällä.

T: Liuotetaan formulaatio 30 ml:aan metanolia ja siirretään se kvantitatiivisesti 50 ml:n mittapulloon. Pulloon lisätään sellainen määrä metanolia, että tilavuudeksi saadaan 50,00 ml.

R: Punnitaan 100,00 mg mikonatsolia 100 ml mittapulloon. 1000 µl laimennetaan 50,00 ml:ksi liikkuvalla faasilla.

T ja R analysoidaan sopivassa nestekromatografissa, joka on varustettu UV-detektorilla ja integraattorilla.

Kolonni: Teräskolonni, pituus 25 cm x 4,6 mm, i.d.
Stationaarinen faasi: Spherisorb, ODS 1, S5
Liikkuva faasi: metanoli R: puskuri (85 : 15)
Virtausnopeus: 1,0 ml/min
Lämpötila: 70 °C
Havaitseminen: 230 nm
Injektio: 20 µl:n silmukka
Retentioaika: Mikonatsoli noin 8 min
Puskuri: 0,05 M $NH_4H_2PO_4$ (5,75 g 1000 ml:ssa H_2O:ta)
Laskutoimitukset:

$$\text{Talteen saatu mikonatsolin määrä, \%: } \frac{A_T \times n(g)}{A_R \times x\ m(g) \times \%\ \text{mikonatsoli}} \times 100\ \%$$

jossa:
A_T on tutkittavan liuoksen T pinta-ala;
A_R on standardiliuoksen R pinta-ala;
n on punnittu standardimäärä (g);
m on suolen pinnalle levitetyn formulaation määrä (g);
% mikonatsoli on mikonatsolin pitoisuus formulaatiossa paino-%:eina ilmoitettuna.

Saadut tulokset on esitetty alla. Kummankin lisätyn formulaation havaittiin muissa kokeissa olevan bioadhesiivisen tutkimalla GMO:n jäljellä oleva määrä. Kuitenkin kun formulaatiot poistetaan kaniinin tyhjästäsuolesta, on vaarana irrottaa jonkin verran lisättyä aktiivista ainetta ja alla esitettyjen tulosten on tästä syystä katsottava olevan minimiarvoja.

Koostumus	Virtaus-aika	Aktiivisen ai-neen talteen saatu määrä % kahden määrityksen keskiarvo
GMO/etanoli/mikonatsoli: 58,8/39,2/2	10 s	85
	30 min	93
GMO/etanoli/lidokaiini HCl: 58,8/39,2/2	10 s	37
	30 min	7

Tulokset osoittavat, että lipofiilisen aineen, mikonatsolin, talteen saatu määrä on virtauseaikaan katsomatta miltei 100 %. Tämä viittaa siihen, että mikonatsoli menee siihen nestekiderakenteeseen tai joutuu sen nestekiderakenteen ympäröimäksi, joka on muodostunut levittämällä formulaatiota kaniinin tyhjäänsuoleen ja tämän jälkeen käsittelemällä formulaatiota vesipitoisella mediumilla. Lisäksi voidaan havaita, että mikonatsolia vapautuu ainoastaan hyvin hitaas-

ti in situ -olosuhteissa muodostuneesta nestekiderakenteesta.

Lidokaiinihydrokloridi on hydrofiilinen aine. Noin 50 % aktiivisen aineen levitetystä määrästä vapautuu kaniinin tyhjänsuolen hydratoinnin alkuvaiheen jälkeen (10 min) [toisin sanoen ajankohdalla t = 0] ja lidokaiinihydrokloridi on vapautunut miltei kokonaan 30 minuutin virtausajan jälkeen. Lidokaiinihydrokloridin pieni talteen saatu määrä johtuu kuitenkin todennäköisimmin siitä seikasta, että aktiivinen aine liukenee rajoituksetta veteen. Lidokaiinihydrokloridi menee siten todennäköisimmin tässäkin tapauksessa siihen nestekiderakenteeseen tai jää sen nestekiderakenteen ympäröimäksi, joka on muodostunut formulaation levittämisen jälkeen, mutta lidokaiinihydrokloridin vesiliukoisuus on niin suuri, että se liukenee nopeasti ja vapautuu nestekiderakenteesta.

Johtopäätöksenä on todettava, että edellä raportoidut kokeet osoittavat, että formulaatiot, joissa GMO ja aktiivinen aine liuotetaan etanoliin, toimivat prekursorina aktiivista ainetta sisältävän nestekiderakenteen muodostumiselle in situ -olosuhteissa, toisin sanoen nämä formulaatiot tulevat bioadhesiivisiksi in situ -olosuhteissa.

Esimerkki 20

GMO:ta sisältävien koostumusten kiderakenteen muutokset

Sellaisen koostumuksen aikaansaamisen kyseessä ollessa, joka on bioadhesiivinen in situ -olosuhteissa sen jälkeen kun koostumusta on levitetty iholle tai limakalvolle, on nykyinen työhypoteesi se, että lupaavia bioadhesiivisia koostumuksia, jotka sisältävät bioadhesiivista rasvahappoesteriä, ovat ne, jotka kykenevät toimimaan prekursorina nestekiderakenteen muodostumiselle in situ -olosuhteissa, toisin sanoen koostumusten on kyettävä muodostamaan nestekiderakenne sen jälkeen kun koostumusta on käsitelty vesipitoisessa ympäristössä tai se on saatettu kosketukseen

vesipitoisen ympäristön kanssa levityskohdalla. Bioadheesioilmiö johtuu todennäköisimmin juuri rasvahappojen kuutiollisen rakenteen muodostumisesta in situ -olosuhteissa.

Seuraavissa kappaleissa kuvataan kokeita, joiden avulla on mahdollista määrittää tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi tarkoitettujen sopivien koostumusten kiderakenne. Näiden tutkimusten avulla on mahdollista määrittää esimerkiksi GMO lamellirakenteesta, heksagonisesta rakenteesta tai kuutiollisesta rakenteesta ja on mahdollista tutkia koostumukset ennen niiden levittämistä asiaankuuluvaan levityskohtaan ja tämän jälkeen. GMO:ssa tai muissa glyserolirasvahappoestereissä esiintyvien useiden eri nestekiderakenteiden esiintymisen kyseessä ollessa ovat erinomaiset katsaukset esittäneet Ericsson, et al. julkaisussa ACS Symp. Ser. (1991), pp 251 - 265, American Chemical Society, ja Larsson, luku 8 (osa 8.2.1, jonka otsikko on "Lamellar and hexagonal liquid-crystalline phases") teoksessa The Lipids Handbook, toim. Gunstone, et al. Lyhyesti mainittuna lamellirakenne on vallitseva rakenne suhteellisen pienessä vesipitoisuudessa (alle 20 paino-%) ja noin 37 °C:n lämpötilassa, kun taas kuutiollinen rakenne on vallitsevana vesipitoisuuden noustessa (yli noin 20 paino-%).

A. GMO-koostumusten kiderakenteiden muutos määritettynä differentiaalipyyhkäisykalorimetrialla (DSC).

DSC -määritykset suoritettiin käyttäen Perkin Elmer Unix DSC-model 7 -differentiaalipyyhkäisykalorimetria. Lämmitysnopeus oli 5 °C/min ja pyyhkäisylämpötila oli 15 °C:sta 60 °C:een. Näytteet oli asetettu suljettuihin alumiinista valmistettuihin näyteastioihin (Perkin Elmer No. B014-3017) ja referenssinä käytettiin tyhjiä alumiinista valmistettuja näyteastioita. Rakennemuutokset saivat aikaan vain hyvin pieniä entalpiamuutoksia, mistä syystä tutkittavan näytteen määrä optimoitiin noin 30 mg:ksi.

Tutkittiin seuraavat koostumukset:

1. GMO/vesi, seossuhde paino-%:eina 85/15
2. GMO/vesi/lidokaiiniemäs/lidokaiini HCl, seossuhteet paino-%:eina 62/33/1,7/3,3
3. GMO/vesi/lidokaiiniemäs/lidokaiini HCl, seossuhteet paino-%:eina 62/33/2,5/2,5

Tulokset on esitetty kuvioissa 3 - 5. DSC-kokeet antavat informaatiota siitä, missä lämpötilassa kiderakenteen muutos tapahtuu. Pelkät DCS-määritykset eivät anna tietoa kyseessä olevista nimenomaisista rakenteista (esimerkiksi lamellirakenteesta, kuutiollisesta rakenteesta, heksagonisesta rakenteesta ja muista näistä vastaavista rakenteista). Jos DSC-tuloksia, kuten tässä tapauksessa on asianlaita, verrataan esimerkiksi tuloksiin, jotka on saatu näytteiden tarkastelusta polaroidussa valossa (ks. alla oleva kohta B) saadaan tietoa kiderakenteista sekä rakennemuutoksen lämpötilasta.

Koostumuksen nro 1 kyseessä ollessa osoittavat DSC:sta ja polaroidun valon määrityksestä peräisin olevat tulokset, että lamellirakenne esiintyy huoneenlämmössä ja lamellirakenne muuttuu kuutiolliseksi rakenteeksi lämpötilan kohotessa (kuvio 3). Rakennemuutoksen lämpötila on noin 37 °C. Koostumuksen nro 2 kyseessä ollessa havaitaan kuvion olevan samanlainen kuin mitä havaitaan koostumuksen nro 1 kohdalla (kuvio 4). Rakennemuutoksen lämpötila tässä tapauksessa on noin 30 °C. Koostumuksen nro 3 kyseessä ollessa ei havaita mitään tällaista kiderakenteen muutosta) (kuvio 5).

