(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 960892 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 960892

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C08G 64/02
C08G 64/34
A61K 38/20
A61K 47/34

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **26.08.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **26.02.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **18.04.1996**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **26.08.1994 PCT/EP1994/002833**

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

27.08.1993	GB	9317822	01.10.1993	GB	9320240
17.12.1993	GB	9325900	11.04.1994	GB	9407156

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Novartis AG, Schwarzwaldallee 215, 4058 BASEL, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Acemoglu, Murat, Switzerland, SVEITSI, (CH)
2 • Bantle, Siegfried, Switzerland, SVEITSI, (CH)
3 • Bodmer, David, Switzerland, SVEITSI, (CH)
4 • Cammisuli, Salvatore, Reinach, SVEITSI, (CH)
5 • Hiestand, Peter, Switzerland, SVEITSI, (CH)
6 • Nimmerfall, Fritz, Switzerland, SVEITSI, (CH)
7 • Stoll, Georg, Germany, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Papula Oy, Mechelininkatu 1 a, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Polymeerimatriisit ja niiden käyttö farmaseuttisissa koostumuksissa
Polymermatriser och användning av dem i farmaceutiska kompositioner

POLYMEERIMATRIKSEJA JA NIIDEN KÄYTTÖJÄ FARMASEUTTISISSA KOOSTUMUKSISSA

Esillä oleva keksintö liittyy farmaseuttisiin koostumuksiin, joihin kuuluu polymeerimatrikseja, ja erityisesti koostumuksiin, jotka sisältävät IL-6:ta ja jotka on tarkoitettu käytettäväksi IL-1- ja/tai TNFα-välitteisten tautien hoitoon, esim. kroonisten inflammatoristen tilojen hoitoon. Keksinnön mukaiset spesifiset polymeerit, erityisesti myöhemmin alla kuvatut poly(etyleenikarbomaatti)polymeerit, ovat edelleen osoittautuneet laajemmin käyttökelpoisiksi farmakologisesti aktiivisia yhdisteitä sisältävien, säädellysti lääkeainetta vapauttavien koostumusten matriksimateriaaleiksi, ja erityisesti niillä on uusi, odottamaton ja erittäin toivottu ominaisuus, so. niillä esiintyy ei-hydrolyyttista pintaeroosiota in vivo. Näin ollen keksinnön kohteena esitetään esimerkkejä myös muita lääkeaineita sisältävistä matrikseista, sekä tuodaan esiin menetelmiä mainittujen polymeerien valmistamiseksi ja niitä sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia. Edelleen, IL-6:n käyttö IL-1- ja/tai TNFα-välitteisten tilojen hoitamiseksi on uutta ja odottamatonta (IL-6:n on aikaisemmin uskottu pahentavan monia tällaisia tiloja), näin ollen esillä oleva keksintö tuo edelleen esiin IL-6:n uuden käytön esim. kroonisten, patogeenien indusoimien inflammatoristen tilojen, myeliinikatoa aiheuttavien tautien sekä akuuttien ja hyperakuuttien inflammatoristen tilojen, kuten septisen shokin, hoidossa.

I. IL-1- ja/tai TNFα-välitteisten tautien hoito

Monilla spontaanisti ilmenevillä, kroonisilla inflammatorisilla tiloilla on tuntematon (mahdollisesti autoimmuuni) etiologia ja IL-1:n ja/tai TNFα:n uskotaan olevan niissä välittäjinä. Esimerkiksi, tutkimusjärjestöjen huomio on keskittynyt usean vuoden

ajan multippeliin skleroosiin (MS), joka on lamauttava hermoston häiriö, jolle on tunnusomaista aivoissa ja selkäytimissä esiintyvä hajapesäkkeinen myeliinikato. Vaikka multippelin skleroosin täsmällistä etiologiaa ei täysin ymmärretä, uskotaan, että siihen liittyy vahva autoimmuunikomponentti, mihin viittaa esim. eräiden HLA-antigeenien lisääntynyt esiintyminen tautia sairastavissa potilaissa. Tällä hetkellä saatavilla olevat anti-inflammatoriset lääkeaineet, kuten ACTH (adrenokortikotrooppinen hormoni) tai kortikosteroidit, esim. prednisoni, näyttävät nopeuttavan palautumista akuuteista kohtauksista, erityisesti annettaessa niitä kohtauksen alkuvaiheessa, mutta ne eivät vaikuta taudin taustalla olevaan etiologiaan. Kotikosteroidien tai immunosuppressanttien pitkäaikaisesta annosta voi seurata vakavia sivuvaikutuksia. IFN-β_1:n yhdistelmämuodon on äskettäin osoitettu vähentävän lyhyellä aikavälillä pesäkkeen muodostumista, mutta sen ei ole osoitettu vaikuttavan pitkällä aikavälillä taudin etenemiseen. Hoidon tehon arviointia vaikeuttaa se seikka, että taudin luonnollisessa etenemisessä tapahtuu spontaania oireiden lievittymistä ja kroonista uusiutumista (relapse). Lyhyesti, monen vuoden intensiivisestä tutkimuksesta huolimatta tähän mennessä ei ole olemassa mitään yleisesti hyväksyttyä spesifistä hoitomuotoa tälle hyvin vakavalle taudille.

Eräiden muiden kroonisten inflammatoristen tilojen uskotaan indusoituvan ulkoisten tekijöiden, esim. patogeenien, vaikutuksesta. Esimerkiksi, Lymen tauti on vakava krooninen tila, joka saa alkunsa infektiosta, jonka aiheuttaa puutiaisen kantama Borrelia burgdorferi-spirokeetta. Alun akuuttia vaihetta, jolle on tunnusomaista iholeesiot ja flunssan kaltaiset oireet, seuraa taudin eteneminen krooniseen vaiheeseen, jolle voi olla tunnusomaista niveltulehdus ja krooniset neurologiset epänormaalisuudet. Tautia hoidetaan tavallisesti antibiooteilla ja ei-steroidisilla anti-

inflammatorisilla aineilla, mutta optimaalista hoitoa, joka on erityisesti tarkoitettu kehittyneelle taudille, ei ole vakiinnutettu.

Myös akuuttien tai hyperakuuttien kontrolloimattomien inflammatoristen tilojen aiheuttajana voi olla ulkoiset tekijät, esim. vakavat palovammat tai vakavat infektiot. Esimerkiksi septinen shokki ja etenkin adult respiratory distress -syndrooma (ARDS) on hengenvaarallinen tila, jolle ei tällä hetkellä ole olemassa mitään tehokasta hoitoa. Tauti puhkeaa nopeasti ja kuolleisuus yltää tavallisesti 50 %:iin. Septinen shokki on tavallisesti seurauksena vakavasta bakteeri-infektiosta ja sille on tavallisesti tunnusomaista kuume, jota seuraa usein myöhemmissä vaiheissa hypotermia, verenpaineen vaihtelu (hyperdynaaminen syndrooma), jota seuraa myöhemmissä vaiheissa alhainen verenpaine, metabolinen asidoosi, henkisen toiminnan heikkeneminen ja laajalle levinneet häiriöt elinten toiminnoissa, jotka lopulta johtavat, monissa tapauksissa, kuolemaan. Tavallisimmin septinen shokki saadaan gram-negatiivisen bakteeri-infektion seurauksena (endotoksinen shokki), mutta sen voi saada myös gram-positiivisten bakteeri-infektioiden tai muiden infektioiden seurauksena. Termi "septinen shokki" tässä yhteydessä käytettynä tulee tulkita laajassa merkityksessä shokkitilaksi, ARDS mukaan lukien, joka on seurausta mikrobi-infektiosta, erityisesti bakteeri-infektiosta, vielä erityisemmin gram-negatiivisesta bakteeri-infektiosta.

IL-6 on tunnettu sytokiini. Sen tiedetään olevan hyödyllinen hoidettaessa erilaisia tiloja, esim. trombosytopeniaa ja eräita syöpiä. Keho tuottaa sitä tavallisesti bakteeri-infektioiden vasteena ja sen on todettu olevan osallisena inflammaation, kuumeen ja septisen shokin välityksessä. Se on tehokas immunostimulantti ja kirjallisuudessa todellakin ehdotetaan, että IL-6-aikaansaamat mekanismit aiheuttavat

eräitä autoimmuuni- tai inflammatorisia tauteja, joihin kuuluu systeeminen lupus erytematoosi, multippeli skleroosi ja nivelreuma, sekä septinen shokki.

Siten on hyvin yllättävää havaita, että IL-6 on käyttökelpoinen kroonisten inflammatoristen tilojen (muut kuin glomerulonefriitti) hoidossa, esim. multippelin skleroosin hoidossa, ja akuuttien ja hyperakuuttien inflammatoristen tilojen, esim. septisen shokin, hoidossa. Tämän vaikutuksen mekanismi on epäselvä, mutta sitoutumatta mihinkään erityiseen teoriaan, uskomme, että IL-6 voi suppressoida tai inhiboida feedback-mekanismin kautta muiden sytokiinien, erityisesti TNFα:n ja/tai IL-I:n, ilmentymistä, vapautumista tai toimintaa, luultavasti ylössäätelemällä (upregulating) liukoisen TNFα-reseptorin ja/tai IL-I-reseptorin antagonistin vapautumista ja siten suppressoimalla pääasiallisesti näiden sytokiinien välittämää aktiivisuutta ja siitä seuraavia autoimmuuni-, inflammatorisia tai shokkitiloja. Sellaisten tilojen tapauksessa, joille on ominaista IL-6-välitteiset komplementin aktivoimat antigeeni-vasta-aine (IgG) -kompleksit, erityisesti glomerulonefriitti (jonka tavallisesti aiheuttaa tällaisten kompleksien aggregoituminen munuaisessa), kuitenkin, IL-6:n on havaittu pahentavan tilaa. Siten, olemme osoittaneet, että eläinmalleissa IL-6:lla on parantava vaikutus esimerkiksi MS-taudissa ja Lymen artriitissa, joissa IL-I:n ja/tai TNFα:n uskotaan toimivan pääasiallisina välittäjinä, mutta se pahentaa lupus-hiirissä glomerulonefriittiä, jossa IL-6:n uskotaan olevan suorana välittäjänä. Olemme lisäksi osoittaneet, että IL-6:lla itsellään on parantava vaikutus endotoksisen shokin eläinmallissa, josta vastaavasti uskotaan, että siinä pääasiallisina välittäjinä ovat IL-I ja/tai TNFα.

IL-6:n katsotaan siten olevan käyttökelpoinen aine TNFα:n ja/tai IL-I:n ilmentymisen, vapautumisen tai toiminnan suppressoimiseen tai inhiboimiseen ja

erityisesti inflammatoristen tilojen hoitoon glomerulonefriittiä lukuun ottamatta, sekä septisen shokin hoitoon. Inflammatorisiin tiloihin, joita voidaan hoitaa käyttäen IL-6:ta, kuuluu esimerkiksi artriittiset tilat, erityisesti patogeenin indusoimat artriittiset tilat, esim. Lymen taudin artriitti, bakteerin indusoima artriitti ja polioartriitti; multippeli skleroosi ja muut myeliinikatoa aiheuttavat taudit (so. taudit, joille on tunnusomaista myeliinikato hermoissa, aivoissa ja/tai selkäytimessä ja joihin kuuluu esim. multippeli skleroosi, akuutti hajapesäkkeinen enkefalomyeliitti tai infektion jälkeinen enkefaliitti, optinen neuromyeliitti, korvien soiminen, diffuusi aivojen skleroosi, Schilderin tauti, adrenoleukodystrofia, tertiäärinen Lymen tauti, trooppinen spastinen parapoeesi ja muut taudit, joissa pääasiallisena oireena on myeliinikato, erityisesti autoimmuunivälitteinen myeliinikato); akuutit vaikeat inflammatoriset tilat, kuten palovammat, septinen shokki, aivokalvon tulehdus ja keuhkokuume; ja autoimmuunitaudit, joihin kuuluu polykondriitti, sklerodooma, Wegenerin granulamatoosi, dermatomyosiitti, krooninen aktiivinen hepatiitti, myastenia gravis, psoriasis, psoriaattinen artriitti, Steven-Johnson-syndrooma, idiopaattinen spruetauti, autoimmuuninen inflammatorinen suolistotauti (mukaan lukien esim. haavainen koliitti ja Crohnin tauti), endokriininen oftalmopatia, Gravesin tauti, sarkoidoosi, primaarinen biliaarinen kirroosi, nuoruusiän diabetes (diabetes mellitus tyyppi I), silmän keskikalvon tulehdus (anteriorinen ja posteriorinen), kuiva keratokonjunktiviitti ja keväinen keratokonjunktiviitti sekä interstitiaalinen keuhkofibroosi.

Esillä oleva keksintö tuo siten esiin:

(i) Menetelmän:

TNFα:n ja/tai IL-I:n ilmentymisen, vapautumisen tai toiminnan inhiboimiseksi;

muun inflammatorisen tilan kuin glomerulonef-

riitin hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi;

IL-I- ja/tai TNFα-välitteisen tilan hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi;

minkä tahansa edellä mainitun tilan hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi;

myeliinikatoa aiheuttavan taudin, esim. multippelin skleroosin, hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi;

ulkoisesti indusoidun inflammatorisen tilan hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi;

vaikean akuutin infektion, esim. septisen shokin, aivokalvontulehduksen tai keuhkokuumeen, aiheuttaman inflammatorisen vasteen hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi;

palovammojen hoitamiseksi;

kroonisen, patogeenin indusoiman inflammatorisen tilan, esim. Lymen taudin, hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi;

jolloin menetelmässä tällaista hoitoa tai ennalta ehkäisyä tarvitsevalle kohteelle, esim. nisäkkäälle, esim. ihmiselle, annetaan terapeuttisesti tai ennalta ehkäisevästi tehokas määrä IL-6:ta, esim. TNFα:aa ja/tai IL-I:tä inhiboiva määrä IL-6:ta, esim. rhIL-6:ta (esim. jolloin erityisesti IL-6 annetaan ainoana terapeuttisena tai ennalta ehkäisevänä aineena, tai mahdollisesti annetaan yhdessä antimikrobisten tai vasoaktiivisten aineiden kanssa, esim. mahdollisesti ei yhdessä TNFα-agonistien tai -antagonistien kanssa tai anti-TNFα-vasta-aineen kanssa); mahdollisesti hitaasti vapautuvassa muodossa tai depotmuodossa, esim. yhdistettynä polymeerimatriksin kanssa, esim. tässä hakemuksessa myöhemmin kuvatun poly(etyleenikarbonaatti)matriksin kanssa;

(ii) IL-6:n, esim. rhIL-6:n, käytön sellaisen lääkkeen valmistuksessa, joka on tarkoitettu käytettäväksi kohdan (i) mukaisessa menetelmässä, esim. jonkin edellä kohdassa (i) luetteloidun tilan hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi, jolloin lääke on mahdollisesti

hitaasti vapautuvassa muodossa ja esim. sisältää mahdollisesti lisäksi polymeerimatriksia, esim. tässä hakemuksessa myöhemmin kuvattua poly(etyleenikarbonaatti)matriksia;

(iii) IL-6:n, esim. rhIL-6:n, käytön jonkin edellä kohdassa (i) luetteloidun tilan hoitoon tai ehkäisemiseen; ja

(iv) Farmaseuttisen koostumuksen, joka sisältää IL-6:ta, esim. rhIL-6:ta, käytettäväksi kohdan (i) mukaisessa menetelmässä esim. jonkin edellä kohdassa (i) luetteloidun tilan hoitoon tai ehkäisemiseen, ja farmaseuttinen koostumus on mahdollisesti hitaasti vapautuvassa muodossa sisältäen mahdollisesti lisäksi polymeerimatriksia, esim. tässä yhteydessä myöhemmin kuvattua poly(etyleenikarbonaatti)matriksia; esim. säädellysti lääkeainetta vapauttavan koostumuksen (so. koostumuksen, joka biohajoaa in vivo päiviä, viikkoja tai kuukausia kestävän jakson aikana), joka sisältää IL-6:ta polymeerimatriksissa ja on esim. mikropartikkeli- tai depot-muodossa, esim. jossa polymeerilla esiintyy ei-hydrolyyttista pintaeroosiota in vivo, erityisesti minkä tahansa tässä hakemuksessa kuvatun lääkkeen luovutusjärjestelmän, käytettäväksi minkä tahansa edellä mainitun tilan hoitoon, esim. kroonisen inflammatorisen tilan hoitoon.