<u>B. GMO-koostumusten kiderakenteen muutos polarimetrialla määritettynä</u>

Nestekiderakenne voidaan myös määrittää käyttäen polaroitua valoa ja käyttämällä polarisaatiosuodattimilla varustettua stereomikroskooppia. Käänteisten misellien (L2) ulkonäkö muistuttaa nestemäistä öljyä, lamellirakenne (L_α) on limaa muistuttava ja polaroidussa valossa se on kahtaistaitteista.

Kuutiollisen rakenteen ulkonäkö on hyvin viskoottinen ja lasinkirkas näyte. Polaroidussa valossa kuutiollinen rakenne (Q) tuottaa mustan taustan, josta ei voida havaita mitään ykstyiskohtia, mikä viittaa siihen, että se ei heijasta valoa. Lamellirakenne esiintyy piipunpuhdistajaa muistuttavana rakenteena mustalla taustalla (ks. kuvio 6) ja kuutiollisessa rakenteessa näkyy erilaisia kuvioita mutta useimmissa tapauksissa se muistuttaa mosaiikkimaista rakennetta.

Tätä menetelmää käytettiin useiden erilaisten bioadhesiivisten koostumusten kiderakenteen käyttäytymisen tutkimisessa. Koostumuksista tutkittiin kiderakenne sen jälkeen kun niille oli suoritettu bioadhesiivisuuden tutkimus nro 1, toisin sanoen muodostunut nestekiderakenne tutkittiin sen jälkeen kun koostumus oli levitetty kaniinin tyhjänsuolen pinnalle ja koostumusta oli käsitelty vesipitoisella mediumilla. Tutkitut koostumukset sisältävät kyseessä olevaa aktiivista ainetta liuotettuna GMO:n ja etanolin seokseen, toisin sanoen alkuvaiheessa ei esiinny nestekiderakennetta.

Tutkittiin seuraavat koostumukset:

1. GMO/etanoli, seossuhde paino-%:eina 60/40
2. Kuten koostumus nro 1, mutta käyttäen 3 paino-% estradiolia
3. Kuten koostumus nro 1, mutta käyttäen 5 paino-% indometasiinia
4. Kuten koostumus nro 1, mutta käyttäen 10 paino-% isosorbidimononitraattia
5. GMO/mikonatsoli, seossuhde paino-%:eina 97/2
6. GMO/mikonatsoli, seossuhde paino-%:eina 92/8

Koostumukset poistettiin välittömästi sen jälkeen kun ne oli tutkittu tutkimusjärjestelmässä nro 1 ja kiderakenne tutkittiin polaroidussa valossa huoneen lämmössä. Kaikkiin koostumuksiin oli muodostunut kuutiollinen rakenne. Koostumuksessa nro 1 ei havaittu yhtään kiteiden saostumista. Koostumuksessa numero 2 oli saostunut estradiolikiteitä ja kiteet olivat

nestekiderakenteen sisällä. Koostumuksessa nro 3 havaittiin indometasiinikiteiden saostuminen noin 20 minuutin kuluttua. Lisäksi koostumuksen nro 3 kyseessä ollessa havaittiin myös alueita, joissa esiintyi lamellirakenne. Koostumuksissa nro 4 - 6 olevan nestekiderakenteen havaittiin myös olevan kuutiollinen. Muut kokeet ovat osoittaneet, että koostumus nro 4 on ainoastaan osittain bioadhesiivinen (tutkimusjärjestelmässä nro 1 tutkittuna on jäljellä oleva määrä noin 30 %) ja koostumuksessa nro 6 havaittiin vähäistä kiteiden saostumista.

Johtopäätöksenä tästä on todettava, että koostumukset nro 1 - 3 ja 5 - 6 ovat muissa kokeissa osoittautuneet olevan bioadhesiivisia. Nämä tulokset viittaavat siihen, että kuutiollinen rakenne muodostuu katsomatta siihen, esiintyykö koostumuksessa aktiivista ainetta. Tulokset voivat osoittaa, että kuutiollisen rakenteen muodostuminen on tarpeellista bioadheesion aikaansaamiselle, mutta mitään varmaa johtopäätöstä ei voida tehdä. Kuitenkin tulokset osoittavat, että silloin kun kuutiollinen rakenne muodostuu in situ -olosuhteissa, niin koostumus on bioadhesiivista.

C. GMO-koostumusten kiderakenteen muutos röntgensädediffraktiolla määritettynä

Käytettiin modifioitua diffraktiokuviolämpökameraa (DTP - kameraa). Säteilylähde oli röntgenputki, joka oli varustettu K_α-säteitä 0,15418 nm:n (1,5418 Å:n) aallonpituudella lähettävällä Cu-anodilla. Röntgenlähde oli Philips PW 1729.

Nestekideolomuoto voidaan tunnistaa pienen tulokulman röntgendiffraktiota käyttämällä ja sen perusteella, millainen sen ulkonäkö on polaroidussa valossa. Näiden kolmen nestekiderakenteen (sanaa "nestekide- (fluid crystalline)" käytetään tässä yhteydessä synonyyminä sanalle "nestekide- (liquid crystalline") (lamellirakenteen, heksagonisen rakenteen, kuutiollisen rakenteen) luonteenomaisessa röntgensäde-

diffraktiokuviossa esiintyy diffraktioviivoja järjestysasteissa (orders), jotka ovat:

1:1/2:1/1:4 ... (lamellirakenne)
1:1/√3:1/4:1/√7 ... (heksagoninen rakenne)
1:1/√2:1/√3:1/√4:1/√5:1/√6:1/√8 ... (kuutiollinen rakenne)

Kaksi eri kidehilaa muodostavat kuutiollisen muodon kyseessä ollessa eri diffraktioviivat.

Useiden eri koostumusten kiderakenteen käyttäytymistä tutkittaessa käytettiin menetelmiä C ja B. Alla on esitetty nämä koostumukset ja tutkimusten tulokset.

Seuraavat koostumukset ovat tutkittujen koostumusten prekursorimuotoja. Prekursosrikoostumukset ovat yksinkertaisia liuoksia ja liuottimena käytetään etanolia. Prekursorikoostumus ei sisällä vettä, mistä syystä näissä ei esiinny nestekiderakennetta.

Prekursorikoostumukset:
1. GMO/etanoli/mikonatsoli, seossuhteet paino-%:eina 57/38/5
2. GMO/etanoli/lesitiini, seossuhteet paino-%:eina 55/40/5
3. GMO/isosorbidimononitraatti, seossuhde paino-%:eina 97/3
4. GML/etanoli/lidokaiiniemäs/lidokaiini HCl, seossuhteet paino-%:eina 57/38/2,5/2,5
5. GML/etanoli/lidokaiiniemäs/lidokaiini HCl, seossuhteet paino-%:eina 58,2/38,8/1,5/1,5

Koostumus	Nestekiderakenteen olomuodon määritys tarkastelemalla visuaalisesti polaroidussa valossa Lämpötila-alue 22 → 37 °C.	Nestekiderakenteen olomuodon määrittäminen käyttäen röntgensädediffraktiota Lämpötila-alue 22 → 37 °C.	Lämpötila-alue	Etäisyydet (nm (Å))
GMO/vesi/mikonatsoli 61,8/33,3/5	lamellirakenne → käänteinen heksgoninen	lamellirakenteisen/ kuutiollisen seos → kuutiollinen (heksagoninen II 45 °C → 55 °C)	15 - 25°C	5,61 (56,1) m, 4,48 (48,9) w 3,42 (34,2) w. diff. 2,88 (28,8) w. diff.
			25 - 45 °C	5,82 (58,2) s, 4,67 (46,7) m 3,32 (33,2) w, 2,66 (26,6) w
			45 °C → 53 °C	4,89 (48,9) s, 2,91 (29,1) m 2,51 (25,1) m
GMO/vesi/lesitiini 60/35/5	kuutiollinen → kuutiollinen (muutamia lipidikiteitä)		15 - 45°C	62,9 (62,9) s, 5,41 (54,1) w 3,85 (38,5) w. diff. 3,25 (32,5) w. diff.
			45 °C → 55 °C	6,29 (62,9) s, 5,14 (51,4) m 3,67 (36,7) w, 2,97 (29,7) w

GMO/vesi/iso-sorbidimono-nitraatti 63,7/34,3/2	lamellirakenne + kuutiollinen → kuutiollinen	kuutiollinen → kuutiollinen	15 - 27 °C	6,55 (65,5) s, 4,89 (48,9) m 3,35 (33,5) w. diff.
			27 - 50 °C	6,05 (60,5) s, 5,74 (57,4) w 3,85 (38,5) w. diff. 3,25 (32,5) w. diff
			50 °C -	6,29 (62,9) s, 5,14 (51,4) m 3,59 (35,9) w, 2,99 (29,9) w
GML/vesi/lido-kaiiniemäs/li-dokaiini HCl 61,8/33,3/2,5/ 2,5		kuutiollinen → kuutiollinen, jossa yksi kideheijastus	15 - 40 °C	6,29 (62,9) s, 5,14 (51,4) w 3,63 (36,3) w. diff. 3,05 (30,5) w. diff.
			40 °C → 55 °C	9,6 (96) s, 5,4 (54) s. diff.
GML/vesi/lido-kaiiniemäs/ lidokaiini HCl 63/34/1,5/1,5	kuutiollinen → kuutiollinen	kuutiollinen → kuutiollinen	20 °C → 52 °C	6,17 (61,7) s, 5,05 (50,5) w 3,63 (36,3) w. diff. 3,11 (31,1) w. diff.