IL-6:lla tarkoitetaan mitä tahansa yhdistettä, joka vastaa interleukiini-6:n (tunnetaan myös interferoni beta-2:na (IFN-β_{II}), B-cell stimulatory factor 2 -tekijänä (BSF-2), interleukiini HP-1:nä (HR1), hepatocyte stimulating factor -tekijänä (HSF), hybridoma plasmacytoma growth factor -tekijänä (HPGF) ja 26 kD-tekijänä) tunnettuja muunnelmia. Yhdistelmä-IL-6 on edullinen, vaikka voidaan käyttää myös ei-yhdistelmä-IL-6:ta, esim. IL-6:ta erittävien syöpäsolulinjojen tuottaman mukaista tuotetta. IL-6:ta saadaan kaupallisesti tai sitä voidaan valmistaa tunnetuilla menetelmillä, esim. kuten on kuvattu julkaisuissa EPA 0 220

574, EPA 0 257 406, EPA 0 326 120, WO 88/00 206, GB 2 063 882 tai GB 2 217 327, joiden hakemusten sisällöt liitetään tähän hakemukseen viitteellä. IL-6 voi olla glykosyloitu, ollen esim. eukarioottisoluissa, esim. CHO-soluissa, tuotetun mukainen, tai ei-glykosyloitu, ollen esim. prokarioottisoluissa, esim. E.colissa, tuotetun mukainen. Yhdistelmä-ihmis-IL-6 (rhIL-6) on edullinen, vaikka IL-6:n tiedetään olevan aktiivinen yli lajien siten, että voidaan käyttää myös ei-ihmislähteistä saatua IL-6:ta ja myös tämä sisällytetään esillä olevassa hakemuksessa esitettyyn IL-6:n määrittelyyn. Proteiinit, joiden IL-6-sekvenssissä on vähäisiä vaihteluja, esim. joissa on lisätty, poistettu tai mutatoitu 1, 2, 3 tai useampia aminohappoja; fuusioproteiinit, jotka käsittävät IL-6:n ja jonkin toisen proteiinin; IL-6:n aktiiviset fragmentit ja/tai sellaiset IL-6:n muunnellut, typistetyt tai mutatoidut muodot, joilla on IL-6-aktiivisuutta, on tässä yhteydessä tarkoitettu sisällytettäviksi IL-6:n määrittelyyn.

Sopivat farmaseuttiset koostumukset, jotka sisältävät IL-6:ta yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän laimennusaineen tai kantajan kanssa, ovat tunnettuja. IL-6:ta voidaan antaa parenteraalisesti, esim. injektoitavan liuoksen tai suspension muodossa, esim. teoksessa, Remington's Pharmaceutical Science, 16. painos (Mack Publishing Company, Easton, PA 1980), esitetyn mukaisesti tai analogisesti sen kanssa. Sopiviin kantajiin kuuluu vesipitoiset kantajat, kuten keittosuolaliuos, Ringerin liuos, dekstroosiliuos ja Hankin liuos, sekä ei-vesipitoiset kantajat, kuten jähmetetyt öljyt (fixed oils) ja etyylioleaatti. Tavanomaista parenteraalista antoa varten IL-6 on saatavana lyofilisoidussa muodossa yksikköannosmäärinä, jotka voidaan sekoittaa kantajan kanssa injektointiin sopivan liuoksen tai suspension muodostamiseksi.

Vaihtoehtoisesti, IL-6:ta voidaan antaa käyt-

täen implantoitavaa tai säädellysti lääkeainetta vapauttavaa lääkkeen luovutusjärjestelmää, esim. se voidaan antaa mikropartikkeli- tai depot-muodossa yhdistettynä polymeerin kanssa polymeerimatriksin muodostamiseksi, jolloin lääkeaine vapautuu hitaasti matriksista. Tämä on edullista esim. silloin, kun hoidettava tila on krooninen, esim. krooninen inflammatorinen tila, ja tarvittava hoito kestää viikkoja tai kuukausia. Polymeerilla tarkoitetaan mitä tahansa sopivaa (esim. farmakologisesti hyväksyttävää) lineaarista, suurimolekyylipainoista molekyyliä, joka muodostuu toistuvista yksiköistä (mukaan lukien homopolymeerit, kopolymeerit ja heteropolymeerit) ja joka on mahdollisesti haaroittunut tai ristisilloitettu, ja edelleen, jota voidaan valmistaa esim. polymeroimalla yhtä molekyyliä tai kopolymeroimalla useampaa kuin yhtä molekyyliä (esim. poly(etyleenikarbonaattia) saadaan etyleenioksidista ja hiilidioksidista, kuten alla kuvataan), ja polymeeriketjussa voi mahdollisesti olla muista yksiköistä muodostuvia keskeytyksiä. Edullisesti, polymeeri on lineaarinen ja se muodostuu hiilestä, hapesta ja vedystä ollen esim. poly-DL-laktidi-koglykolidi, polyetyleeniglykoli tai poly(etyleenikarbonaatti). Edullisesti, polymeerilla esiintyy ei-hydrolyyttista pintaeroosiota, ja se on esim. myöhemmin kuvatun poly(etyleenikarbonaatin) mukainen.

Annos luonnollisesti vaihtelee riippuen erityisestä käytetystä IL-6-tyypistä, isännästä, antotavasta ja hoidettavan tilan luonteesta ja vaikeusasteesta. IL-6:ta annetaan suuremmille nisäkkäille, esim. ihmiselle, subkutaanisena injektiona tai säädellysti lääkeainetta vapauttavassa muodossa 0,5 - 30 µg/kg/päivä, edullisesti 2,5 - 10 µg/kg/päivä, suuruisen annoksen tai minkä tahansa muun annoksen, joka on tunnetuissa terapeuttisissa IL-6-sovellutuksissa turvallinen ja tehokas in vivo-aktiivisuutta ajatellen,

esim. verihiutaleita lisäävän annoksen, tuottamiseen. Vaikeiden akuuttien inflammaatioiden tapauksessa, esim. septisessä shokissa, voi olla toivottavaa antaa i.v. suurempia annoksia nopean ja voimakkaan vasteen aikaansaamiseksi. IL-6-antotiheyttä voidaan mahdollisesti harventaa päivittäin tapahtuvasta annosta joka toinen päivä, joka viikko tai pidemmän aikajakson välein tapahtuvaan antoon, kun kyseessä on säädellysti lääkeainetta vapauttavat muodot, jotka ovat edullisimpia annettaessa hoitoa pitkään kestäviä aikajaksoja. IL-6-hoidosta voi seurata viluntunnetta, kuumetta ja flunssan kaltaisia oireita, joita voidaan tavallisesti hoitaa tai ehkäistä antamalla samanaikaisesti ei-narkoottisia analgeetteja, kuten aspiriinia, asetaminofeeniä tai indometasiinia. Muita merkittäviä sivuvaikutuksia esiintyy tavallisesti vain suuremmilla annoksilla, esim. yli 10 µg/kg/päivä suuruisilla annoksilla, ja niitä voidaan tavallisesti helpottaa pienentämällä annosta.

II. Polymeerimatrikseja säädeltyä vapauttamista varten

Esillä oleva keksintö tuo edelleen esiin lääkeaineiden säädeltyyn vapauttamiseen soveltuvia farmaseuttisia koostumuksia, jotka soveltuvat esim. IL-6:n antoon esim. edellä kuvatuissa indikaatioissa, kuin myös muiden lääkeaineiden antoon. Farmaseuttiset koostumukset ovat erityisesti sellaisia, jotka sisältävät poly(etyleenikarbonaatti)polymeereja, joista toisinaan käytetään nimitystä poly(etyleenikarbonaatit) tai PEC:t.

Vaikka tekniikan tasossa tuodaan esiin joitakin esimerkkejä sellaisista poly(etyleenikarbonaateista), jotka on tarkoitettu käytettäväksi lääkeaineen luovutusjärjestelmissä, niin tekniikan tasossa ei ole esitetty esillä olevan keksinnön mukaisia erityisiä polymeereja eikä ole esitetty ei-

hydrolyyttiseen pintaeroosioon in vivo kykeneviä polymeereja. Tekniikan tasossa ei myöskään ole esitetty sellaisia lääkeaineen luovutusjärjestelmiä, jotka on tarkoitettu tässä yhteydessä kuvattujen erityisten lääkeaineiden, esim. IL-6:n, luovuttamiseen, eikä myöskään ehdotettu, että säädellysti lääkeainetta vapauttava järjestelmä olisi edullinen tällaisten lääkeaineiden luovuttamiseen.

Erityisen yllättäviä ovat esillä olevan keksinnön mukaisten polymeerien hajoamisominaisuudet. Yleiseen kemiantietämykseen perustuen on todennäköistä, että karbonaattiesterisidokset on periaatteessa katkaistavissa. Kuitenkin, polykarbonaatit ovat osoittautuneet pysyviksi kohtalaisissa olosuhteissa in vitro.

Julkaisun, Chem. Pharm. Bull. 31(4), 1 400 - 1 403 (1983), mukaan poly(etyleenikarbonaatit) hajoavat in vivo, mutta testattua polymeeria ei ole identifioitu selvästi esim. moderneilla spektroskooppisilla menetelmillä. Sivun 1 402 mukaan in vivo -hajoaminen on selitettävissä vain hydrolyyttisten entsyymien vaikutuksesta johtuvana.

Julkaisussa, Chem. Pharm. Bull. 32(7), 2 795 - 2 802 (1984), esitetään dibukaiinia sisältävien mikropartikkeleiden valmistus käyttäen poly(etyleenikarbonaattia). Vaikka esitys liittyy ensin viitattuun tekniikan tasoon, dibukaiinin vapautumisen ei katsota liittyvän polymeerin in vitro tai in vivo - hajoamismalliin, vaan diffuusioon polymeerin läpi. Julkaisussa ei ole myöskään arvioitu riittävästi testatun poly(etyleenikarbonaatin) fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia.

Julkaisussa, Makromol. Chem. 183, 2 085 - 2 092 (1982), erityisesti sivulla 2 086, hiilidioksidiepoksidipolymeereja pidetään biohajoavina ja julkaisussa esitetään, että alustavat tulokset vahvistavat hiilidioksidi - etyleenioksidipolymeerien biohajoavuuden

ja siten niiden käytön lääkeaineen kontrolloidussa vapauttamisessa. Biohajoavuutta koskevan väitteen tueksi viitataan julkaisuun, Jinko Zoki 3 (Suppl.), 212 (1974). Tämän julkaisun mukaan poly(etyleenikarbonaatti) kuuluu sellaisten yhdisteiden ryhmään, jotka hydrolysoituvat erittäin helposti ja jopa pronaasientsyymillä ei ole vaikeuksia sen hajoittamisessa. Tämä tarkoittaa, että entsymaattinen hydrolyysi in vitro ja in vivo voisi olla mahdollista, sillä pronaasi koostuu hydrolyyttisten entsyymien seoksesta. Kuitenkin, tämä kommentti vaikuttaa hyvin epävarmalta. Olemme käsitelleet esillä olevan keksinnön mukaisia poly(etyleenikarbonaatteja), jotka ovat olleet puristettujen, halkaisijaltaan 5 mm ja painoltaan 25 mg kiekkojen muodossa, 10 mg/ml pronaasilla ja 5 mM $CaCl_2.2H_2O$:lla fosfaatti-puskuroidussa keittosuolaliuoksessa (PBS), pH 7,4, sekä 10 mg/ml pronaasilla E ja 5 mM $CaCl_2.2H_2O$:lla fosfaatti-puskuroidussa keittosuolaliuoksessa, pH 7,4, (37 °C:ssa) eikä mitään hajoamista ole voitu havaita (ks. kuva 1). Pronaasiliuos uusittiin joka päivä.

Nyt on yllättäen havaittu, että eräs valittu joukko poly(etyleenikarbonaatitteja), joilla on tietty etyleenikarbonaattipitoisuus, viskositeetti ja lasittransitiolämpötilaväli ja jotka eivät ole hajotettavissa hydrolyysilla (esim. hydrolyyttisten entsyymien, kuten pronaasin, läsnä ollessa tai emäksisissä olosuhteissa), hajoavat tästä huolimatta in vitro ja in vivo hajoten nimittäin ja yksinomaan pintaeroosiolla. Ilmaisua "pintaeroosio" ("surface erosion") käytetään kirjallisuudessa, erityisesti polyanhydridien ja polyortoesterien hydrolyyttisen hajoamisen yhteydessä, mutta sitä ei ole koskaan määritelty selkeästi.

Pintaeroosiota esiintyy, mikäli massan hajoamista tapahtuu pelkästään polymeeripartikkeleiden pinnassa ilman, että jäljellä olevan polymeerijäännöksen molekyylipaino pienenee. Kun kirjallisuudessa esitet-

tiin, että havaittiin pintaeroosiota, milloinkaan ei oltu suoritettu jäljellä olevan massan molekyylipainomäärityksiä rinnakkaisesti painohävikkimääritysten kanssa ja siten itse asiassa pintaeroosion esiintymistä ei milloinkaan näytetty toteen.