Esimerkki 21

Julkaisussa US 5 262 164 (The Procter & Gamble Company) valitun GMO:ta sisältävän koostumuksen ja Elyzol®-hammasgeelin bioadhesiivisia ominaisuuksia ja viskositeettejä koskeva tutkimus

Tämä tutkimus suoritettiin sen tutkimiseksi onko edellä mainitussa US-patenttijulkaisussa kuvatuilla koostumuksilla ja Elyzol®-hammasgeelillä bioadhesiivisia ominaisuuksia. Tutkitut Procter & Gamble'n mukaiset koostumukset on kuvattu esimerkeissä I - III julkaisussa US 5 262 164.

Tutkittujen koostumusten kokoonpano oli :

Julkaisun US 5 262 164 mukaiset koostumukset:

Esimerkki I:	tetrasykliinihydro-kloridi	49,9 paino-%
	hydroksipropyyli-selluloosa	2,5 paino-%
	glyserolimono-oleaat-ti	47,6 paino-%
Esimerki II:	klindamysiini-fos-faatti	35 paino-%
	hydroksipropyyli-sel-luloosa	5 paino-%
	lesitiini	25 paino-%
	glyserolimono-oleaat-ti	30 paino-%
	polyetyleeniglykoli 400	5 paino-%
Esimerkki III:	metronidatsoli	30 paino-%
	hydroksipropyyli-selluloosa	5 paino-%
	lesitiini	15 paino-%
	glyserolimono-oleaat-ti	30 paino-%

Alla esitetyt tulokset osoittavat selvästi, että millään tutkituista koostumuksista ei ollut bioadhesiivisia ominaisuuksia.

Koostumus paino-%	Bioadheesio visuaalinen määritys	Viskositeetti leikkausnopeus 120 s^{-1} lämpötila 20 °C
Julkaisun US 5 262 164* esimerkki I	0	4 400
Julkaisun US 5 262 164* esimerkki II	0	>20 000
Julkaisun US 5 262 164* esimerkki III	0	4 000
Elyzol® hammasgeeli	0	2 100

* koostumusta kuumennettiin ennen levittämistä

Esimerkki 22

Lidokaiinia sisältävien bioadhesiivisten koostumusten liukenemisnopeus

Lidokaiinin liukenemisnopeus lidokaiiniemäksen ja lidokaiinihydrokloridin seosta sisältävistä bioadhesiivisista koostumuksista määritettiin käyttäen Franz'in diffuusiokammioita, joiden diffuusiopinta-ala oli 1,77 cm^2. Tutkimus suoritettiin 37 °C:n lämpötilassa ja diffuusiomembraanina käytettiin Medicell International Ltd -yhtiöstä peräisin olevaa selluloosamembraania. Käytetyn membraanin huokoskoko on noin 2,4 nm ja se pidättää partikkelit, joiden suhteellinen moolimassa on suurempi kuin noin 12 000 - 14 000. Membraani esikäsiteltiin ja huuhdeltiin huolellisesti tislatulla vedellä ennen käyttöä. Vastaanottomediumina käytettiin isotonista 0,05 M fosfaattipuskuria, jonka pH oli 6,3 (Tanskan Lääkestandardi (Danish Drug Standard, DLS)) ja mediumia sekoitettiin magneettisekoittajalla nopeudella 300 kierrosta minuutissa.

Selluloosamembraanin annettiin tasapainottua käytetyssä vastaanottavassa mediumissa 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Kun membraani oli asetettu diffuusiokammioon, lisättiin sopiva

määrä tutkittavaa koostumusta ruiskun avulla huolehtien siitä, että koostumus jakaantui homogeenisesti koko diffuusioon käytettävissä olevalle membraanin alalle. Tämän jälkeen vastaanotto-osastoon lisättiin fosfaattipuskuri (aika t = 0) ja tästä otettiin asiaankuuluvin aikavälein 1 ml:n suuruiset näytteet, joista analysoitiin lidokaiinipitoisuus. Otetun vastaanottavan mediumin tilalle lisättiin 1 ml tuoretta vastaanottavaa mediumia. Käytetty HPLC-menetelmä oli seuraava:

Liikkuva faasi: metanoli:jääetikka:trietyyliamiini:vesi (seossuhteet 50 : 1,5 : 0,5 : 48), johon oli lisätty 20 tilavuus-% vettä
Kolonni: Nucleosil C18, 10 μM, 25 cm, 4,6 mm i.d.
Kolonnin lämpötila: huoneenlämpö
Virtausnopeus: 1,5 ml/min
Aallonpituus: 254 nm
Herkkyys: pienin havaittavissa oleva konsentraatio vastaa arvoa noin 5 μg/ml

Otetuista näytteistä analysoitiin kokonaislidokaiini (lidokaiiniemästä ja lidokaiinihydrokloridia ei eroteltu).

Tutkittu koostumus oli:

1. Koostumus, joka sisälsi GMO:n ja veden seosta, jonka seossuhde paino-%:eina oli 65/35 ja jonka lidokaiiniemäspitoisuus oli 1 paino-% ja lidokaiinihydrokloridipitoisuus 1 paino-%.

2. Koostumus, joka sisälsi GMO:n ja veden seosta, jonka seossuhde paino-%:eina oli 65/35 ja jonka lidokaiiniemäspitoisuus oli 3 paino-% ja lidokaiinihydrokloridipitoisuus 3 paino-%.

3. Koostumus, joka sisälsi GMO:n ja veden seosta, jonka seossuhde paino-%:eina oli 65/35 ja jonka lidokaiiniemäs-

pitoisuus oli 5 paino-% ja lidokaiinihydrokloridipitoisuus 5 paino-%.

Lisätty näytemäärä oli noin 350 mg.

Alla on esitetty tulokset kahden kokeen keskiarvona:

Aika min	Liuennut kokonaislidokaiini-määrä paino-%:eina Koostumus nro			
	1	2	2[a]	3
2	0,59	0,64		0,70
30	7,86	8,6	0,38	
33				9,95
60	15,3	16,2	1,12	
66				13,89
180	24,9	27,8	5,06	
183				27,79
300	36,1	37,9	8,86	33,56
1440	62,6	71,3	30,29	58,7

[a]: Koostumus nro 2 tutkittiin edellä mainitulla tavalla mutta käyttäen selluloosamembraanin tilalla sian poskiontelon limakalvomembraania

Tulokset viittaavat siihen, että lidokaiinin vapautuminen GMO:hon perustuvasta kantaja-aineesta on riippumaton lidokaiinikonsentraatiosta, edellyttäen, että vapautuminen tapahtuu kuutiollisesta kiderakennejärjestelmästä. Tulokset viittaavat lisäksi siihen, että GMO:hon perustuva kantaja-aine kykenee toimimaan lääkeaineen annostelujärjestelmänä (todennäköisimmin diffuusion säätelemänä lääkeaineen annostelujärjestelmänä).

Sen kokeen kyseessä ollessa, jossa käytettiin sian poskiontelon limakalvoa, osoittavat tulokset odotetulla tavalla, että diffuusionopeus membraanin poikki on pienempi kuin selluloosamembraanin poikki määritetty liukenemisnopeus. Nämä tulokset viittaavat selvästi siihen, että bioadhesii-

vista rasvahappoa sisältävällä bioadhesiivisella koostumuksella on potentiaalia toimia lääkeaineen annostelujärjestelmänä.

Esimerkki 23

Esitutkimus, joka koskee glyseryylimono-oleaatin (GMO) bioadhesiivisia ominaisuuksia ajan suhteen GMO/etanoliliuoksen sumutuslevityksen jälkeen

Tutkimuksen tarkoituksena oli arvioida glyseryylimono-oleaatin (GMO) bioadhesiivisia ominaisuuksia määrittämällä talteen saatu GMO-määrä sen jälkeen kun sitä on annettu oraalisesti sumutteena. Tutkimus suunniteltiin avoimeksi esitutkimukseksi ja tutkimukseen osallistui kolme tervettä Dumex'in työntekijää.

Tutkimusmateriaalit

Levitetty sumute oli koostumus, joka sisälsi GMO:n ja etanolin seosta, jonka seossuhde paino-%:eina oli 60/40 (valmistuserä nro BDM 29). Suun huuhteluneste oli 20 ml 45 paino-%:ista vesipitoista etanoliliuosta.

Menetelmät

Liuos levitettiin kieleen ja poskiontelon limakalvolle sumuttamalla yksi kertasuihku suihketta kumpaankin paikkaan (yhteensä 3 kertasuihkua), mikä vastasi 250 - 300 mg liuosta. Käytetyn liuoksen määrä määritettiin punnitsemalla sumutuspullo ennen käyttöä ja käytön jälkeen.

Kun liuos oli levitetty, niin koehenkilöiden annettiin nielaista (GMO/etanoli ja sylki). Syöminen ja juominen tutkimukseen varattuina aikoina ei ollut kuitenkaan sallittua.

Otettiin näytteitä, jotka vastasivat ajankohtia t = 0, 15, 30, 45, 60, 90 ja 120 minuuttia (t = aika levityksen jälkeen). Määrätyn ajan kuluttua suu huuhdeltiin. Tehtiin kaksi kontrollia, käyttämällä suun pesua 45-%:isella vesipitoisel-

la etanolilla ja sumuttamalla GMO-liuosta suoraan näytesäiliöön. Talteen otetut näytteet pidettiin pakastimessa -18 °C:ssa siihen asti, kunnes ne analysoitiin.

Esitutkimukset osoittivat, että talteen saaduksi määräksi kyettiin saamaan erittäin vaihteleva mutta hyväksyttävissä oleva määrä, kun suuta oli huuhdottu 15 sekunnin ajan 20 ml:lla 45-%:ista vesipitoista etanolia.

Määritykset

Näytteiden GMO-pitoisuus määritettiin alla kuvatulla HPLC-menetelmällä.

Suun huuhtelunesteestä peräisin oleva liuos siirrettiin 50 ml:n mittapulloon ja tähän lisättiin sellainen määrä 96-%:ista etanolia, että kokonaistilavuudeksi tuli 50,00 ml. Tutkittavista liuoksista käytetään merkintää T.

Standardiliuos, josta käytetään merkintää R, valmistettiin punnitsemalla 100,00 mg glyseryylimono-oleaattia (GMO) 50 ml:n mittapulloon ja lisäämällä tähän sellainen määrä metanolia, että tilavuudeksi saatiin 50,00 ml.

T ja R analysoitiin sopivassa nestekromatografissa käyttäen UV-detektoria ja integraattoria.

Kolonni: Teräskolonni, pituus 25 cm x 4,6 mm i.d.
Stationaarinen faasi: Supelcosil LC-18 DM, 5 μm
Liikkuva faasi: metanoli R: vesi : puskuri (840 : 120 : 40)
Virtausnopeus: 1,2 ml/min
Lämpötila: huoneenlämpö
Havaitseminen: 214 nm
Injektio: 20 μl:n silmukka
Retentioaika: GMO: noin 24 min.

Puskuriliuoksen valmistus:
Punnitaan 13,33 g natriumasetaattia (CH_3COONa, 3 H_2O) 1000 ml:n mittapulloon ja tämä liuotetaan 500 ml:aan vettä. Pulloon lisätään 5,8 ml jääetikkaa. Pulloon lisätään sellainen määrä vettä, että liuoksen tilavuudeksi saadaan 1000 ml. pH säädetään arvoon 3,5 suolahapolla (2 N).

Talteen saatu GMO-määrä määritettiin käyttämällä seuraavia laskutoimituksia:

$$\text{Talteen saatu GMO:n määrä, \%: } \frac{A_T \times n(g)}{A_R \times x\ m(g) \times \%\ GMO} \times 100\ \%$$

jossa:
A_T on tutkittavan liuoksen, T, pinta-ala
A_R on standardiliuoksen, R, pinta-ala
n on punnitun standardin määrä (g),
m on se määrä levitettyä liuosta (g), joka saadaan selville punnitsemalla sumutuspullo ennen käyttöä ja tämän jälkeen,
% GMO on GMO-pitoisuus liuoksessa paino-%:eina esitettynä.

Tulokset

Kokeeseen osallistui kolme koehenkilöä (1 mies, 2 naista).

Tutkimus suoritettiin Dumex A/S -yhtiön toimitiloissa, Kööpenhaminassa viikolla 2 1995.

Tulokset on esitetty alla taulukossa 1 ja kuviossa 7.

Taulukko 1

Levitetyn liuoksen määrä ja talteen saadun GMO:n määrä 0 - 120 minuutin kuluttua

Aika, min	Koehenkilö nro	Lisätty liuos mg	Lisätty GMO mg	Talteen saatu GMO mg	Talteen saatu GMO %
	1	238,5	147,9	137,0	92,6
0 min	2	257,3	159,5	135,8	85,1
	3	273,1	169,3	150,5	88,9
	1	-	-	-	-
15 min	2	250,9	155,6	5,2	3,3
	3	287,2	178,1	20,3	11,4
	1	264,1	163,7	24,3	14,8
30 min	2	253,9	157,4	11,0	7,0
	3	239,7	148,6	15,8	10,6
	1	-	-	-	-
45 min	2	247,4	153,4	7,0	4,6
	3	274,7	170,3	10,0	5,9
	1	233,5	144,8	6,0	4,1
60 min	2	228,8	141,9	4,8	3,3
	3	286,8	177,8	9,3	5,2
	1	246,1	152,6	14,4	9,5
90 min	2	268,4	166,4	6,1	3,7
	3	-	-	-	-
	1	274,7	170,3	4,1	2,4
120 min	2	265,9	164,9	3,4	2,1
	3	272,4	168,8	8,2	4,8
ref. kontrolli		292,0	181,0	165,7	91,6
ref. kontrolli		296,6	183,9	171,3	93,2

Talteen saadun GMO:n määrä pieneni noin 10 %:iin 15 minuutin kuluttua, jonka jälkeen määrä pieneni seuraavan tunnin aikana hyvin hitaasti noin 5 %:iin.

Tulokset osoittavat, että suuri osa levitetystä koostumuksesta ei koskaan pääse kiinnittymään suun limakalvoon. Tämän todennäköisin syy on se, että koostumuksen havaitaan aluksi reagoivan syljen kanssa, mikä johtaa koostumuksen muuttumiseen rasvamaiseksi, minkä jälkeen koostumuksen rasvamainen osa tulee nieltyä. Aikaväliltä t = 15 - t = 120 peräisin olevat tulokset osoittavat kuitenkin, että se määrä koostumusta, joka kiinnittyy suun limakalvoon, jää tästä huolimatta vakioiseksi tänä aikana.

Patenttivaatimukset

1. Rasvahappoesterin tai rasvahappoestereiden yhdistelmien käyttö, jossa rasvahappoesterin rasvahappokomponentti on tyydyttynyt tai tyydyttymätön rasvahappo, jonka hiiliatomien kokonaislukumäärä on C_8 - C_{22} ja jossa rasvahappoesteri on jokin polyhydristen alkoholien rasvahappoestereistä, jokin hydroksikarboksyylihappojen rasvahappoestereistä, jokin monosakkaridien rasvahappoestereistä, jokin glyseryylifosfaattijohdannaisten rasvahappoestereistä, jokin glyseryylisulfaattijohdannaisten rasvahappoestereistä tai näiden seoksista,

joka rasvahappoesteri tai rasvahappoesterien yhdistelmä tutkittuna bioadhesiivisuuden tutkimusjärjestelmässä, joka sisältää sen, että

i) sijoitetaan pituussuunnassa leikatun kaniinin tyhjänsuolen segmentti ruostumattomasta teräksestä valmistettuun pidikkeeseen tyhjänsuolen limakalvokerros sillä tavoin ylöspäin suuntautuneena, että tähän voidaan levittää mainittua rasvahappoesteriä,

ii) asetetaan tulokseksi saatu pidike -21 ± 2° kulmassa sylinterimäiseen kammioon, jota pidetään termostoiduissa olosuhteissa 37 ± 0,5 °C:ssa ja säilyttäen suhteellinen kosteus noin 100 %:ssa,

iii) huuhdellaan pidikkeessä olevaa tyhjääsuolta isotonisella 0,02 M fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6,5, 37 °C) 5 minuutin ajan virtausnopeudella 10 ml/min,

iv) levitetään tarkasti punnittu määrä mainittua rasvahappoesterinäytettä (noin 100 mg) tietylle pidikkeessä olevan tyhjänsuolen limakalvon pinnassa olevalle alueelle (noin 0,8 cm x 6 cm),

v) lisätään levitetyn näytteen pinnalle pisaroittain noin 1 ml mainittua fosfaattipuskuriliuosta,

vi) jätetään vaiheesta v) peräisin oleva tulokseksi saatu näyte 10 minuutiksi mainittuun kammioon, jotta näytteellä olisi mahdollisuus päästä vuorovaikutukseen tyhjänsuolen glykoproteiinien kanssa,

vii) huuhdellaan tyhjääsuolta sen sisältämine levitettyine näytteineen mainitulla fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6,5, 37 °C) 30 minuutin ajan virtausnopeudella 10 ml/min,

viii) otetaan talteen vaiheesta vii) peräisin olevat pesuliuokset, ja

ix) lasketaan tyhjänsuolen pinnalle jääneen näytteen jäljellä oleva määrä määrittämällä pesuliuosten sisältämän näytteen määrä tai määrittämällä tyhjänsuolen pinnalle jäänyt määrä,

tuottaa jäljelle jääneeksi määräksi vähintään 60 paino-%, bioadhesiivisena aineena.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että jäljellä oleva määrä on vähintään 70 paino-%.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että jäljellä oleva määrä on vähintään 80 paino-%.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että jäljellä oleva määrä on vähintään 85 paino-%.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että jäljellä oleva määrä on vähintään 90 paino-%.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että rasvahappokomponentti on tyydyttynyt rasvahappo, joka