Itse asiassa, melkein kaikkien tähän mennessä testattujen polymeerien tapauksessa havaittiin polymeerirunkoeroosiota (polymer bulk erosion). Sellaisten järjestelmien, joilla esiintyy runkoeroosiota, epäkohtana on, että mikäli polymeeriin on sisällytetty lääkeyhdistettä, esim. peptidiä, joka on suhteellisen epästabiili biologisen väliaineen, johon se tulee vapautumaan, vaikutuksen alaisuudessa, lääkeyhdiste joutuu jo runko-osassa kosketukseen väliaineen kanssa ja voi menettää aktiivisuutensa ennen sen vapautumista polymeerista. Mikäli polymeeri pintaerodoituu, so. kun ei tapahdu runkoeroosiota, sisään suljettu lääkeainеyhdiste, esim. peptidi, voi säilyä suojassa biologisen väliaineen vaikutukselta siihen hetkeen saakka, jolloin progressiivinen pintaeroosio saavuttaa lääkepartikkelit ja lääkepartikkeli vapautuu jäljellä olevan polymeerimassan pinnasta. Sellaisten lääkeainetta luovuttavien polymeerimatriksijärjestelmien tapauksessa, joilla esiintyy pintaeroosiota runkoeroosion vastakohtana, lääkeainepartikkeli altistuu siten lyhyemmäksi ajaksi biologisen väliaineen vahigolliselle vaikutukselle, farmakologisesti aktiivista lääkeainetta voi vapautua polymeerimatriksista pidempään, enemmän ja tasaisemmin.

Polyanhydrideille on äskettäin julkaistuissa julkaisuissa, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90, 552 - 556 (1993) ja 90, 4 176 - 4 180 (1993), kuvattu eräitä pintaeroosio-ominaisuuksia - kuten käyttäytymistä. Kuitenkin, vaikutus näytti kohdistuvan koko runkoon eikä oltu suoritettu mitään molekyylipainomäärityksiä. Lisäksi, tämä eroosio on luonteeltaan hydrolyyttista. Nyt on keksitty, että poly(etyleenikarbonaattien)

eräällä valitulla, alla määritellyllä ryhmällä esiintyy in vitro sekä in vivo yksinomaan ei-hydrolyyttista pintaeroosiota.

Esillä oleva keksintö tuo esiin polymeerin, joka hajoaa in vivo ja in vitro pintaeroosiolla, jota ohjaa ei-hydrolyyttinen mekanismi, ja jossa polymeerissa on kaavan A mukaisia etyleenikarbonaattiyksikköjä

$$-(-C(O)-O-CH_2-CH_2-O-)- \qquad A$$

ja jonka etyleenikarbonaattipitoisuus on 70 - 100 mol-%, intrinsiininen viskositeetti (intrinsic viscosity) 0,4 - 4,0 dl/g, mitattuna kloroformissa, 20 °C:ssa, ja lasitransitiolämpötila 15 - 50 °C.

Esillä olevan keksinnön mukaisen polymeerin etyleenikarbonaattipitoisuus on 70 - 100 mol-%, erityisesti 80 - 100 %, edullisesti 90 - 99,9 %, kuten 94 - 99,9 %. Polymeerin intrinsiininen viskositeetti on 0,4 - 4,0 dl/g, mitattuna kloroformissa, 20 °C:ssa. Edullisesti polymeerin inherentti viskositeetti (inherent viscosity), mitattuna 20 °C:ssa ja 1 g/dl pitoisuudessa kloroformissa, on 0,4 - 3,0 dl/g.

Sen lasitransitiolämpötila on 15 - 50 °C, edullisesti 18 - 50 °C.

Kirjallisuudessa on kuvattu poly(etyleenikarbonaatteja), joiden lasitransitiolämpötila on 5 - 17 °C.

Keksinnön mukaisia polymeereja valmistetaan edullisesti kopolymeroimalla etyleenioksidia ja hiilidioksidia ja tämä valmistusmenetelmä on myös osa keksintöä. Tämän valmistusmenetelmän seurauksena polymeeri sisältää useimmissa tapauksissa kerayksikkönä kaavan B mukaista etyleenioksidiyksikköä

$$-(-CH_2-CH_2-O-)- \qquad B$$

Mikäli keksinnön mukaiset polymeerit altistetaan vesipitoiselle väliaineelle, esim. fosfaattipuskuroidulle keittosuolaliuokselle, pH 7,4, niin käytännöllisesti katsoen niiden runko-osaan ei kulkeudu lainkaan väliainetta, esim. kuten nähdään kuvasta 2. Näin ollen ei tapahdu mitään runkoeroosiota ja jäljellä oleva massa pysyy vakiona (100 %) vähintään 28 päivän ajan, esim. kuten nähdään kuvan 3 oikeanpuoleisesta kuvaajasta.

Poly-DL-laktidi-ko-glykolidit ovat säädellysti lääkeainetta vapauttavien järjestelmien tällä hetkellä kaikkein tavallisimmin käytettyjä matriksimateriaaleja. Tällaiset polymeerit hajoavat kuitenkin, keksinnön mukaisille polymeereille vastakkaisesti, hydrolyysin avulla. Esimerkiksi, massan hajoamista PBS:ssä kuvataan kuvan 3 vasemmalla puolella yhdellä kaikkein sofistukoiduimmista poly-DL-laktidi-ko-glykolidityypeistä, nimittäin glukoosilla aloitetulla poly-DL-laktidi-ko-glykolidilla (DL-PLGGLU), joka on kuvattu UK-patenttijulkaisussa GB 2 145 422.

Ero keksinnön mukaisten poly(etyleenikarbonaattien) ja tekniikan tason mukaisten poly-DL-laktidi-ko-glykolidien (DL-PLG) in vivo hajoamiskäyttäytymisen välillä nähdään myös kuvassa 3. Siinä kun polylaktidi-ko-glykolidissa tapahtuu runkoeroosiota, kuten nähdään DL-PLGGLU:n jäljellä olevan massan pienenevästä molekyylipainosta, niin poly(etyleenikarbonaattien) jäljellä olevan massan molekyylipaino pysyy vakiona (100 %).

Koko implantin jäljellä oleva massa pienenee molemmissa tapauksessa nollaan in vivo 1 kuukauden kuluessa, mikä tarkoittaa, että poly(etyleenikarbonaatissa) tapahtuu pintaerodoituminen runkoerodoitumisen sijasta. Runkoeroosion puuttumisen seurauksena ladattu polymeeri on varastoinnin aikana, so. ennen sen antoa, kosteutta läpäisemätön ja pysyy samassa kuivassa tilassa, jollaiseksi se on valmistettu.

Sen sisään suljettu lääkeaine, mikäli se on herkkä kosteudelle, pysyy stabiilina.

Esillä oleva keksintö tuo myös esiin menetelmän polymeerin valmistamiseksi, jolloin menetelmässä etyleenioksidia ja CO_2:ta polymeroidaan 1:4 - 1:5 moolisuhteessa, katalyytin vaikutuksen alaisuudessa. On selvää, että tämän reaktion puitteissa polymeeriketjuun voi tulla etyleenioksidiyksikköjä, mikäli kaksi epoksidimolekyyliä reagoi keskenään ilman, että CO_2-molekyyli tulee väliin, so. mikäli oksianionivälituote hyökkää toiseen etyleenioksidimolekyyliin ennen karboksyloitumista CO_2:lla. Näin ollen on mahdollista, että polymeeri sisältää useita etyleenioksidiyksikköjä. Keksinnön mukaisessa polymeerissa, mikäli se sisältää etyleenioksidiyksikköjä, etyleenikarbonaatti- ja etyleenioksidiyksikö ovat jakautuneena satunnaisesti seuraavan summakaavan mukaisesti A_m-B_n =

$$-(C(O)-O-CH_2-CH_2-O-)_m-(-CH_2-CH_2-O-)_n$$

jossa

$$\frac{m}{n+m} \times 100 = 70 - 100.$$

Kuitenkin, suurimmalla osalla keksinnön mukaisissa polymeereissa olevista etyleenioksidiyksiköistä on, tilastollisesti, vierusetyleenikarbonaattiyksiköt, erityisesti sellaisissa tapauksissa, joissa etyleeniyksikköjen moolisuhde on pieni. Tämä tarkoittaa, että tällaisissa tapauksissa muodostuneista eetterifunktioista suurin osa on pitkin polymeeriketjua jakautuneena satunnaisesti karbonaattifunktioiden väliin. Keksinnön mukaisten tuotteiden ^{1}H-NMR-spektrit $CDCl_3$:ssa vahvistavat tämän olettamuksen. Niissä esiintyy signaalit etyleenikarbonaattiyksiköille (etyleeniyksiköt kahden karbonaattifunktion välissä) kohdassa δ = n. 4,37 ppm (integraali Ia), yhden karbonaattifunk-

tion ja yhden eetterifunktion välissä oleville etyleeniyksiköille kohdissa n. 4,29 ja 3,73 ppm (integraalit Ib ja Ic) ja kahden eetterifunktion välissä oleville etyleeniyksiköille kohdassa n. 3,65 ppm (integraali Id). Etyleenikarbonaattiyksikköjen (A) osuus lasketaan sitten NMR-tarkkuusrajoissa seuraavan kaavan mukaisesti:

Etyleenikarbonaattiyksikköjen (A) mol-%:

$$\frac{Ia}{Ia + Ib + Ic + Id} \cdot 100$$

Poly(etyleenikarbonaattien) rakenteellisena ominaispiirteenä annetaan usein kirjallisuudessa niiden eetterifunktioiden pitoisuus etyleenikarbonaattipitoisuuden sijasta. Eetterifunktioiden (E) suhde keksinnön mukaisissa polymeereissa voidaan laskea seuraavan kaavan mukaisesti:

Eetterifunktioiden (E) mol-% =

$$\frac{Ic + Id}{Ia + Ib + Ic + Id} \cdot 100$$

PCT-patenttihakemusjulkaisussa WO 92/22 600 valmistetaan poly(etyleenikarbonaatteja), jotka sisältävät etyleenioksidiyksikköjä ja etyleenikarbonaattiyksikköjä 2 - 400 : 2 -moolisuhteessa, mikä tarkoittaa, että polymeeri sisältää vähintään 50 mol-% etyleenioksidiyksikköjä ja siten alle 50 mol-% etyleenikarbonaattiyksikköjä. Hakemuksessa mainitaan polymeerien biohajoavuus ja niiden käyttö bioerodoituvina matrikseina farmakologisesti aktiivisten yhdisteiden säädeltyä vapauttamista varten. Kuitenkin, mitään tuloksia ei ole annettu siitä, että polymeerit todellakin ovat biohajoavia. Yleisesti, poly(etyleenikarbo-

naatit), joilla on näin suuri lukumäärä eetterifunktioita, tuskin ovat biohajoavia. Hakemuksessa ei ole vihjattu millään tavoin polymeerien pintaeroosion mahdollisuudesta.

Patenttijulkaisun US 3 248 415 esimerkeissä kuvataan matalamolekyylipainoisia poly(etyleenikarbonaatteja), joiden Mp = 700 - 5 000 ja jotka sisältävät alle 70 mol-% etyleenikarbonaattiyksikköjä poiketen esillä olevan keksinnön mukaisista polymeereista, eikä julkaisussa ole minkäänlaista mainintaa niiden biohajoavuudesta.

PCT-hakemuksessa WO 89/05 664 kuvataan poly(etyleenikarbonaatteja), jotka sisältävät kuvatussa rakenteessa II etyleenioksidi- ja etyleenikarbonaattiyksikköjä 1 - 8 : 1 -moolisuhteessa, mikä tarkoittaa, että polymeeri sisältää vähintään 50 mol-% etyleenioksidia ja siten korkeintaan 50 mol-% etyleenikarbonaattiyksikköjä poiketen esillä olevan keksinnön mukaisista polymeereista. Vaikka polymeereja esitetään käyttäväksi biohajoaviin lääketieteellisiin laitteisiin, esim. implantteihin, jotka voivat sisältää lääkeyhdistettä, minkäänlaista informaatiota ei esitetä pintaeroosiosta.

Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä etyleenioksidiyksikköpitoisuutta ja siten eetterifunktioiden pitoisuutta, joka viivyttää tai estää polymeerin biohajoamisnopeutta, pienennetään huomattavasti spesifioimalla reaktio-olosuhteet, kuten reaktiokomponenttien kuvatut moolisuhteet, reaktiolämpötila ja lisäksi valitsemalla asianmukainen katalyytti, esim. sellainen, joka on valmistettu $Zn(C_2H_5)_2$:sta ja vedestä tai asetonista tai di- tai trifenolista esim. floroglusiinista, 0,9 : 1 - 1 : 0,9 tai vast. 2 : 1 - 1 : 2 -moolisuhteessa, tai edullisesti valmistettu $Zn(C_2H_5)_2$:sta ja diolista, erityisesti etyleeniglykolista, 0,9 : 1 - 1 : 0,9 -moolisuhteessa.

Menetelmä suoritetaan edullisesti liuottimes-

sa tai orgaanisen liuottimen dispersioainejärjestelmässä, esim. dioksaanissa ja CO_2:ssa. CO_2 saatetaan edullisesti nestemuodossa ja sitä on ylimäärin läsnä. Paine on edullisesti 20 - 70 bar ja lämpötila edullisesti 10 - 80 °C, erityisesti 20 - 70 °C.

Näin saadut keksinnön mukaiset polymeerit sisältävät tavallisesti alle 15 % eetterifunktioita, edullisesti alle 10 %, erityisesti alle 5 %, esim. alle 3 %. Keksinnön mukaisilla poly(etyleenikarbonaateilla), mikäli ne on valmistettu käyttäen etyleeniglykolista tai asetonista ja dietyylisinkistä saatua katalyyttiä, on alhaiset polydispersiteetit (Mw/Mn), tavallisesti alle 5, kuten alle 2,5.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä katalyytin tai sen osan katsotaan olevan ketjunaloittaja (ko)-polymeerille. Kun reaktio loppuu ja ketju valmis, sen lopullinen pääteryhmä on hydroksyyliryhmä. Ketjun vastakkainen pää, josta ketju sai alkunsa, voi olla miehitetty katalyyttiryhmällä tai sen fragmentilla. Mikäli katalyytti valmistetaan etyleeniglykolista ja dietyylisinkistä tai vedestä ja dietyylisinkistä, niin polymeeriketjun molempien päiden oletetaan olevan samanlaiset. Kuitenkin, mikäli katalyytti valmistetaan di- tai trifenolista ja dietyylisinkistä, aromaattinen ryhmä liittyy ketjun siihen päähän, josta ketju alkaa, kun taas ketjun toinen pää on hydroksyyliryhmä. Kuvasta 4 nähdään, että sellainen poly(etyleenikarbonaatti), jossa yksi sen pääteryhmistä on blokattu, esim. aromaattisella aloittajalla, kuten floroglusiinilla, on hitaammin biohajoava. Tästä syystä oletetaan, että polymeeriketjun hajoaminen alkaa päätehydroksyyliryhmästä(-ryhmistä). Vaihtoehtoisesti, voidaan harkita myös myöhempää päätehydroksyyliryhmän derivatisoimista, esim. esteröintiä, päätehydroksyyliryhmien blokkaamiseksi ja keksinnön mukaisten poly(etyleenikarbonaattien) biohajomaisen kontrolloimiseksi. Sopivia pääte-esteriryhmiä ovat bioyhteensopivat esteri-

ryhmät, kuten (C_{1-48})rasvahapon esteriryhmät, edullisesti (C_{1-30})-, erityisesti (C_{1-18})rasvahapon esteriryhmät, esim. etikkahapon ja stearііnihapon esteriryhmät, tai karbonihapon esteriryhmä, esim. etyleenikarbonaattiryhmä, tai pamoiinihapon esteriryhmä tai maito- tai glykoli- tai polymaito- tai polyglykoli- tai polyetikka-ko-glykolihapon esteriryhmä.