on kapronihappo, kapryylihappo, kapriinihappo, lauriinihappo, myristiinihappo, palmitiinihappo, steariinihappo, maapähkinähappo tai beheenihappo.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että rasvahappokomponentti on tyydyttymätön rasvahappo, joka on palmitoleiinihappo, öljyhappo, linolihappo, linoleenihappo tai arakidonihappo.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että polyhydrinen alkoholi on glyseroli, 1,2-propaanidioli, 1,3-propaanidioli, diasyyligalaktosyyliglyseroli, diasyylidigalaktosyyliglyseroli, erytritoli, ksylitoli, adonitoli, arabitoli, mannitoli tai sorbitoli.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on glyseryylimono-oleaatti, glyseryylimonolinoleaatti, glyserolimonolinolenaatti tai jokin näiden seoksista.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että hydroksikarboksyylihappo on omenahappo, viinihappo, sitruunahappo tai maitohappo.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on sitruunahapon rasvahappomonoesteri.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että monosakkaridi on glukoosi, mannoosi, fruktoosi, treoosi, guloosi, arabinoosi, riboosi, erytroosi, lyksoosi, galaktoosi, sorboosi, altroosi, talloosi, idoosi, ramnoosi tai alloosi.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on sellaisen monosakkaridin rasvahappomonoesterin, joka on sorboosi, galaktoosi, riboosi tai ramnoosi.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että glyseryylifosfaattijohdannainen on fosfolipidi, joka on fosfatidihappo, fosfatidyyliseriini, fosfatidyylietanoliamiini, fosfatidyylikoliini, fosfatidyyliglyseroli, fosfatidyyli-inositoli tai difosfatidyyliglyseroli.

15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on glyseryylifosfaattijohdannaisen tai glyseryylisulfaattijohdannaisen rasvahappoesteri, ja rasvahappokomponentti on lauriinihappo, myristiinihappo, palmitiinihappo, steariinihappo, öljyhappo, linolihappo, linoleenihappo tai beheenihappo.

16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on dioleyylifosfatidyylikoliini, dilauryylifosfatidyylikoliini, dimyristyylifosfatidyylikoliini, dipalmitoyylifosfatidyylikoliini, distearoyylifosfatidyylikoliini, dibehenoyylifosfatidyylikoliini, dimyristyylifosfatidyylietanoliamiini, dipalmitoyylifosfatidyylietanoliamiini, dioleyylifosfatidyyliglyseroli, dilauryylifosfatidyyliglyseroli, dimyristoyylifosfatidyyliglyseroli, dipalmitoyylifosfatidyyliglyseroli, distearoyylifosfatidyyliglyseroli, dipalmitoyylifosfatidihappo tai jokin näiden seoksista.

17. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on rasvahappoesteri, joka vesipitoisen mediumin kanssa kosketukseen saatettuna muodostaa nestekiderakenteen.

18. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen käyttö farmaseuttisessa, kosmeettisessa, eläinlääketieteellisessä tai maatalouskemiallisessa koostumuksessa.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö vähintään noin 6 paino-%:isessa konsentraatiossa koostumuksen perusteella laskettuna.

20. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö vähintään noin 15 paino-%:isessa konsentraatiossa koostumuksen perusteella laskettuna.

21. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 18 - 20 mukainen käyttö korkeintaan 95 paino-%:isessa konsentraatiossa.

22. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 18 - 20 mukainen käyttö korkeintaan 80 paino-%:isessa konsentraatiossa.

23. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 18 - 20 mukainen käyttö korkeintaan 60 paino-%:isessa konsentraatiossa.

24. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 18 - 23 mukainen käyttö eläimen, kuten ihmisen, vaurioitumattomalle tai vaurioituneelle limakalvolle tai tämän läpi levitettäväksi tarkoitetuissa koostumuksissa.

25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että limakalvo on suun, nenän, emättimen, peräsuolen, korvien, keuhkojen tai gastrointestinaalialueen limakalvo.

26. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että iho tai limakalvo on vaurioitunut tai tulehtunut iho tai limakalvo.

27. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 18 - 23 mukainen käyttö eläimen, kuten ihmisen, kynteen levitettäväksi tarkoitetuissa koostumuksissa.

28. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 18 - 27 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että koostumus on bioadhesiivinen koostumus.

29. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 18 - 28 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että koostumusta levitetään limakalvokohteeseen, jossa siihen vaikuttavat mekaanisesti

vaikuttava poistovaikutus tai huuhtoutumiseen perustuva poistovaikutus.

30. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 18 - 29 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että koostumus on sumutteen muodossa.

31. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 18 - 29 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että koostumus on monen kerta-annoksen muodostaman koostumuksen muodossa.

32. Bioadhesiivinen farmaseuttinen koostumus, joka on rasvahappoesteriä sisältävän sumutteen muodossa, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesterin rasvahappokomponentti on tyydyttynyt tai tyydyttymätön rasvahappo, jonka hiiliatomien kokonaislukumäärä on C_8 - C_{22}, ja siitä, että rasvahappoesteri on jokin polyhydristen alkoholien rasvahappoestereistä, jokin hydroksikarboksyylihappojen rasvahappoestereistä, jokin monosakkaridien rasvahappoestereistä, jokin glyseryylifosfaattijohdannaisten rasvahappoestereistä, jokin glyseryylisulfaattijohdannaisten rasvahappoestereistä tai jokin näiden seoksista,

joka rasvahappoesteri tai rasvahappoesterien yhdistelmä tutkittuna bioadhesiivisuuden tutkimusjärjestelmässä, joka käsittää sen, että

i) sijoitetaan pituussuunnassa leikatun kaniinin tyhjänsuolen segmentti ruostumattomasta teräksestä valmistettuun pidikkeeseen tyhjänsuolen limakalvokerros sillä tavoin ylöspäin suuntautuneena, että tähän voidaan levittää mainittua rasvahappoesteriä,

ii) asetetaan tulokseksi saatu pidike -21 ± 2° kulmassa sylinterimäiseen kammioon, jota pidetään termostoiduissa olosuhteissa 37 ± 0,5 °C:ssa ja säilyttäen suhteellinen kosteus noin 100 %:ssa,

iii) huuhdellaan pidikkeessä olevaa tyhjääsuolta isotonisella 0,02 M fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6,5, 37 °C) 5 minuutin ajan virtausnopeudella 10 ml/min,

iv) levitetään tarkasti punnittu määrä mainittua rasvahappoesterinäytettä (noin 100 mg) tietylle pidikkeessä olevan tyhjänsuolen limakalvon pinnassa olevalle alueelle (noin 0,8 cm x 6 cm),

v) lisätään levitetyn näytteen pinnalle pisaroittain noin 1 ml mainittua fosfaattipuskuriliuosta,

vi) jätetään vaiheesta v) peräisin oleva tulokseksi saatu näyte 10 minuutiksi mainittuun kammioon, jotta näytteellä olisi mahdollisuus päästä vuorovaikutukseen tyhjänsuolen glykoproteiinien kanssa,

vii) huuhdellaan tyhjääsuolta sen sisältämine levitettyine näytteineen mainitulla fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6,5, 37 °C) 30 minuutin ajan virtausnopeudella 10 ml/min,

viii) otetaan talteen vaiheesta vii) peräisin olevat pesuliuokset, ja

ix) lasketaan tyhjänsuolen pinnalle jääneen näytteen jäljellä oleva määrä määrittämällä pesuliuosten sisältämän näytteen määrä tai määrittämällä tyhjänsuolen pinnalle jäänyt määrä,

tuottaa bioadhesiivisen aineen muodossa jäljelle jääneeksi määräksi vähintään 60 paino-%, tämä edellyttäen sitä, että koostumus ei muodostu yhdistelmästä, joka sisältää 10 paino-% insuliinin kylläistä liuosta ja 90 paino-% nestemäistä mono-oleiinia tai että koostumus ei sisällä 80 paino-% monogalaktoyylidiglyseridiä.