Keksinnön mukaiset poly(etyleenikarbonaatit) ovat kuumassa vedessä (90 - 100 °C) stabiileja usean tunnin ajan ilman huomattavaa molekyylipainon pienentymistä. Havaitaan merkittävä lasitransitiolämpötilan lisäys kiehuvalle, kahdesti tislatulle vedelle 5 tunniksi altistuksen jälkeen, esim. aina yli 18 °C:seen saakka, esim. 28 °C. Suorittamalla tämä reaktiovaihe saadaan korkeampi polymeerin puhtausaste. Olemme havainneet, että tällä tavoin käsitellyt polymeerit ovat myös paremmin prosessoitavissa.

Keksinnön mukaisten polymeerien poly(etyleenikarbonaatti)osa ei, edellä mainitun mukaisesti, ole hydrolysoituva, so. vähintään 1 kuukauden aikana käsiteltäessä hydrolyyttisillä entsyymeillä fysiologisissa olosuhteissa tai vedellä pH-arvossa 12 ja 37 °C:ssa (ks. kuva 1 ja 8). Kuitenkin, havaittiin, että keksinnön mukaiset polymeerit hajoavat in vivo ja in vitro pintaeroosiolla superoksidiradikaalianionin, $O_2^{\cdot-}$, vaikutuksen alaisena. Superoksidiradikaalianioneja $O_2^{\cdot-}$ muodostuu inflammatorisissa soluissa in vivo ja ex vivo keksinnön mukaisten poly(etyleenikarbonaattien) läsnä ollessa, kuten nähdään kuvasta 5. Polylaktidi-ko-glykolidit, joita käytetään nykyisin kaikkein useimmin lääkeainetta säädellysti vapauttavien järjestelmien matriksimateriaaleina ja jotka hajoavat runkohydrolyysillä, eivät indusoi superoksidiradikaalianionien $O_2^{\cdot-}$ muodostumista, mikä nähdään samasta kuvasta glukoosilla aloitetun poly-DL-laktidi-ko-glykolidin tapauksessa, jota käytettiin myös kuvan 3 tapauksessa.

In vitro muodostettiin vesipitoinen järjes-

telmä, joka sisälsi kaliumsuperoksidia $O_2^{\cdot-}$-lähteenä, ja osoitettiin keksinnön mukaisten poly(etyleenikarbonaattien) pintaeroosio (ks. kuva 8). In vitro pH-arvoksi valittiin 12, sillä $O_2^{\cdot-}$-radikaali on riittävän stabiili tässä pH-arvossa.

On mielenkiintoista, että poly(propyleenikarbonaatti), joka poikkeaa poly(etyleenikarbonaatista) siten, että etyleeniryhmän vety on korvattu metyyliryhmällä, ei ole lainkaan biohajoava, kuten japanilaiset kirjoittajat ovat osoittaneet julkaisussa, Chem. Pharm. Bull 31(4), 1 400 - 1 403 (1983).

Keksinnön mukaisten poly(etyleenikarbonaattien) mikropartikkelisuspensioilla suoritettiin toksikologinen koe käyttäen 48 rotaa, jolloin koe kesti 21 päivää, ja 24 koiraa, jolloin koe kesti 35 päivää. Kullekin lajille suoritettiin kaksi antoa päivänä 1 ja päivänä 17. Subkutaanisesti ja intramuskulaarisesti 10 ja 40 mg polymeeripartikkeleita/kg kehon painoa annon jälkeen ei havaittu mitään kliinisiä merkkejä systeemisestä toksisuudesta, annolla ei havaittu mitään relevantteja vaikutuksia hematologisiin parametreihin, kliinisen verikemian parametreihin, kehonpainoon ja ruoan kulutukseen. Antokohtia tutkittiin kudospatologisten muutosten osalta 4 ja 21 päivää rotille annon jälkeen ja 18 ja 35 päivää koirille annon jälkeen. Odotetun inflammatorisen reaktion lisäksi ei havaittu mitään epätavallisia kudospatologisia muutoksia.

Keksinnön mukaisten polymeerien hajoamisnopeus voi vaihdella laajoissa rajoissa riippuen niiden molekyylipainosta, niiden etyleenioksidipitoisuudesta, pääteryhmien, esim. bioyhteensopivien esteriryhmien, identtisyydestä ja $O_2^{\cdot-}$-radikaalisieppaajista, esim. C-vitamiinista, ja hajoaminen voi kestää 5 päivän ja 6 kuukauden välillä tai pidempään, esim. jopa 1 vuoden ajan. Radikaalinsieppaajaa voi edullisesti olla suljettu polymeerin sisään lisäaineeksi.

Keksinnön mukaisten (ko)-polymeerien molekyylipaino Mw on 80 000:sta, edullisesti 100 000:sta, edullisemmin 200 000:sta 2 000 000:iin Daltonia määritettynä geelipermeaatiokromatografialla käyttäen metyleenikloridia eluenttina ja polystyreeniä vertailuaineena.

Edellä maintussa julkaisussa, Chem. Pharm. Bull. 32(7) 2 795 - 2 802 (1984), mainitaan, että käytettiin poly(etyleenikarbonaatteja), joiden molekyylipaino oli 50 000 - 150 000 Daltonia. Olemme havainneet, että polymeerien in vitro ja in vivo hajoaminen voidaan saavuttaa tyydyttävässä suhteessa ainoastaan silloin, kun molekyylipaino on yli 80 000, edullisesti yli 100 000 (kuva 6); tämä on esillä olevan keksinnön erityisen edullinen piirre.

Esillä olevan keksinnön mukaisia polymeereja voidaan käyttää farmaseuttisissa koostumuksissa, erityisesti matriksimateriaaleina farmakologisesti aktiivisten aineiden sulkemiseksi niiden sisään. Koska in vitro ja in vivo -olosuhteissa ei tapahdu runkoeroosiota ja polymeeri suojaa aktiivista yhdistettä, aktiivinen yhdiste vapautuu sen tullessa esiin matriksin pintaan (ja ei aikaisemmin) matriksin pintaeroosion vaikutuksesta. Vesipitoisessa in vitro -järjestelmässä, jonka pH-arvo on 7,4 ja joka ei sisällä yhtään $O_2^{\cdot-}$:ta, aktiivista ainetta vapautuu vain hyvin vähäisiä määriä (ks. kuva 9).

Pintaeroosion edelleen eräänä etuna on, että farmakologisesti aktiivisen yhdistemolekyylin koolla ei ole vaikutusta vapautumisnopeuteen.

Esillä oleva keksintö tuo siten esiin farmaseuttisen koostumuksen, joka sisältää farmakologisesti aktiivista yhdistettä polymeerissa, jolloin polymeerimatriksissa esiintyy ei-hydrolyyttista pintaeroosiota aktiivisen yhdisteen vapautumisen ja ei-hydrolyyttisen polymeerimassan hajoamisen välisen korrelaation ollessa erityisesti lineaarista, edullisesti 1 : 1 -

lineaarista, ja polymeerimatriksi suojaa aktiivista yhdistettä.

Koostumuksia käytetään edullisesti mikropartikkeleiden tai implanttien muodossa.

Keksinnön mukaisten farmaseuttisten muotojen valmistus voidaan suorittaa sinänsä tunnetuilla menetelmillä, jolloin mikrokapseleita voidaan valmistaa sopivalla sumukuivaus- tai emulgointitekniikoilla ja implantteja sekoittamalla lääkeaineyhdiste ja poly(etyleenikarbonaatit) keskenään molempien ollessa partikkelimaisessa, kiinteässä tilassa, käyttäen korkeampia lämpötiloja, joissa poly(etyleenikarbonaatit) pehmenevät ja tulevat siten prosessoitaviksi, jonka jälkeen seos mahdollisesti jäähdytetään kiinteään tilaan ja muotoillaan sopivaan muotoon. Edelleen on mahdollista sekoittaa liuonneessa tai dispergoidussa tilassa oleva lääkeyhdiste poly(etyleenikarbonaatin) liuoksen kanssa ja haihduttaa liuotin, jonka jälkeen kiinteä jäännös muotoillaan sopiviin implanttimuotoihin.

Mikropartikkeleita sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia voidaan valmistaa työstämällä niitä sopivien galeenisten apuaineiden kanssa ja mahdollisesti saattamalla niitä sopiviin jakelulaitteisiin.

Lääkeaineen ominaisuuksista ja valmistusmenetelmästä riippuen sisällytetty lääkeainepitoisuus voi vaihdella laajoissa rajoissa ollen suuruusluokkaa 0,001 - n. 70 p-%, esim. 0,001 - 20 p-%, edullisesti 0,001 - 5 p-%. Sisällytetystä suuresta lääkeainemäärästä johtuvaa väliaineen perkoloitumista polymeeriin tulee välttää ja tämä rajoittaa sisällytettävän pitoisuuden ylärajaa.

Lääketieteellisessä käytännössä, lääkeaineyhdisteitä annettaessa voidaan käyttää minkä tahansa tyyppistä farmakologisesti aktiivista yhdistettä yhdistettynä keksinnön mukaisen poly(etyleenikarbonaatin) kanssa. Mikropartikkeleiden tapauksessa käyte-

tään edullisesti sellaisia lääkeaineyhdistetyyppejä, jotka ovat pieninä määrinä farmaseuttisesti aktiivisia ja joiden taso veressä on pysyttävä pitkiä jaksoja keskeytymättömänä, ja tällaisia ovat esim. hormonit, peptidit tai proteiinit, esim. somatostatiinit, interferonit tai interleukiinit, ja erityisesti sellaiset, jotka ovat epästabiileja ja hajoavat oraalisen käytön jälkeen maha-suolisysteemissä ja joita tästä syystä annetaan edullisesti parenteraalisesti.

Keksinnön mukaista depot-valmistetta voidaan käyttää mitä erilaisimpien aktiivisten aineluokkien, kuten ehkäisyvalmisteiden, rauhoittavien aineiden, steroidien, sulfonamidien, rokotteiden, vitamiinien, migreenilääkkeiden, entsyymien, keuhkoputkia laajentavien aineiden, sydänverisuonilääkkeiden, analgeettien, antibioottien, antigeenien, antikonvulsiivien, antiinflammatoristen lääkkeiden, parkinsoninlääkkeiden, prolaktiinin eritystä estävien aineiden, astmalääkkeiden, vanhuusiän lääkkeiden ja malarialääkkeiden, antoon. Aktiivinen aine voidaan valita mitä erilaisempien kemiallisten yhdisteiden joukosta, esim. lipofiilisistä ja/tai hydrofiilisistä aktiivisista aineista, joihin kuuluu peptidit, kuten oktreotidi (kuvattu UK-patenttijulkaisussa GB 2 234 896 A).

Aktiivisia proteiineja tai peptidejä ovat edullisesti sytokiinit, esim. interleukiinit, G-CSF, M-CSF, GM-CSF tai LIF, interferonit, erytropoetiinit, syklosporiinit tai hormonit, tai niiden analogit, kuten oktreotidi.

Farmaseuttisia koostumuksia voidaan käyttää

immunomodulaatioon, jolloin aktiivinen aineosa käsittää sytokiinin, esim. interleukiinin (IL-3, IL-6) tai hematopoietic colony stimulating factors -tekijöitä (G-CSF, esim. filgrastiimi, GM-CSF, esim. molgramostiimi, sargramostiimi, M-CSF), esim. rokotteen adjuvanttina;

aikaansaamaan hematopoieettisen uudelleenmuo-

dostumisen myelosuppressiivisen terapian tai luuydinsiirron jälkeen, jolloin aktiivinen aineosa käsittää hematopoieettisen kasvutekijän, esim. GM-CSF:n, G-CSF:n, IL-3:n, IL-6:n, Leukemia Inhibitory Factor -tekijän (LIF), Stem Cell Factor -tekijän (SCF) tai näiden yhdistelmän;

aikaansaamaan aktiivisen aineosan suuren paikallisen pitoisuuden, esim. jolloin aktiivinen aineosa käsittää lääkeaineen tai sytokiinin, GM-CSF:n, IL-6:n, IL-2:n, IL-4:n tai näiden seoksen, suojaavan immuunivasteen stimuloimiseksi, esim. annettaessa yhdessä säteilytettyjen kasvainsolujen tai rokoteantigeenien kanssa (analogi säteilytetyille kasvainsoluille, jotka on transfektoitu vastaavilla sytokiinigeeneillä);

indusoimaan tehokkaita immuunivasteita, jolloin aktiivinen aineosa käsittää esim. GM-CSF:n annettuna yhdessä antigeenien, erityisesti kasvainantigeenien, virusantigeenien tai bakteeriantigeenien kanssa;

indusoimaan haavan parantumista käyttäen koostumusten paikallista injektiota, esim. jolloin aktiivinen aineosa käsittää GM-CSF:n;

indusoimaan Ag-spesifistä immuunitoleranssia, jolloin aktiivinen aine on esim. GM-CSF yhdistettynä osallisena olevien molekyylien (accessory molecules) (kerareseptorit) estäjien kanssa, erityisesti sellaisten estäjien kanssa, jotka on CD28-B7-vuorovaikutusta varten, CD40-CD40-ligandi-vuorovaikutusta varten, adheesiotekijävuorovaikutuksia varten;

sytostaattihoitoa täydentävään terapiaan, tai rokotteen adjuvanttina, jolloin aktiivinen aineosa on esim. sytokiini, erityisesti interleukiini (IL-3, IL-6) tai sytokiinin eritystä indusoiva aine, esim. lipidijohdannainen, esim. julkaisussa EP 0 309 411, erityisesti esimerkissä 1, kuvattu yhdiste, joka tunnetaan myös nimellä MRL 953;

spesifiseen immuunisuppressioon, esim. jol-

loin aktiivinen aineosa on immunofiliiniä sitova immunosuppressantti, esim. syklosporiini (esim. syklosporiini A), askomysiini (esim. FK506) tai rapamysiini (esim. rapamysiini tai johdannainen, joka on kuvattu julkaisussa WO 94/09 010, esim. 40-O-hydroksietyylirapamysiini);

autoimmuunitautien ja inflammatoristen tilojen hoitoon tai ennalta ehkäisyyn vapauttamalla hitaasti anti-inflammatorisia sytokiineja, esim. IL-6:ta, IL-10:tä tai TGFß:aa; tai interferoneja, esim. IFN-$ß_1$:tä tai betaseronia; tai liukoisia sytokiinireseptoreita tai sytokiinireseptoriantagonisteja, esim. IL-1:lle, TNFα:lle tai IL-4:lle;

allergisten tautien hoitoon tai ennaltaehkäisyyn vapauttmalla hitaasti IgE:lle tarkoitetun suuriaffiniteettisen reseptorin liukoista α-ketjua (Fc_E RI);

syövän hoitoon, esim. oktreotidilla, sytokiineilla, erityisesti interleukiineilla;

selektiiviseen kohdistamiseen esim. leishmaniaasin, sieni-infektioiden, entsyymin varastointisairauden (Tay Sachs, Gauckeritauti) hoitoa varten;

AIDS- tai ARC-terapiaan;

rokottamiseen esim. tetanustoksoidirokotteella;

hematopoeesiin, jolloin aktiivinen aineosa on esim. erytropoetiini;

intra-artikulaariseen injektioon tulehtuneisiin niveliin, jolloin aktiivinen aineosa on anti-inflammatorinen lääkeaine, erityisesti sellainen, joilla ei ole oraalista biohyötyosuutta tai joiden puoliintumisaika on hyvin lyhyt, esim. IL-1ß:aa konvertoivan entsyymin estäjiä, metalloproteaasin estäjiä.