33. Bioadhesiivinen monesta kerta-annoksesta yhdistetty farmaseuttinen koostumus, jossa yksittäiset kerta-annokset sisältävät rasvahappoesteriä tai rasvahappoesterien yhdistelmää, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesterin rasvahappokomponentti on tyydyttynyt tai tyydyttymätön rasvahappo, jonka hiiliatomien kokonaislukumäärä on C_8 - C_{22}, ja siitä, että rasvahappoesteri on jokin polyhydristen alkoholien rasvahappoestereistä, jokin hydroksikarboksyylihappojen rasvahappoestereistä, jokin monosakkaridien rasvahappoestereistä, jokin glyseryylifosfaattijohdannaisten rasvahappoestereistä, jokin glyseryylisulfaattijohdannaisten rasvahappoestereistä tai jokin näiden seoksista,

joka rasvahappoesteri tai rasvahappoesterien yhdistelmä tutkittuna bioadhesiivisuuden tutkimusjärjestelmässä, joka käsittää sen, että

i) sijoitetaan pituussuunnassa leikatun kaniinin tyhjänsuolen segmentti ruostumattomasta teräksestä valmistettuun pidikkeeseen tyhjänsuolen limakalvokerros sillä tavoin ylöspäin suuntautuneena, että tähän voidaan levittää mainittua rasvahappoesteriä,

ii) asetetaan tulokseksi saatu pidike -21 ± 2° kulmassa sylinterimäiseen kammioon, jota pidetään termostoiduissa olosuhteissa 37 ± 0,5 °C:ssa ja säilyttäen suhteellinen kosteus noin 100 %:ssa,

iii) huuhdellaan pidikkeessä olevaa tyhjääsuolta isotonisella 0,02 M fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6,5, 37 °C) 5 minuutin ajan virtausnopeudella 10 ml/min,

iv) levitetään tarkasti punnittu määrä mainittua rasvahappoesterinäytettä (noin 100 mg) tietylle pidikkeessä olevan tyhjänsuolen limakalvon pinnassa olevalle alueelle (noin 0,8 cm x 6 cm),

v) lisätään levitetyn näytteen pinnalle pisaroittain noin 1 ml mainittua fosfaattipuskuriliuosta,

vi) jätetään vaiheesta v) peräisin oleva tulokseksi saatu näyte 10 minuutiksi mainittuun kammioon, jotta näytteellä olisi mahdollisuus päästä vuorovaikutukseen tyhjänsuolen glykoproteiinien kanssa,

vii) huuhdellaan tyhjääsuolta sen sisältämine levitettyine näytteineen mainitulla fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6,5, 37 °C) 30 minuutin ajan virtausnopeudella 10 ml/min,

viii) otetaan talteen vaiheesta vii) peräisin olevat pesuliuokset, ja

ix) lasketaan tyhjänsuolen pinnalle jääneen näytteen jäljellä oleva määrä määrittämällä pesuliuosten sisältämän näytteen määrä tai määrittämällä tyhjänsuolen pinnalle jäänyt määrä,

tuottaa bioadhesiivisen aineen muodossa jäljelle jääneeksi määräksi vähintään 60 paino-%.

34. Patenttivaatimuksen 33 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että koostumuksen yksittäiset kerta-annokset sisältävät rasvahappoesteriä.

35. Patenttivaatimuksen 34 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että koostumuksen yksittäiset kerta-annokset on päällystetty rasvahappoesterillä.

36. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 33 - 35 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että yksittäisissä kerta-annoksissa käytetään lisäpäällystettä, kuten kalvopäällystettä, lääkeaineen vapautumista pitkittävää päällystettä tai enteropäällystettä.

37. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 33 - 36 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että monesta kerta-annoksesta yhdistetty koostumus on valmistettu tabletin tai kapselin muotoon.

38. Patenttivaatimuksen 37 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että tabletissa tai kapselissa käytetään päällystettä, kuten kalvopäällystettä, lääkeaineen vapautumista pitkittävää päällystettä tai enteropäällystettä.

39. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 33 - 38 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että yksittäiset kerta-annokset sisältävät tehottoman ytimen.

40. Patenttivaatimuksen 39 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että tehoton ydin on biologisesti hajoava.

41. Patenttivaatimuksen 39 tai 40 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että tehoton ydin sisältää polysakkaridia, joka on karmelloosi, kitosaani, jokin pektiini, jokin ksantaanikumi, jokin karrageenan, karobikumi, arabikumi, jokin gelatiini, jokin alginaatti tai jokin dekstraani tai jokin näiden suoloista.

42. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 41 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että se on tarkoitettu levitettäväksi eläimen, kuten ihmisen, vaurioitumattomalle tai vaurioituneelle iholle tai limakalvolle tai tämän läpi.

43. Patenttivaatimuksen 42 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että limakalvo on suun, gastrointestinaalialueen, nenän, korvien, peräsuolen, keuhkojen tai emättimen limakalvo.

44. Patenttivaatimuksen 42 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että iho on vaurioitunut tai tulehtunut iho.

45. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 41 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että se on tarkoitettu levitettäväksi eläimen, kuten ihmisen, kynteen.

46. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 45 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että jäljellä oleva määrä on vähintään 70 paino-%.

47. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 45 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että jäljellä oleva määrä on vähintään 80 paino-%.

48. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 45 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että jäljellä oleva määrä on vähintään 85 paino-%.

49. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 45 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että jäljellä oleva määrä on vähintään 90 paino-%.

50. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 49 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappokomponentti on tyydyttynyt rasvahappo, joka on kapronihappo, kapryylihappo, kapriinihappo, lauriinihappo, myristiinihappo, palmitiinihappo, steariinihappo, maapähkinähappo tai beheenihappo.

51. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 49 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappokomponentti on tyydyttymätön rasvahappo, joka on palmitoleiinihappo, öljyhappo, linolihappo, linoleenihappo tai arakidonihappo.

52. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 51 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että polyhydrinen alkoholi on glyseroli, 1,2-propaanidioli, 1,3-propaanidioli, diasyyligalaktosyyliglyseroli, diasyylidigalaktosyyliglyseroli, erytritoli, ksylitoli, adonitoli, arabitoli, mannitoli tai sorbitoli.

53. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 51 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on glyseryylimono-oleaatti, glyseryylimonolinoleaatti, glyserolimonolinolenaatti tai jokin näiden seoksista.

54. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 51 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että hydroksikarboksyylihappo on omenahappo, viinihappo, sitruunahappo tai maitohappo.

55. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 51 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on sitruunahapon rasvahappomonoesteri.

56. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 51 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että monosakkaridi on glukoosi, mannoosi, fruktoosi, treoosi, guloosi, arabinoosi, riboosi, erytroosi, lyksoosi, galaktoosi, sorboosi, altroosi, talloosi, idoosi, ramnoosi tai alloosi.

57. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 51 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on sellaisen monosakkaridin rasvahappomonoesterin, joka on sorboosi, galaktoosi, riboosi tai ramnoosi.

58. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 51 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että glyseryylifosfaattijohdannainen on fosfolipidi, joka on fosfatidihappo, fosfatidyyliseriini, fosfatidyylietanoliamiini, fosfatidyylikoliini, fosfatidyyliglyseroli, fosfatidyyli-inositoli tai difosfatidyyliglyseroli.

59. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 51 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on glyseryylifosfaattijohdannaisen tai glyseryylisulfaattijohdannaisen rasvahappoesteri, ja rasvahappokomponentti on lauriinihappo, myristiinihappo, palmitiinihappo, steariinihappo, öljyhappo, linolihappo, linoleenihappo tai beheenihappo.

60. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 51 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on dioleyylifosfatidyylikoliini, dilauryylifosfatidyylikoliini, dimyristyylifosfatidyylikoliini, dipalmitoyylifosfatidyylikoliini, distearoyylifosfatidyylikoliini, dibehenoyylifosfatidyylikoliini, dimyristyylifosfatidyylietanoliamiini, dipalmitoyylifosfatidyylietanoliamiini, dioleyylifosfatidyyliglyseroli, dilauryylifosfatidyyliglyseroli, dimyristoyylifosfatidyyliglyseroli,dipalmitoyylifosfatidyyliglyseroli, distearoyylifosfatidyyliglyseroli, dipalmitoyylifosfatidihappo tai jokin näiden seoksista.

61. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 60 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesteri on rasvahappoesteri, joka vesipitoisen mediumin kanssa kosketukseen saatettuna muodostaa nestekiderakenteen.

62. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 32 - 61 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että se on tarkoitettu käytettäväksi farmaseuttisessa, kosmeettisessa, eläinlääketieteellisessä tai maatalouskemiallisessa koostumuksessa.

63. Patenttivaatimuksen 62 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesterin konsentraatio on koostumuksen perusteella laskettuna vähintään noin 6 paino-%.

64. Patenttivaatimuksen 62 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesterin konsentraatio on koostumuksen perusteella laskettuna vähintään noin 15 paino-%.

65. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 62 - 64 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesterin konsentraatio on korkeintaan 95 paino-%.

66. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 62 - 64 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesterin konsentraatio on korkeintaan 85 paino-%.

67. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 62- 64 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että rasvahappoesterin konsentraatio on korkeintaan 60 paino-%.

68. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 62 - 67 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että sitä käytetään koostumuksissa, jotka on tarkoitettu levitettäväksi eläimen, kuten ihmisen, vaurioitumattomalle tai vaurioituneelle iholle tai limakalvolle tai tämän läpi.

69. Patenttivaatimuksen 68 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että limakalvo on suun, nenän, emättimen, peräsuolen, korvien, keuhkojen tai gastrointestinaalialueen limakalvo.

70. Patenttivaatimuksen 68 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että iho tai limakalvo on vaurioitunut tai tulehtunut iho tai limakalvo.

71. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 62 - 67 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että sitä käytetään koostumuksissa, jotka on tarkoitettu levitettäväksi eläimen, kuten ihmisen, kynteen.

72. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 62 - 71 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että koostumusta levitetään limakalvokohteeseen, jossa siihen vaikuttavat mekaanisesti vaikuttava poistovaikutus tai huuhtoutumiseen perustuva poistovaikutus.