Eräs menetelmä nisäkkään immuunivasteen lisäämiseksi rokotteelle, jossa rokotusta tarvitsevalle nisäkkäälle annetaan tehokas määrä GM-CSF:ää yhdessä

rokotteen kanssa, on kuvattu kansainvälisessä PCT-hakemuksessa WO 94/01 133. Kuitenkin, GM-CSF:ää ei oltu viivästetty huolellisesti esillä olevan keksinnön mukaisella tavalla, jolla aikaansaadaan aktiivisen yhdisteen lähes vakio vapautuminen pidemmän aikajakson kuluessa, minkä ansiosta GM-CSF:n toistuvia antokertoja voidaan vähentää.

Esillä oleva keksintö tuo erityisesti esiin farmaseuttisen koostumuksen, jossa on farmakologisesti aktiivista yhdistettä polymeerissa, jolla esiintyy ei-hydrolyyttista pintaeroosiota, interleukiinin tai CSF:n antamiseksi parenteraalisesti, erityisesti edellä määritellyn mukaisessa polymeerissa.

Esillä oleva keksintö tuo edelleen esiin menetelmän tällaisen koostumuksen antamiseksi kohteelle, jolloin koostumus annetaan parenteraalisesti tällaista hoitoa tarvitsevalle kohteelle.

Esillä olevan keksinnön mukaisia depot-valmisteita voidaan käyttää siihen sisällytetyn erityisen lääkeyhdisteen tunnetuihin indikaatioihin.

Annettavan lääkeyhdisteen ja depot-valmisteen tarkka määrä riippuu lukuisista tekijöistä, esim. hoidettavasta tilasta, halutusta käsittelyn kestosta, lääkeyhdisteen vapautumisnopeudesta ja poly(etyleenikarbonaatin) hajoavuudesta.

Halutut valmisteet voidaan valmistaa tunnetulla tavalla. Farmakologisesti aktiivisen aineen tarvittava määrä ja sen vapautumisnopeus voidaan määrittää perustuen tunnettuihin in vitro tai in vivo -menetelmiin, esim. kuinka kauan jonkin erityisen aktiivisen aineen pitoisuus veriplasmassa pysyy hyväksyttävällä tasolla. Matriksin hajoavuus voidaan myös saada in vitro tai erityisesti in vivo -menetelmillä, esim. jolloin matriksimateriaalien määrä ihonalaisessa kudoksessa määritetään tiettyjen aikajaksojen jälkeen.

Keksinnön mukaiset depot-valmisteet voidaan antaa esim. mikropartikkeleiden muodossa oraalisena,

nasaalisena tai pulomonaalisena, edullisesti subkutaanisena, intramuskulaarisena tai intravenoosisena antona, erityisesti sopivassa nestekantajassa olevan suspension tai implanttien muodossa, esim. subkutaanisesti.

Keksinnön mukaisten depot-valmisteiden anto voidaan toistaa, kun polymeerimatriksi on hajonnut riittävästi, esim. 1, 2 tai 3 viikon kuluttua tai 1 kuukauden kuluttua.

Keksinnön mukaisten poly(etyleenikarbonaatti)matriisien eräänä etuna on, että lääkeaineyhdisteen vapautumisen aikana polymeeriketjut hajoavat molekyylikooltaan pieniksi palasiksi, jotka kulkeutuvat kehonnesteiden mukana antokohdasta pois.

Edullisen oktreotidiyhdisteen tapauksessa akromegaliaa varten esimerkkejä lääkeaineen sisällyttämisestä on parenteraalinen nestemäinen depot-valmiste, joka sisältää mikropartikkeleita, jotka sisältävät peptidiä vähintään 0,1, edullisesti 0,5 - 20 p-% suuruisena määränä (ko)-polymeerimatriksiin nähden, edullisesti 2,0 - 10, erityisesti 3 - 6 p-%. Oktreotidin kokonaisannos akromegaliassa on 20 - 30 mg ja rintasyövässä aina 100 - 200 mg:aan saakka, esim. 1 kuukauden hoitoa varten.

Peptidin vapautumisaika mikropartikkeleista voi olla 5 päivästä noin 2 viikkoon tai pidempään.

Sopivasti, säädellysti lääkeainetta vapauttava valmiste sisältää oktreotidia (ko)-polymeerikantajassa, jolla, annettaessa subkutaanisesti kaniinille tai rotalle 2 mg oktreotidiä kg eläimen kehonpainoa kohti suuruinen annos, veren plasman oktreotidipitoisuus on vähintään 0,3 ng/ml ja edullisesti alle 20 ng/ml pidemmän aikajakson ajan.

Keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset voivat sisältää muita lisäaineita, jotka on edullisesti myös suljettu (ko)-polymeerin sisään, esim. radikaalin sieppaajaa, erityisesti superoksidiradikaa-

lianionin $O_2^{\cdot-}$ sieppaajana. Tällaisen sieppaajan, esim. menadionin tai C-vitamiinin, läsnäolo vähentää poly(etyleenikarbonaatin) hajoamisnopeutta (kuva 7).

Eräs toinen lisäainetyyppi on sieppaaja hydroksyyliradikaalille, jota mahdollisesti muodostuu superoksidiradikaalianionin $O_2^{\cdot-}$ vaikutuksen alaisuudessa, jolloin sieppaaja on esim. polyoli, erityisesti sokerialkoholi, etenkin mannitoli. Tällä lisäaineella havaittiin myös edullista vaikutusta sellaisten koeeläinten kehonpainon lisäykseen, joille oli annettu esim. mikrokapseloitua IL-3:a. Ilman tätä lisäainetta kehonpainon lisäys viivästyi. Kun koostumus on mikropartikkeleiden muodossa, samaa tai jotain muuta lisäainetta voidaan lisätä ulkoisesti olemassa oleviin mikropartikkeleihin, koska lisäaineella on tällöin edullinen vaikutus mikropartikkelisuspension stabiilisuuteen - flokin muodostumista ja saostumista vastaan.

Mikäli läsnä on lisäainetta, niin sen määrä on edullisesti 1 - 90 p-% valmisteen kokonaispainoon nähden.

Edullinen in vitro ja in vivo massan hajoaminen superoksidiradikaalianionin $O_2^{\cdot-}$ vaikutuksen alaisuudessa voidaan nähdä kuvassa 8. Jäljellä olevan massan hajoamiskuvaajat ovat likimain lineaarisia ja niillä on erilainen kulmakerroin, sillä hajoamisolosuhteet in vivo ja in vitro ovat erilaiset. Hajonneen massan määrä aikayksikköä kohti on melkein vakio.

Farmakologisesti aktiivisen yhdisteen, esim. ihmisen IL-3:n, in vivo vapautumisen kuvaajat superoksidiradikaalianionin $O_2^{\cdot-}$ vaikutuksen alaisuudessa ovat hajoamiskuvaajien tavoin likimain lineaarisia (kuva 10), mikä tarkoittaa, että myös vapautuneen lääkeaineyhdisteen määrä yksikköaikaa kohti on melkein vakio.

Sekä ihmisen IL-3:n in vivo -vapautumisen että massan in vivo -hajoamisen yhdistelmä on kuvattu kuvassa 11, josta nähdään 1 : 1 -korrelaatio in vivo massan hajoamisen ja lääkeaineen vapautumisen välillä.

Esimerkit 1 - 5: Poly(etyleenikarbonaattien) yleinen synteesimenetelmä, jossa käytetään dietyylisinkistä ja vedestä valmistettua katalyyttia

Jokaisessa kokeessa käytettyjen reagoivien aineiden, liuottimen, katalyytin jne. määrien osalta ks. taulukko 1.

200 ml kuivaa dioksaania ja 19,5 g (158 mmol) $Zn(C_2H_5)_2$:ta saatettiin 750 ml:n astiaan N_2-atmosfäärissä. Astia varustettiin mekaanisella sekoittajalla, tiputussuppilolla, lämpömittarilla ja N_2-syöttöaukolla. Tiputussuppiloon järjestettiin $CaCl_2$-putki. Liuos jäähdytettiin 10 °C:seen jäähauteessa ja liuos, jossa oli 2,7 ml H_2O:ta dioksaanissa ks. taulukko 1), lisättiin hitaasti siten, että lämpötila pidettiin 10 - 15 °C:een välillä. Reaktioseosta sekoitettiin vielä 45 minuuttia huoneenlämpötilassa, kunnes alunperin väritön liuos muuttui vaaleankeltaiseksi. Tämä katalyyttiliuos siirrettiin autoklaaviin, sitä käsiteltiin 40 g:lla CO_2:ta ja kuumennettiin 125 °C:ssa taulukossa 1 esitetyn ajan. Seos sitten jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja joukkoon lisättiin 560 g (12,7 moolia) CO_2:ta, jonka jälkeen lisättiin hitaasti 132 g (3 moolia) etyleenioksidia 1 tunnin kuluessa. Reaktion annettiin edetä taulukossa 1 esitetyn ajan. Tämän jälkeen painetta pudotettiin hitaasti muutaman tunnin aikana. Tuote, tahmea liete, laimennettiin dioksaanilla ja saostettiin kaatamalla dioksaaniliuos 0,25 M HCl-vesiliuokseen. Sakka liuotettiin asianmukaiseen määrään CH_2Cl_2:ta (2 - 4 litraa), sitä pestiin 0,5 M HCl-vesiliuoksella (2x) ja H_2O:lla (1x). Liuos kuivattiin vedettömällä Na_2SO_4:llä ja haihdutettiin lopulliseen 0,5 - 1,5 litran tilavuuteen liuoksen viskositeetista riippuen. Tuote saostettiin kaatamalla CH_2Cl_2-liuos 4-kertaiseen tilavuuteen metanolia. Valkea sakka suodatettiin pois ja kuivattiin yön yli asetonissa, 0,5 mbar/50 °C. Raakatuote uudelleensaostettiin asetonista myöhempää puhdistamista varten, ks. taulukko 2.

Kaikki tuotteet tuottivat muuten identtiset ^{1}H-NMR-spektrit, paitsi kohdissa 3,65, 3,73, 4,29 ja 4,37 ppm olevien signaalien suhteellisten intensiteettien osalta johtuen eroista etyleenikarbonaattiyksikköpitoisuudessa.

Taulukko 1: Kokeet poly(etyleenikarbonaattien) valmistamiseksi

Esim.	Etyleenioksidi [mol]	CO_2 [mol]	$Zn(C_2H_5)_2$ [mmol]	Dioksaani [ml]	Lämpötila [°C]	Aika [h]
1	3	13.6	158	300	50	64
2	3	9.1	158	300	20	64
3	3	13.6	158	300	20	240
4	3	13.6	158	300	20	40
5	3	13.6	158	300	20	22
6	3	13.6	238	300	50	64

Kaikki kokeet suoritettiin 1,0 litran NB2-autoklaavissa. Moolisuhde $H_2O:Zn(C_2H_5)_2$ = 0,95 kaikille kokeille. Katalyyttia esikäsiteltiin 40 g:lla CO_2:ta, 125 °C:ssa, 1 tunnin ajan, paitsi esimerkissä 1 (10 tuntia).

Taulukko 2: Syntetisoitujen poly(etyleenikarbonaattien) valittuja fysikaalisia ominaisuuksia

Esim.	Mw [kDa]	Mn [kDa]	Mw/mn	Tg [°C]	$^n_{inh}$ Etyleeni [dl/g], karbonaatti $CHCl_3$[a)] pitoisuus [%]
1	141.9	32.2	4.40	19.3	0.6087
2	627.3	133.5	4.70	23.5	1.4691
3	477.0	83.6	5.71	18.7	1.2791
4	758.0	97.5	7.77	20.6	1.7590
5	721.6	80.7	8.95	22.9	2.44[b)]90
6	310.9	103.1	3.02	20.1	88

a) 20 °C:ssa ja 10 mg/ml:n pitoisuudessa, mikäli ei toisin mainita.
b) 1 mg/ml:n pitoisuudessa.

Esimerkit 7 - 11: Poly(etyleenikarbonaattien) yleinen synteesimenetelmä käyttäen dietyylisinkistä ja diolista valmistettua katalyyttia

1. Katalyytin valmistus

200 ml kuivaa dioksaania sijoitettiin kuivaan, 4-kaulaiseen 750 ml:n astiaan typpiatmosfäärissä. Joukkoon lisättiin lasiruiskun avulla 19,50 g (158 mmol) dietyylisinkkiä. Astia varustettiin mekaanisella sekoittajalla, tiputussuppilolla, lämpömittarilla ja argonsyöttöaukolla. Tiputussuppiloon kaadettiin 100 ml kuivaa dioksaania ja se varustettiin kalsiumkloridiputkella. Laitteeseen saatettiin sitten johtumaan argonvirta. Tiputussuppilossa olevaan dioksaaniin lisättiin argonvirrassa 9,00 g (145 mmol, 0,92 mooliekv.) vastatislattua, kuivaa etyleeniglykolia (pidetty molekyyliseulojen päällä). Mekaanisessa sekoituksessa oleva astia jäähdytettiin 10 °C:seen jäähauteessa, argonin alla. Etyleeniglykoliliuosta lisättiin tipoittain sekoitettuun dietyylisinkin dioksaaniliuokseen 30 minuutin kuluessa, jona aikana lämpötila pidettiin 10 - 14 °C:een välillä. Etaanikaasun kehittyminen ja saostuminen havaittiin samanaikaisesti lisättäessä etyleeniglykoliliuosta. Kun lisäys oli saatettu loppuun, jäähdytyshaude poistettiin ja seosta sekoitettiin vielä 60 minuutin ajan antaen sen lämmetä huoneenlämpötilaan. Heterogeeninen seos siirrettiin sitten argonin alla autoklaaviin (1 litran NB2-autoklaavi). Autoklaaviin saatettiin n. 40 g (0,9 mol) hiilidioksidia ja sitä kuumennettiin 125 °C:ssa 1 tunnin ajan, sekoituksessa, katalyytin esikäsittelemiseksi hiilidioksidilla.