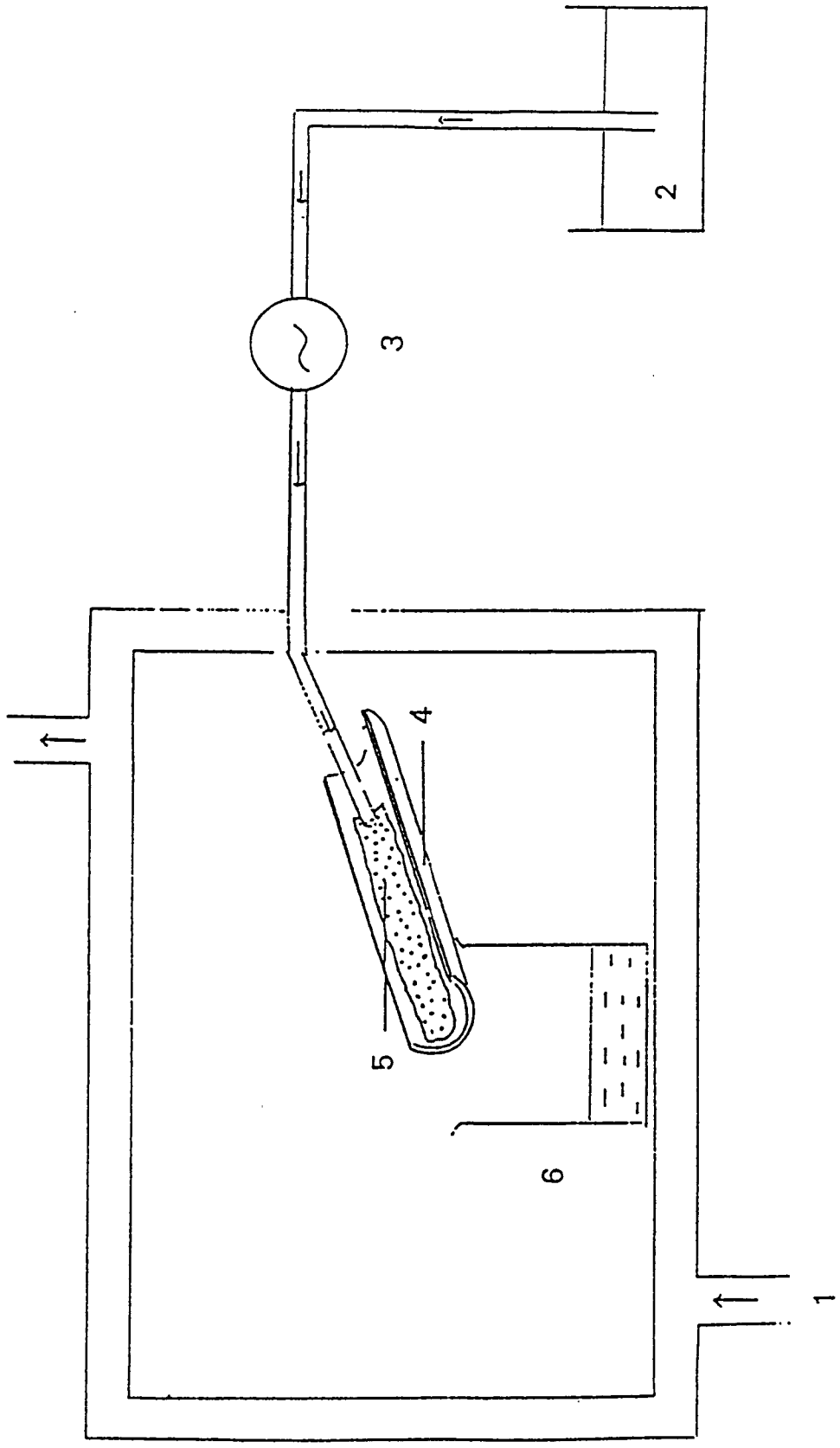


Fig. 1

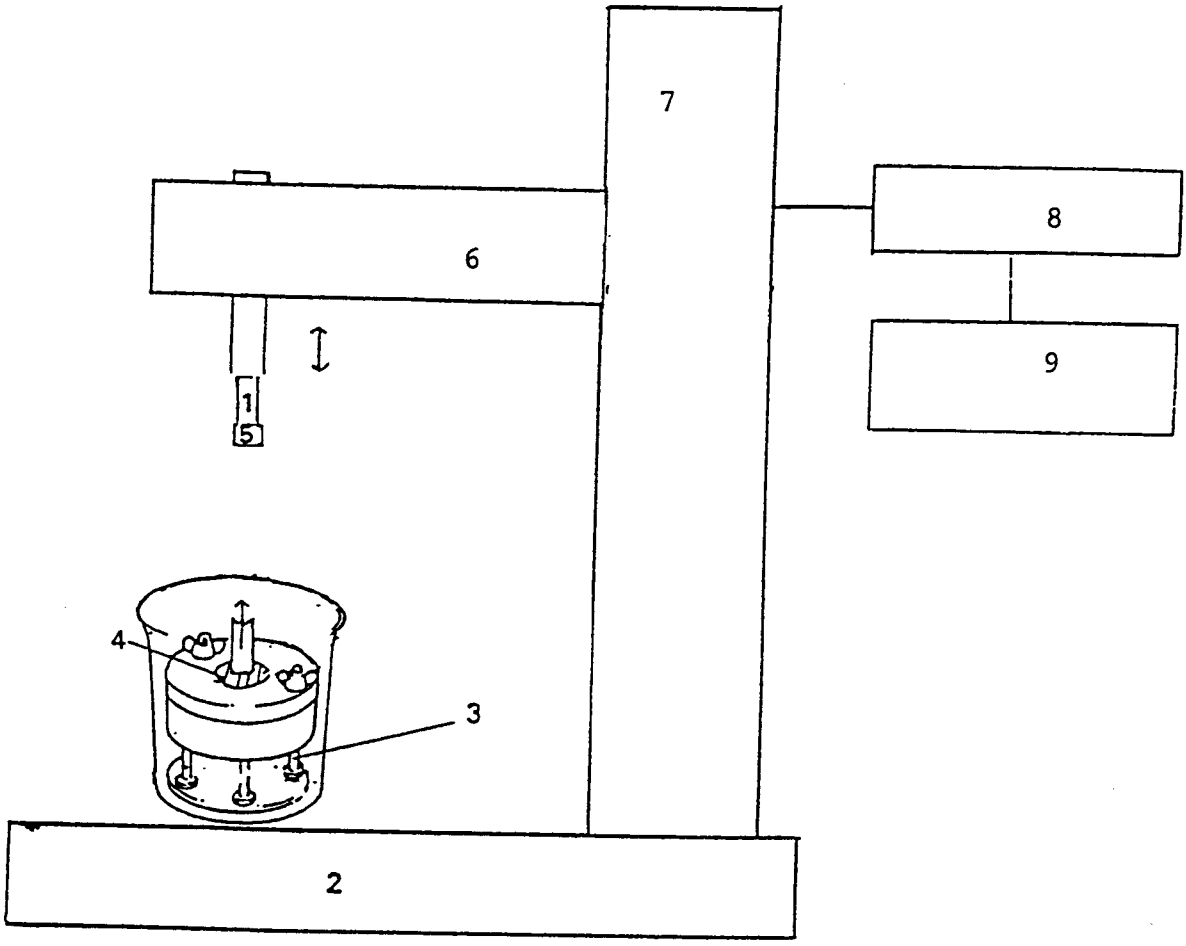


Fig. 2*a*

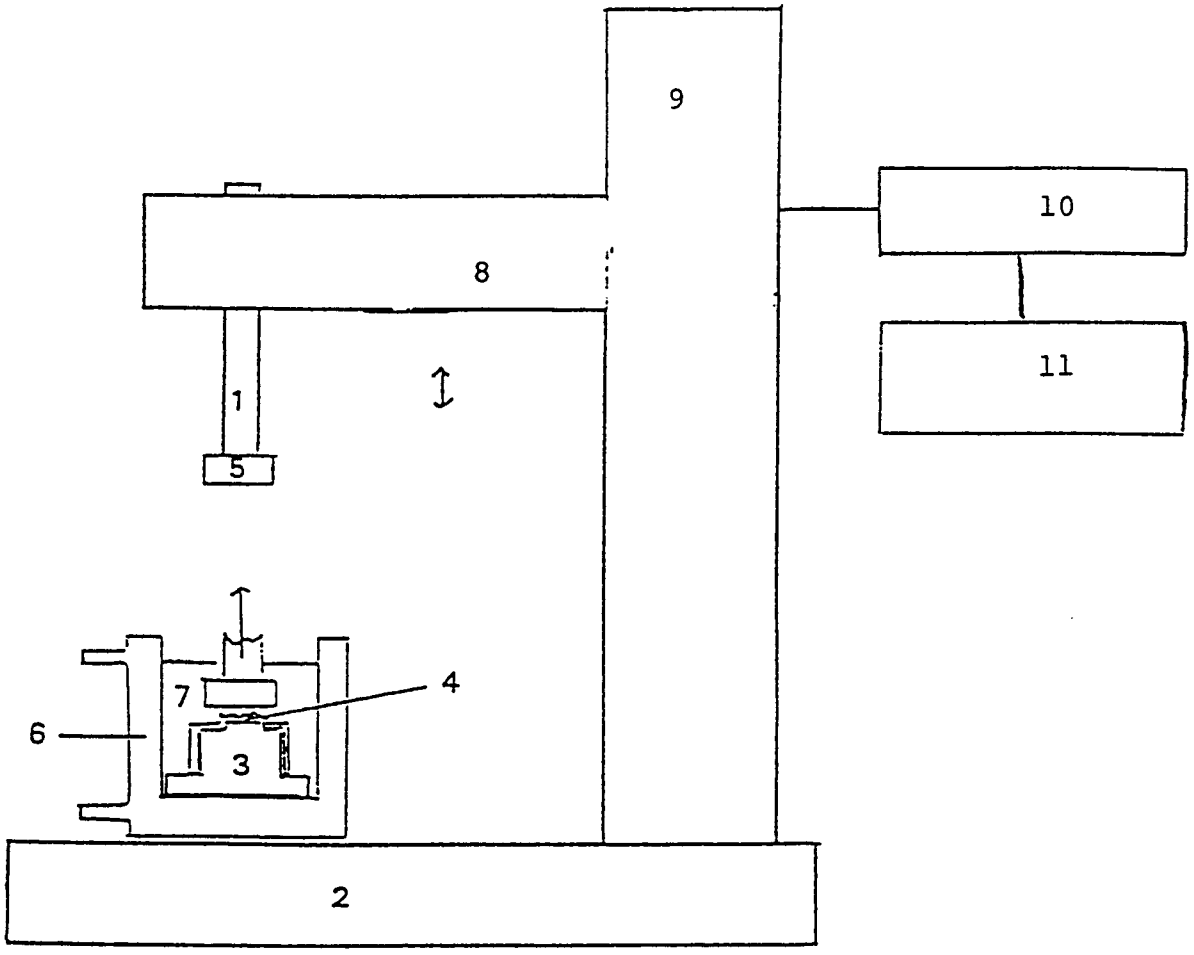


Fig. 2*b*

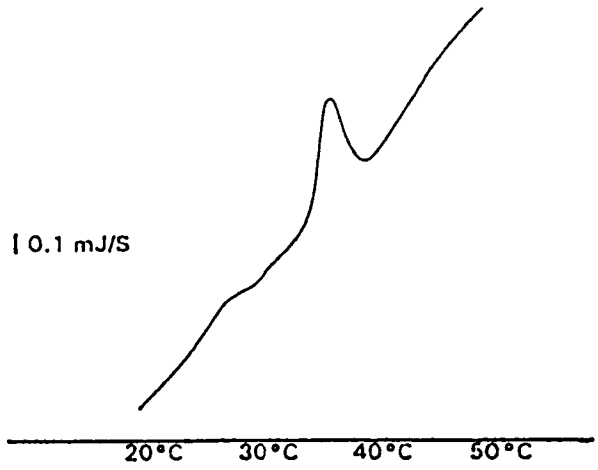


Fig. 3

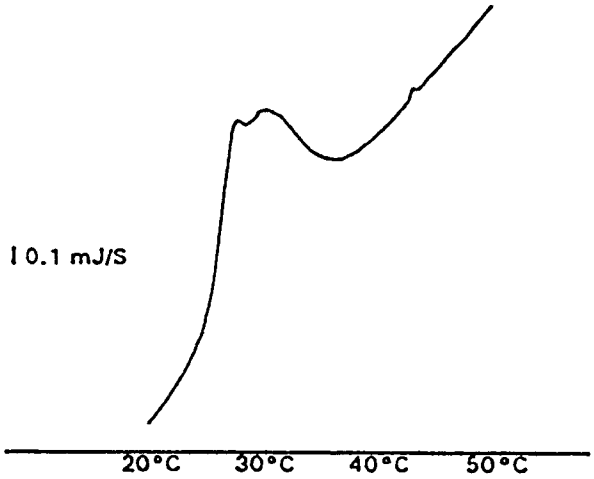


Fig. 4