2. Polymerointi

Esikäsitellyn katalyytin sisältävä autoklaavi jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja siihen saatettiin vielä 560 g (12,7 mol) hiilidioksidia. Sitten autoklaavissa olevaan sekoitettuun seokseen lisättiin 132 g (3 moolia) etyleenioksidia (99,8 %) injektoimalla sitä hitaasti 1 tunnin aikana. Kun lisäys oli saatettu loppuun, autoklaavi kuumennettiin taulukossa 3 esitettyyn lämpötilaan ja seosta sekoitettiin esitetty aika tässä lämpötilassa.

3. Jälkikäsittely

Autoklaavi jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja paineen annettiin pudota hitaasti atmosfääriseen paineeseen. Tuote, joka oli valkoista tahmeaa lietettä, otettiin kaikkiaan 7 litraan dikloorimetaania, joukkoon lisättiin 1 035 ml 0,4 M HCl-liuosta ja seosta sekoitettiin 3 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Faasit erotettiin ja orgaanista kerrosta pestiin kahdesti 3 litralla 0,5 M HCl-liuosta ja kahdesti 4,5 litralla vettä. Dikloorimetaaniliuos sitten kuivattiin 120 g:lla natriumsulfaattia ja konsentroitiin n. 2 litran lopulliseen tilavuuteen. Tuote saostettiin lisäämällä tämä liuos hitaasti 6 litraan metanolia. Sakkaa kuivattiin 16 tunnin ajan in vacuo 40 °C:ssa raakapolymeerin tuottamiseksi, jota sitten vielä puhdistettiin seuraavasti:

Raakatuote liuotettiin dikloorimetaaniin ja liuos kaadettiin sitten 15 minuutin aikana 5-kertaiseen tilavuuteen asetonia tuotteen saostamiseksi. Sakkaa kuivattiin 16 tuntia in vacuo, 40 °C:ssa, jolloin saatiin vastaavaa poly(etyleenikarbonaattia). Tuotteiden fysikaalisia ominaisuuksia esitetään taulukossa 4. Kaikilla tuotteilla esiintyi voimakkaat IR-absorptiot kohdissa 1 750 ja 1 225 cm^{-1}. Etyleenikarbonaattiyksikköjen 1H-NMR-signaali oli kohdassa 4,37 ppm.

Taulukko 3: Poly(etyleenikarbonaattien) synteesimenetelmä käyttäen dietyylisinkistä ja diolista valmistettua katalyyttia

Esim.	Etyleeni-oksidi	CO_2	Liuotin[a)]	$(C_2H_5)_2Zn$	Dioli[b)]	Reaktio-lämpötila	Raktio-aika
	[mol]	[mol]	[ml]	[mmol]	[mmol]	[°C]	[h]
7	3,0	13,6	300	158	145	20	96
8	3,0	13,6	300	158	145	50	96
9	3,0	13,6	300	158	145	60	96
10	3,0	13,6	300[c)]	158	145	50	144
11	3,0	13,6	300	158	145[d)]	50	96

a) Dioksaani, mikäli ei toisin mainita
b) Etyleeniglykoli, mikäli ei toisin mainita
c) Tetrahydrofuraani liuottimena dioksaanin tilalla
d) 1,4-butaanidioli etyleeniglykolin tilalla.

Taulukko 4: Dietyylisinkistä ja diolista valmistetun katalyytin avulla syntetisoitujen poly(etyleenikarbonaattien) valikoituja fysikaalisia ominaisuuksia

Esim.	Mw [kDa]	Mn [kDa]	Mw/Mn	Tg [°C]	η_{inh} [dl/g], $CHCl_3$[a)]	Etyleeni-karbonaatti-pitoisuus [%]
7	-	-	-	16.7	2.88[b)]	98
8	328.0	149.0	2.20	16.4	0.97	95
9	207.0	103.0	2.00	21.2	0.65	92
10	231.0	83.8	2.76	32.6	0.72	96
11	110.0	53.4	2.06	31.1	0.49	90

a) 20 °C:ssa ja 10 mg/ml:n pitoisuudessa, mikäli ei toisin mainita
b) 1 mg/ml:n pitoisuudessa.

Esimerkki 12: Kokeellinen menetelmä poly(etyleenikarbonaatin) syntetisoimiseksi käyttäen dietyylisinkistä ja floroglusiinista valmistettua katalyyttia

1. Katalyytin valmistus

200 ml kuivaa dioksaania saatettiin kuivaan, 4-kaulaiseen, 750 ml:n astiaan typpiatmosfäärissä. Joukkoon lisättiin lasiruiskun avulla 19,60 g (158,7 mmol) dietyylisinkkiä. Astia varustettiin mekaanisella sekoittajalla, tiputussuppilolla, lämpömittarilla ja argoninsyöttöaukolla. Tiputussuppiloon kaadettiin 100 ml kuivaa dioksaania ja se varustettiin kalsiumkloridiputkella. Laitteeseen saatettiin johtumaan argonvirta. Tiputussuppilossa olevaan dioksaaniin lisättiin argonvirran alla 13,34 g (105,8 mmol, 0,92 mooliekv.) kuivaa floroglusiinia. Mekaanisessa sekoituksessa oleva astia jäähdytettiin 10 °C:seen jäähauteessa ja argonin alla. Floroglusiinin dioksaaniliuos lisättiin tipoittain sekoitettuun dietyylisinkin dioksaaniliuokseen 30 minuutin kuluessa, jona aikana lämpötila pidettiin 10 - 14 °C:een välillä. Etaanikaasun ja saostuman muodostuminen havaittiin samanaikaisesti lisättäessä floroglusiiniliuosta. Kun lisäys oli saatettu loppuun, jäähdytyshaude poistettiin ja seosta sekoitettiin vielä 30 minuutin ajan antaen sen lämmetä huoneenlämpötilaan. Hetereogeeninen seos siirrettiin autoklaaviin (1 litran BN2-autoklaavi) argonin alla. Autoklaaviin saatettiin n. 40 g (0,9 mol) hiilidioksidia ja sitä kuumennettiin 125 °C:ssa sekoituksessa 1 tunnin ajan katalyytin esikäsittelemiseksi hiilidioksidilla.

2. Polymerointi

Esikäsiteltyä katalyyttia sisältävä autoklaavi jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja siihen saatettiin vielä 560 g (12,7 mol) hiilidioksidia. Sitten, 132 g (3 mol) etyleenioksidia (99,8 %) lisättiin autoklaavissa sekoitettuun seokseen injektoimalla sitä hitaasti 1 tunnin aikana. Kun etyleenioksidin lisäys oli saatettu loppuun, autoklaavia sekoitttiin 21 °C:ssa 260 tunnin ajan.

3. Jälkikäsittely

Autoklaavin paine pudotettiin hitaasti atmosfääriseen paineeseen. Tuote otettiin kaikkiaan 4 litraan dikloorimetaania, joukkoon lisättiin 1 035 ml 0,4 M HCl-liuosta ja seosta sekoitettiin 3 tuntia huoneenlämpötilassa. Faasit erotettiin ja orgaanista kerrosta pestiin kahdesti 1,5 litralla 0,5 M CHl-liuosta ja kahdesti 2 litralla vettä. Dikloorimetaaniliuos sitten kuivattiin 120 g:lla natriumsulfaattia ja konsentroitiin lopulliseen n. 1 litran tilavuuteen. Tuote saostettiin lisäämällä tämä liuos hitaasti 3 litraan metanolia. Sakkaa kuivattiin 16 tunnin ajan in vacuo, 40 °C:ssa, jolloin saatiin raakapolymeeria, jota puhdistettiin vielä seuraavasti: Raakatuote liuotettiin dikloorimetaaniin ja liuos lisättiin 5-kertaiseen tilavuuteen asetonia, 15 minuutin kuluessa, tuotteen saostamiseksi. Sakka liuotettiin jälleen dikloorimetaaniin, uudelleensaostettiin metanolista ja kuivattiin 16 tunnin ajan in vacuo 40 °C:ssa, jolloin saatiin vastaavaa poly(etyleenikarbonaattia).

Tuotteen fysikaaliset ominaisuudet:

Mw = 258 000 Da, Mn = 35 600 Da, Tg, 15,4 °C.

IR: voimakkaat absorptiot kohdissa 1 751 ja 1 225 cm^{-1}.

1H-NMR:n mukaan tuotteen etyleenikarbonaattipitoisuus oli n. 96 %.

<u>Esimerkki 13: Kokeellinen menetelmä poly(etyleenikarbonaatin) syntetisoimiseksi käyttäen dietyylisinkistä ja asetonista valmistettua katalyyttia</u>

132 g (3 mol) etyleenioksidia kopolymeroitiin 600 g:n (13,6 mol) CO_2:n kanssa 50 °C:ssa 96 tunnin kuluessa käyttäen katalyyttia, joka oli valmistettu 8,43 g:sta (145,16 mmol) asetonia ja 19,62 g:sta (159 mmol) dietyylisinkkiä.

Katalyytin valmistus sekä polymerointi suori-

tettiin muuten esimerkeissä 7 - 11 kuvatun menetelmän mukaisesti, paitsi että katalyytin valmistamiseksi asetonia käytettiin diolin sijasta.

Näin saadun poly(etyleenikarbonaatin) pitoisuus oli 93 % ja sillä oli seuraavat ominaisuudet: Mw = 233 kDa, Mn = 109 kDa, Mw/Mn = 2,14, Tg = 22,4 °C.

Esimerkki 14: Pääteryhmä-stearoyloidun poly(etyleenikarbonaatin) synteesi

1 g poly(etyleenikarbonaattia), jonka Mw = 153 000 Da, Mn = 68 900 Da, Tg = 29,1 °C), liuotettiin 30 ml:aan kuivaa dikloorimetaania. Liuosta käsiteltiin sitten 0,98 g:lla (12,38 mmol) pyridiiniä ja 10 g:lla (33,0 mmol) stearoyylikloridia. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 48 tunnin ajan, sitten se laimennettiin 50 ml:lla dikloorimetaania ja pestiin peräkkäisesti 2 x 150 ml:lla kyllästettyä natriumbikarbonaattiliuosta ja vedellä. Orgaaninen kerros kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla ja tuote saostettiin lisäämällä tipoittain dikloorimetaaniliuosta 300 ml:aan n-heksaania. Näin saatua raakatuotetta puhdistettiin edelleen liuottamalla se dikloorimataaniin ja saostamalla 3-kertaisesta tilavuudesta dietyylieetteriä. Lopuksi tuote kuivattiin in vacuo 40 °C:ssa 16 tunnin ajan, jolloin saatiin pääteryhmä-stearoyloitua poly(etyleenikarbonaattia).

Mw = 144 000 Da, Mn = 71 000 Da, Tg = 25,6 °C.

Esimerkki 15: Pääteryhmä-asetyloidun poly(etyleenikarbonaatin) synteesi

1 g poly(etyleenikarbonaattia) (jonka Mw = 153 000 Da, Mn = 68 900 Da, Tg = 29,1 °C) liuotettiin 10 ml:aan kuivaa dikloorimetaania. Joukkoon lisättiin 0,98 g (12,38 mmol) pyridiiniä, ja sitten 10,08 g (98,7 mmol) etikkahapon anhydridia. Reaktioseosta se-

koitettiin huoneenlämpötilassa 120 tunnin ajan. Sitten se laimennettiin 50 ml:lla dikloorimetaania ja kaadettiin hitaasti 200 ml:aan kyllästettyä natriumbikarbonaattia. Seosta sekoitettiin 30 minuutin ajan ja sitten kerrokset erotettiin. Orgaanista kerrosta pestiin jälleen 150 ml:lla kyllästettyä natriumkarbonaattia ja lopuksi vedellä. Dikloorimetaaniliuos kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla ja tuote saostettiin lisäämällä sitä tipoittain 300 ml:aan dietyylieetteriä. Sakka liuotettiin jälleen dikloorimetaaniin ja uudelleensaostettiin dietyylieetteristä. Tuotetta kuivattiin 16 tunnin ajan 40 °C:ssa in vacuo, jolloin saatiin poly(etyleenikarbonaattia), jossa oli terminaalinen asetaattiryhmä.

Mw = 150 000 Da, Mn = 69 100 Da, Tg = 26,8 °C.

Esimerkki 16: Poly(etyleenikarbonaatin) puhdistus suorittamalla käsittely kiehuvalla vedellä

1 g poly(etyleenikarbonaattia) (esimerkin 8 mukaista, jonka Mw = 328 000 Da, Mn = 149 000 Da, Tg = 16,4 °C) leikeltiin pieniksi paloiksi ja sekoitettiin 50 ml:ssa kiehuvaa, kahdesti tislattua vettä 2 tunnin ajan. Vesi poistettiin ja korvattiin tuoreella vedellä, jota kuumennettiin jälleen kiehumislämpötilaan. Jälleen 3 tunnin kuluttua polymeeripalaset eristettiin ja niitä kuivattiin in vacuo 40 °C:ssa 16 tunnin ajan. Saadulla tuotteella oli seuraavat fysikaaliset ominaisuudet: Mw = 340 000 Da, Mn = 148 000 Da, Tg = 28,3 °C. Siten lasitransitiolämpötilassa havaittiin dramaattinen kasvu, jota ei voi selittää muutoksella polymeerin molekyylipainossa.

Esimerkki 17: Koostumus (mikropartikkelit), jonka lääkesisältö on 1 % hIL-3:ta

1. Mikropartikkeleita sisältävän lääkkeen valmistus

1 g poly(etyleenikarbonaattia), Mw = 328 000 ja joka on esimerkin 8 mukainen (PEC), liuotettiin sekoituksessa 10 ml:aan metyleenikloridia, jonka jälkeen lisättiin 12,1 mg ihmisen interleukiinia 3 (hIL-3) liuotettuna 0,6 ml:aan vettä. Seosta sekoitettiin voimakkaasti Ultra-Turrax-laitteella yhden minuutin ajan, 20 000 rpm:ssä (= sisempi v/ö-faasi). 1 g gelatiinia A liuotettiin 2 000 ml deionisoitua vettä 50 °C:ssa ja liuos jäähdytettiin 20 °C:seen (= ulompi w-faasi). V/ö-faasi ja v-faasi sekoitettiin voimakkaasti toisiinsa. Tällöin sisempi v/ö-faasi dispergoitui homogeenisesti ulompaan v-faasiin hienojakoisiksi pisaroiksi. Saatua kolmoisemulsiota sekoitettiin hitaasti 1 tunnin ajan. Tällöin metyleenikloridi haihtui ja sisemmän faasin pisaroista muodostui mikropartikkeleita ja ne kovettuivat.