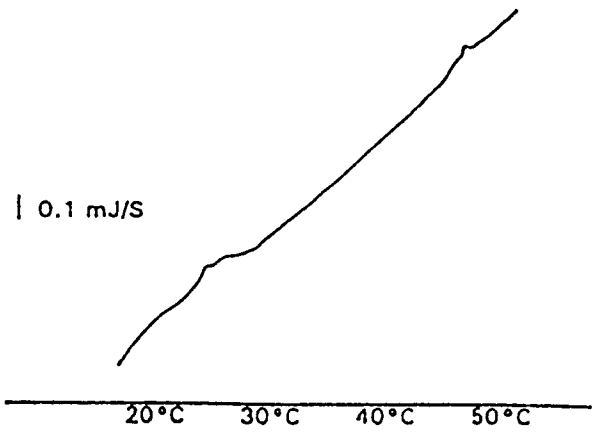
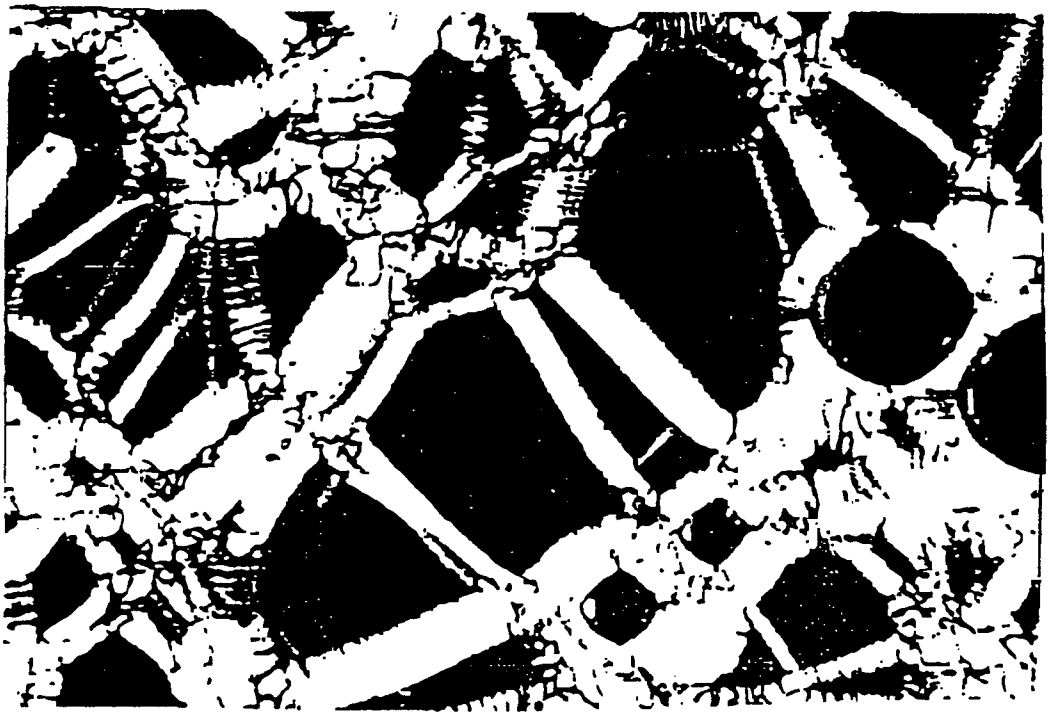


Fig. 5



LAMELLAARINEN MESOFAASI

Fig. 6

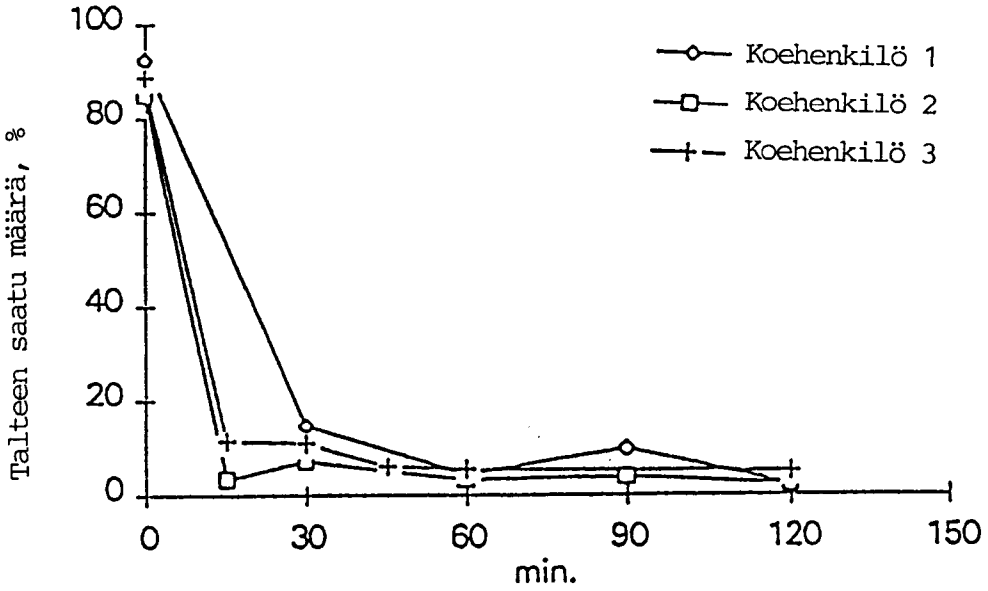

100
80
60
40
20
0
Talteen saatu määrä, %
0
30
60
90
120
150
min.
Koehenkilö 1
Koehenkilö 2
Koehenkilö 3

Fig. 7