Mikropartikkeleiden sedimentaation jälkeen supernatantti imettiin pois ja mikropartikkelit otettiin talteen vakuumisuodattamalla tai sentrifugoimalla ja niitä huuhdeltiin vedellä gelatiinin poistamiseksi. Lopuksi, mikropartikkelit joko kylmäkuivattiin käyttäen mannitolia bulkkiaineena tai kuivattiin vakuumiuunissa (mannitolia sisltämättömät valmisteet) 72 tunnin ajan ja seulottiin (0,125 mm mesh-koko), jolloin saatiin lopputuotetta.

2. Plasebovalmiste

1 g PEC, jonka Mw = 328 000 ja joka on esimerkin 8 mukainen, liuotettiin sekoituksessa 10 ml:aan metyleenikloridia (sisempi ö-faasi). 1 g gelatiinia A liuotettiin 2 000 ml:aan deionisoitua vettä 50 °C:ssa ja liuos jäähdytettiin 20 °C:seen (= ulompi v-faasi). Ö- ja v-faasit sekoitettiin perusteellisesti toisiinsa. Tällöin ö-faasi dispergoitui homogeenisesti ulompaan v-faasiin hienojakoisiksi pisaroikisi. Saatua emulsiota sekoitettiin hitaasti 1 tunnin ajan ja käsiteltiin vielä edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkit 18 - 26:

Kaikki tästä eteenpäin kuvatut galeeniset valmisteet valmistettiin käyttäen PEC:itä, jotka oli syntetisoitu esimerkin 8, taulukko 3, mukaisesti ja joita oli puhdistettu edelleen esimerkissä 16 kuvattua vastaavasti. Niiden kaikkien Mw oli välillä 300 000 - 450 000, etyleenikarbonaattipitoisuus yli 94 % ja Tg 18 - 50 °C:een välillä.

Esimerkki 18: Koostumus (mikropartikkelit), johon on sisällytetty 0,2 % hIL-2:ta

2,9 mg ihmisen interleukiinia 2 (hIL-2) liuotettiin 1,5 ml:aan vettä ja IL-2:ta sisältävät mikropartikkelit valmistettiin esimerkissä 17 kuvatun mukaisesti. Mikropartikkelit kylmäkuivattiin käyttäen mannitolia bulkkiaineena ja seulottiin (0,125 mm meshkoko), jolloin saatiin lopputuotetta.

Esimerkki 19: Koostumus (mikropartikkelit), johon on sisällytetty 0,2 % hIL-2:ta (vedetön)

Valmisteet valmistettiin esimerkissä 18 kuvatun mukaisesti, kuitenkin siten, että 2,9 mg ihmisen interleukiinia 2 dispergoitiin suoraan orgaaniseen faasiin (PEC liuotettu metyleenikloridiin).

Esimerkki 20: Koostumus (implantit), johon on sisällytetty 0,8 % hIL-3:a

1. Muottipuristus

25 mg mikropartikkeleita, jotka sisälsivät 100 % (paino/paino) poly(etyleenikarbonaattia) (plasebo), 99 % (paino/paino) poly(etyleenikarbonaattia) ja 1 % (paino/paino) ihmisen interleukiini-3:a tai 79,2 % (paino/paino) poly(etyleenikarbonaattia), 20 % (paino/paino) mannitolia ja 0,8 % (paino/paino) ihmisen interleukiini-3:a, muottipuristettiin 3 minuutin ajan 60 - 70 °C:ssa ja 160 bar paineessa implanteiksi (tabletteja), joiden halkaisija oli 5 mm. Tabletteja

säilytettiin 4 °C:ssa, suljetuissa lasiastioissa lääkeaineen vapautumiskokeissa in vitro ja in vivo käyttöön saakka.

2. Lääkeaineen vapautumiskokeet in vitro

Mannitolia sisältämättömiä ja mannitolia sisältäviä ihmisen interleukiini-3-valmisteita ja plasebovalmistetta, aina kolmea tablettia kutakin, ravisteltiin 37 °C:ssa, synteettisessä kasvatusväliaineessa, joka sisälsi 2,5 % (til./til.) N-[2-hydroksietyyli]-piperatsiini-N'-[2-etaanisulfonihappoa] (1 m), 10 % (til./til.) vasikansikiöseerumia ja 2 % (til./til.) penisilliini/streptomysiiniliuosta. Näytteitä otettiin väliaineesta 0,5, 1, 2, 5 tunnin ja 1, 2, 3, 7, 14, 20 päivän kuluttua, jonka jälkeen väliaine uusittiin. Näytteissä olevan ihmisen interleukiini-3:n pitoisuus mitattiin ELISA:lla.

3. Lääkeaineen vapautumiskoe in vivo

Urosrotat, joita pidettiin optimiolosuhteissa, nukutettiin inhalaloitavalla nukutusaineella ja kuhunkin rottaan implantoitiin ihonalaiseen ihopussiin yksi tabletti ihmisen interleukiini-3-valmisteita ja plasebovalmistetta. 1, 4, 7, 14, 21 päivien jälkeen rotat tapettiin antamalla yliannos inhaloitavaa nukutusainetta. Jäljellä olevat tabletit otettiin ulos, irrotettiin niihin tarttunut kudos ja ne kuivattiin. Tablettien painohävikki määritettiin gravimetrisesti. Tämän jälkeen jäljellä olevista tableteista mitattiin ihmisen interleukiini-3:n pitoisuus käyttäen HPLC:tä ja ELISA:aa.

Esimerkki 21: Koostumus (v/ö/v-mikropartikkelit), johon on sisällytetty 0,0002 - 2 % hIL-2:ta

4 g PEC:tä liuotettiin magneettisekoituksessa 80 ml:aan metyleenikloridia. Tähän liuokseen lisättiin asianmukainen määrä IL-2:ta (113,2 mg 2 %:isen tapauk-

sessa, 11,32 mg 0,2 %:isen tapauksessa jne.) liuotettuna 6 ml:aan tislattua vettä tai muutaman tipan etanolia sisältävää vettä. Seosta sekoitettiin voimakkaasti Ultra-Turrax-laitteella IL-2-liuoksen dispergoimiseksi polymeerifaasiin (= sisempi v/ö-faasi). 1 g gelatiinia A liuotettiin 200 ml:aan 1/15 M fosfaattipuskuriliuosta (pH 7,4) 50 °C:ssa ja liuos jäähdytettiin 20 °C:seen (= ulompi v-faasi). V/ö- ja v-faasit sekoitettiin perusteellisesti toisiinsa. Siten sisempi v/ö-faasi erottui pieniksi pisaroiksi, jotka dispergoituivat homogeenisesti ulompaan v-faasiin. Saatua kolmoisemulsiota sekoitettiin hitaasti 1 tunnin ajan. Tällöin metyleenikloridi haihtui pois ja sisemmän faasin pisaroista kovettui mikropartikkeleita.

Mikropartikkeleiden sedimentoinnin (tai sentrifugoinnin) jälkeen supernatantti imettiin pois ja mikropartikkelit otettiin talteen vakuumisuodatuksella ja niitä huuhdeltiin vedellä gelatiinin poistamiseksi. Lopuksi mikropartikkeleita kuivattiin vakuumiuunissa 24 tunnin ajan ja ne seulottiin lopputuotteen saamiseksi.

Kapseloinnin tehokkuus (encapsulation efficiency), testattuna HPLC:n ja biomäärityksen avulla, oli 10 - 100 %:n välillä.

Esimerkki 22: Koostumus (k/ö/v- (kiinteä/öljy/vesi-) mikropartikkelit), johon on sisällytetty 0,0002 - 2 % IL-2:ta

Valmisteet valmistettiin muuten esimerkissä 21 kuvatun mukaisesti, paitsi että IL-2:ta ei liuotettu veteen. IL-2:n liuottamisen sijasta lääkeaine dispergoitiin suoraan polymeerifaasiin (= ö-faasi). Kapseloinnin tehokkuus, testattuna HPLC:n ja biomäärityksen avulla, oli 10 - 100 %:n välillä.

Huomattakoon: Polymeerin, metyleenikloridin, veden ja lääkeaineen määrä voi vaihdella laajoissa rajoissa tuotteen laadun muuttumatta. Lääkeainetta

saadaan sisällytettyä suurempia määriä, aina 20 %:iin saakka. Ulommassa faasissa gelatiini korvataan muilla emulgoivilla aineilla, kuten polyvinyylialkoholilla jne., ja/tai emulgointiaineen/puskurin pitoisuutta muutetaan. Kuvatut erotus- ja kuivausmenetelmät korvataan muilla hyvin tunnetuilla farmaseuttisilla menetelmillä, kuten suodatuksella, lyofilisoinnilla ja sumukuivauksella.

Esimerkki 23: Koostumus (v/ö/v- ja k/ö/v-mikropartikkelit), johon on sisällytetty 1 % hGM-CSF:ää

Valmistus suoritettiin esimerkeissä 21 ja 22 kuvattujen menetelmien mukaisesti. Näissä kuvatun mukaisesti valmistetaan k/ö/v- ja v/ö/v-valmisteet. Kuitenkin, v/ö/v-valmisteissa kapseloinnin tehokkuus oli 60 %, kun taas k/ö/v-valmisteissa ilmeni alhaisempia kapseloinnin tehokkuuksia.

Esimerkit 24: Koostumus (v/ö/v- ja k/ö/v-mikropartikkelit), johon on sisällytetty 1 - 10 % oktreotidi-pamoaattia (SMS-PA)

Valmistus suoritettiin esimerkeissä 19 ja 20 kuvattujen menetelmien mukaisesti. Kuitenkin, SMS-PA ei ole vesiliukoinen. Siten v/ö/v-valmisteiden tapauksessa, lääkeaine dispergoitiin, ei liuotettu, veteen. Kapseloinnin tehokkuus, joka määritettiin HPLC:n avulla, oli 20 - 100 %:n välillä.

Esimerkki 25: Koostumus (v/ö/v- ja k/ö/v-mikropartikkelit), johon on sisällytetty 1 - 10 % oktreotidi-asetaattia

Valmistus suoritettiin esimerkeissä 21 ja 22 kuvatun menetelmän mukaisesti. Kapseloinnin tehokkuus määritettiin HPLC:n avulla ja se oli 2 - 40 %:n välillä, mikä on selvästi alhaisempi kuin lipofiilisen SMS-PA:n tapauksessa.

K/ö/v-valmisteissa saatiin korkeampia arvoja aktiivisen yhdisteen lyofilisoidun materiaalin (pienempi lääkeainepartikkeli) käytön jälkeen.

Esimerkki 26: Oktreotidipamoaatin (SMS-PA) vapautuminen kaniineissa olevista mikropartikkeleista ja kaniineissa ja rotissa olevista implanteista

Poly(etyleenikarbonaatti)kiekkojen ihonalainen implantointi tai poly(etyleeni)karbonaatti)mikropartikkeleiden (lääkeainesisältö 1,95 %) injektio, määränä n. 2 mg lääkeainetta/kg kehonpaino, suoritettiin uroskaniineille (chinchilla bastard, kehonpaino n. 3 kg) ja kiekkojen ihonalainen implantointi urosrotille (Wistar, kehon paino n. 375 g). Rottaa ja kaniinia kohti annettiin n. 40 tai vast. 300 mg lääkeainetta sisältävä polymeerimäärä mikropartikkeleiden muodossa, jotka oli vast. puristettu implantiksi puristetussa tai suspensiona.

Rotille ja kaniineille tarkoitettujen impanttikiekkojen halkaisija oli 0,5 ja vast. 1 cm ja ne oli valmistettu esimerkissä 20 kuvatun mukaisesti.

Lääkeaineen vapautumisen määrittämiseksi verinäytteitä kerättiin 14 ja 21 päivän ajan rotilta ja vast. kaniineilta ja lääkeainejäänteet mitattiin implanteista radioimmunomääritysmenetelmällä ja HPLC:llä.

Voitiin havaita samanlainen lineaarinen korrelaatio poly(etyleenikarbonaatin) painohävikin ja SMS-PA:n vapautumisen välillä (kuva 13) kuin oli esitetty suurimolekyylipainoisen hIL-3:n tapauksessa (kuva 11). Implantoidusta materiaalista oli hajonnut 3 viikossa maksimissaan 75 % kaniineihin annon jälkeen, implantoidusta materiaalista oli hajonnut 2 viikossa maksimissaan 95 % rottiin annon jälkeen.

Inflammaatioreaktio (mukaan lukien polymorfonukleaarileukosyyttien ja muiden solujen invaasio) on välttämätön edellytys poly(etyleenikarbonaatin) bioha-

joamiselle. Inflammattioreaktion kulun voidaan olettaa olevan lajispesifinen, jolloin lääkeaineella saadaan lajispesifisiä plasmatasoprofiileja. Tämä havaittiin SMS-PA:n tapauksessa (kuva 12). Rotissa poly(etyleenikarbonaattien) hajoaminen oli paljon nopeampaa kuin kaniineissa. Kaniineissa SMS-PA-plasmatasot kohoavat hitaasti saavuttaen vakion vapautumisen vaiheen n. päivänä 9 ja vaihe kestää vähintään päivään 21 saakka.

Esimerkki 27: Koostumus (v/ö/v-mikropartikkelit), johon on sisällytetty 0,0002 - 2 % rhIL-6:ta

4 g PEC:tä liuotetaan magneettisekoituksessa 80 ml:aan metyleenikloridia. Tähän liuokseen lisätään asianmukainen määrä rhIL-6:ta (113,2 mg 2 %:isen tapauksessa, 11,32 mg 0,2 %:isen tapauksessa jne.) liuotettuna 6 ml:aan tislattua vettä tai muutaman tipan etanolia sisältävää vettä. Seosta sekoitetaan voimakkaasti Ultra-Turrax-laitteella IL-6-liuoksen dispergoimiseksi polymeerifaasiin (= sisempi v/ö-faasi). Gelatiinia A liuotetaan 1 g 200 ml:aan 1/15 M fosfaattipuskuria (pH 7,4) 50 °C:ssa ja liuos jäähdytetään 20 °C:seen (= ulompi v-faasi). V/ö-ja v-faasit sekoitetaan perusteellisesti toisiinsa. Tällöin sisempi v/ö-faasi erottuu pieniksi pisaroiksi, jotka dispergoituvat homogeenisesti ulompaan v-faasiin. Saatua kolmoisemulsiota sekoitetaan hitaasti 1 tunnin ajan, jolloin metyleenikloridi haihtuu pois ja sisemmän faasin pisaroista kovettuu mikropartikkeleita.

Mikropartikkeleiden sedimentaation (tai sentrifugoinnin) jälkeen supernatantti imetään pois ja mikropartikkelit otetaan talteen vakuumisuodatuksella ja niitä huuhdellaan vedellä gelatiinin eliminoimiseksi. Lopuksi, mikropartikkeleita kuivataan vakuumiuunissa 24 tunnin ajan ja ne seulotaan lopputuotteen saamiseksi.

Kapseloinnin tehokkuus, testattuna HPLC:n ja

biomäärityksen avulla, on 10 - 100 %:n välillä.

Esimerkki 28: Koostumus (k/ö/v-mikropartikkelit), johon on sisällytetty 0,0002 - 2 % rhIL-6:ta

Valmisteet valmistettiin muuten esimerkissä 27 kuvatun mukaisesti, mutta IL-6:ta ei liuotettu veteen. Il-6:n liuottamisen sijasta lääkeaine dispergoitiin suoraan polymeerifaasiin (= ö-faasi). Kapseloinnin tehokkuus, testattuna HPLC:n ja biomäärityksen avulla, on 10 - 100 %:n välillä.

Huomattakoon: Polymeerin, metyleenikloridin, veden ja lääkeaineen määrä voi vaihdella laajoissa rajoissa vaikuttamatta tuotteen laatuun. Lääkeainetta saadaan sisällytettyä korkeampia määriä, aina 20 %:iin saakka. Ulommassa faasissa gelatiini korvataan muilla emulgoivilla aineilla, kuten polyvinyylialkoholilla jne. ja/tai emulgoivan aineen/puskurin pitoisuutta muutetaan. Kuvatut erotus- ja kuivausmenetelmät korvataan muilla hyvin tunnetuilla farmaseuttisilla menetelmillä, kuten suodatuksella, lyofilisoinnilla ja sumukuivauksella.

Esimerkit 29 - 31: IL-6:n käyttö TNFα/ja tai IL-1 -välitteisten tilojen hoidossa

Esimerkki 29: Multippelin skleroosin eläinmalli: Kroonisesti uusiutuva, Lewis-rottaan kokeellisesti indusoitu allerginen enkefalomyeliittimalli (CR-EAE)

Rottaan kokeellisesti indusoitu allerginen enkefalomyeliitti (EAE) on hyvin tutkittu kokeellinen malli ihmisten multippelille skleroosille. [Paterson, ADV. IMMUNOL. 5 (1966) 131 - 208; Levine et al., AM. J. PATH. 47 (1965) 61; McFarlin et al, J. IMMUNOL. 113 (1974) 712; Borel, TRANSPLANT & CLIN. IMMUNOL. 13 (1981) 3]. Rottiin injektoidaan toisen lajin hermokudosta yhdessä adjuvantin kanssa ja saatu allerginen

vaste johtaa sellaisiin leesioihin rotan hermoissa, jotka jäljittelevät multippelissa skleroosissa muodostuvia autoimmuunileesioita. Rotat halvautuvat osaksi tai kokonaan ja taudin vaikeusastetta mitataan yhdessä koelääkeaineiden annon kanssa ja ilman koelääkeaineiden antoa. Monet lääkeaineet, kuten steroidit ja immunosuppressoivat aineet ovat aktiivisia taudin käynnistymisen hidastamisessa, mutta niillä ei voida estää uusiutumisia kun tauti on puhjennut.

Kroonisesti uusiutuvaa, kokeellisesti indusoitua allergista enkefalomyeliittimallia (CR-EAE) [Fe_rer et al., J. NEUROIMMUNOL: 10 (1985) 159 - 166] pidetään siten erityisen vaativana mallina, joka jäljittelee läheisesti todellisia vaikeuksia hoidettaessa multippeli skleroosi -potilaita, joilla tauti on puhjennut. Tässä mallissa tauti indusoidaan injektoimalla marsun selkäytimen ja Mycobacterium tuberculosis'illa rikastetun Freund's complite -adjuvantin seosta. Tyypillisesti, herkistetyistä rotista 75 - 80 %:lla kehittyy CR-EAE, jossa esiintyy 2 - 3 kliinistä uusiutumista ensimmäisen 40 päivän aikana. Kun on kulunut 60 - 80 päivää, noin 50 % rotista, joilla on CR-EAE, esiintyy vielä uusiutumisia, joita seuraa täydellinen toipuminen vain 35 %:illa kaikista tapauksista. Näistä eläimistä jäljelle jäävällä 65 %:illa taudin tila on progressiivinen. Lääkehoito alkaa päivänä 16 ensimmäisestä tautikohtauksesta toipumisen jälkeen.

Yhdistelmä-ihmisinterleukiinia 6 (rh IL-6, Sandoz), joka oli liuotettu keittosuolaliuokseen, injektoitiin i.p. joka 2. päivä alkaen päivänä 16 ja käyttäen 10 mikrogrammaa IL-6:ta rottaa kohti (n, 50 µg/kg). Kontrollieläimet ja IL-6-ryhmän eläimet saivat tavanomaisen vaikean tautikohtauksen (akuutti) päivinä 11 - 14. Vaikeusasteikolla, joka käsitti 0 = ei tautia - 4 = eläin täysin halvaantunut, kontrolliryhmän keskimääräinen arvo oli 3,0 ja IL-6-ryhmän keskimääräinen arvo oli 3,2. IL-6:n anto joka toinen päivä lähtien

päivästä 16 ja päättyen päivään 30 (kaikkiaan 7 antoa) tuotti taudin lähes täydellisen estymisen. Vain yhdellä viidestä IL-6-käsitellystä rotasta esiintyi lievä toinen tautikohtaus (vaikeusaste 0,4). Viidestä kontrollieläimestä viidellä esiintyi toinen tautikohtaus keskimääräisen vaikeusasteen ollessa 1,8 päivän 16 jälkeen ja kolmas tautikohtaus päivinä 22 - 29. IL-6-käsitellyssä ryhmässä ei havaittu mitään muita uusiutumisia.

Esimerkki 30: Artriitin eläinmalli: Borrelia-indusoitu artriitti vaikeaa yhdistettyä immuunipuutosta (severe combined immunodeficiency, SCID) sairastavissa hiirissä

Lymen artriitti (tai Lymen taudin artriitti) edustaa ainutlaatuista kroonisen artriitin muotoa, sillä sen aloittava tapahtuma tunnetaan varmuudella. Tauti on yksi tunnetuista infektion indusoimista ilmiöistä, jonka infektion aiheuttaa puutiaisen kantama Borrelia burgdorferi -spirokeetta. Lymen artriittia sairastavien potilaiden synoviaalileesiot muistuttavat läheisesti nivelreumaa sairastavien potilaiden synoviumia. Molemmissa potilasryhmissä voidaan havaita synoviaalisisäsolun (synovial lining cell) hypertrofiaa, synoviaalisoluhyperplasiaa, vaskulaariproliferaatiota ja mononukleaarisolujen infiltraatiota subsynoviaalisisäalueissa. Monia plasmasoluja, suuriendoteliaalipikkulaskimoita, yksittäisiä makrofageja ja muutamia dendriittisiä soluja on löydetty voimakkaan MHC-luokan II antigeenin esiintymisen kanssa. Lisäksi, sytokiineja, kuten IL-1:tä, IL-6:ta ja TNF-alfaa, on todettu synoviaalinesteessä, joka on saatu erilaisia artriitteja sairastavilta potilailta, mikä viittaa siihen, että näillä sytokiineilla voi olla myötävaikutusta niveltuhon patogeneesiin. Äskettäin Lymen artriitille on kehitetty hiirimalli SCID-hiirissä, joilta puuttuu funktionaaliset T- ja B-solut (M. M. Simon, et

al. (1991) Immunology Today 12: 11). Immunopuutoshiirien infektio Borrelia burgdorferi'lla johtaa tunnettuun ja pysyvään oligoartriittiin. SCID-hiiriin Borrelia-indusoitu artriitti reagoi kortikosteroideille (predinisoloni 30 mg/kg sc), mutta ei immunosuppressiivisille aineille, kuten SIM:lle (syklosporiini A), annosten ollessa aina 30 mg/kg s.c. saakka. Sitä pidetään hyvänä mallina sytokiinin ohjaamalle artriitille, joka käsittää sellaiset muut artriittityypit, joiden alkuun saavaa tapahtumaa ei tunneta varmuudella.

Kuuden viikon ikäisiin C.B-17 SCID-hiiriin (homotsygoottinen SCID-mutaatiolle, saatu Bomholtgard'lta, Tanska, 5 - 6 eläintä/ryhmä) inokuloitiin 100 mio. Borrelia burgdorferi-organismia s.c.-injektiolla hännän tyveen. Kontrollieläiminä käytettiin immunokompetentteja C.B-17-hiiriä (sama lähde). Niihin ei kehity mitään tautia injektoitaessa Borrelia burgdorfi'a. Yhdistelmä-ihmis-IL-6 (rhIL-6, Sandoz, kantaliuos 5 mg/ml) laimennettiin fysiologisella keittosuolaliuoksella ja sitä annettiin 5 kertaa viikossa kaikkiaan 17 injektion verran annoksen ollessa 10 mikrogrammaa/hiiri i.p. Hiiriltä tarkastettiin päivittäin sokkokokeen tapaan, näkyikö tibiotarsaali- ja ulnakarpaalinivelissä kliinisiä merkkejä artriitista. Kliininen artriitti pisteytettiin seuraavien parametrien mukaisesti:

- ei merkkejä
? merkit kyseenalaisia
(+) nivelten punoitusta
+ hieman turvotusta
++ kohtalaista turvotusta
+++ tibiotarsaali- ja ulnakarpaalinivelissä vaikea-asteista turvotusta

Kun kliininen artriitti oli huipussaan, hiiret tapettiin ja nivelet kiinnitettiin Schafferin liuoksessa, upotettiin muoviin 9 100 ja värjättiin hematoksiliinieosiinilla.

Ryhmä	Kliiniset merkit (turvonneiden nivelten lkm/kaikki) päivinä					
	13	14	15	16	17	20
Kontrolli	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
SCID, ei IL-6	6.5/36	12.5/36	15/36	21/36	30/36	35/36
% artr. lev.	18 %	35 %	42 %	58 %	83 %	97 %
SCID,IL-6-käsitelty	4/30	3.5/30	11/30	7.5/30	12/30	10.5/30
% artr. lev.	13 %	12 %	37 %	25 %	40 %	35 %

SCID-hiiret, joita ei ole käsitelty IL-6:lla, kehittävät vaikean artriitin, joka johtuu Borrelia burgdorferi-infektiosta ja alkaa n. päivänä 13 antigeeni-injektiosta. rhIL-6:n pieni annos vähentää artriitin vaikeusastetta keskimäärin 60 - 75 %:lla kaikissa siihen sairastuneissa eläimissä.

Esimerkki 31: Septisen shokin eläinmalli

Päätettiin tutkia IL-6:n vaikutuksia hiiren endotoksiinishokkimalliin, jossa käytetään d-galaktosamiinilla herkistettyjä hiiriä, koska tämä on ihmisen spetiseen shokkiin laajasti käytetty malli. Menetelmämme ja tulokset ovat seuraavat:

18 - 22 g painavat OF1-hiiret herkistettiin 0,2 ml:n i.p. PBS-liuosinjektiolla, joka sisältää 0,15 mg/kg lipopolysakkaridiendotoksiinia (LPS) ja 500 mg/kg d-galaktosamiinia. Hiiret jaettiin 10 hiiren ryhmiin ja niitä käsiteltiin seuraavasti:

Koe 1

Aika	11:00	14:00	16:00
Ryhmä 1:	PBS	LPS + d-GAL	PBS
Ryhmä 2:	IL-6 (50 µg)	LPS.+ d-GAL	PBS
Ryhmä 3:	PBS	LPS.+ d-GAL + IL-6 (50 µg)	PBS
Ryhmä 4:	PBS	LPS.+ d-GAL	IL-5 (50 µg)

Koe 2

Aika	11:00	14:00	16:00
Ryhmä 1:	PBS	LPS + d-GAL	PBS
Ryhmä 2:	IL-6 (50 µg)	LPS.+ d-GAL	PBS
Ryhmä 3:	PBS	LPS.+ d-GAL + IL-6 (100 µg)	PBS
Ryhmä 4:	PBS	LPS.+ d-GAL + IL-6 (20 µg)	PBS
Ryhmä 5:	PBS	LPS.+ d-GAL + IL-6 (5 µg)	PBS
Ryhmä 6:	PBS	LPS.+ d-GAL + IL-6 (0.8 µg)	PBS
Ryhmä 7:	PBS	LPS.+ d-GAL + IL-2 (100 µg)	PBS
Ryhmä 8:	PBS	LPS.+ d-GAL + IL-4 (50 µg)	PBS
Ryhmä 9:	PBS	LPS.+ d-GAL	IL-6 (50 µg)

rhIL-6 (ILS 969, Sandoz), rhIL-2 (Sandoz) ja rhIL-4 (Sandoz) laimennettiin PBS:ään. Kaikki injektiot (0,2 ml:n tilavuus) annettiin intraperitoneaalisesti. Ryhmässä 3 (koe 1) ja ryhmissä 3 - 8 (koe 2) IL-6 ja IL-2 laimennettiin LPS/d-GAL-liuokseen siten, että hiiret saivat yhden 0,2 ml:n injektion. Suluissa annetut luvut viittaavat kullekin hiirelle annettuun interleukiiniannokseen. PBS:ää täytyi antaa useita kertoja eri aikoina ennen tai jälkeen LPS-altistusta ryhmän sisäisen, käsittelystä johtuvan stressin laukaisemien vasteiden vaihtelun kontrolloimiseksi.

Hiiren eloonjäämistä tarkkailtiin 48 tunnin ajan. Tilastollista laskentaa varten käytimme Khiineliötestiä. Kuten kuvasta 1 nähdään, 24 tunnin kuluttua LPS-altistuksen jälkeen kymmenestä kontrollihiiristä kuoli 9. IL-6-käsittely 3 tuntia ennen LPS-injektiota tai 2 tuntia LPS jälkeen LPS-injektion jälkeen vähensi kuolleisuuden 60 %:iin ($p = 0,12$) ja vast. 70 %:iin ($p = 0,26$). Toisaalta, LPS-altistuksen hetkellä annettu IL-6 vähensi ryhmän kuolleisuuden 10 %:iin ($p < 0,01$). Suojaavat vaikutukset kestivät pitkään, sillä 48 tunnin kuluttua kuolleisuus ryhmässä 3 lisääntyi hieman, so. 30 %:iin, osoittaen silti vielä erittäin merkitsevää suojaa kontrolliryhmään nähden

($p < 0,01$). Ryhmän 4 kuolleisuus meni 70 %:ista 80 %:iin, kun taas ryhmässä 1 ja 2 ei havaittu mitään muutoksia.

Näihin tuloksiin perustuen testasimme IL-6:n vaikutusta eri annoksilla. Annoimme IL-6:ta LPS-injektion hetkellä, sillä ensimmäisen kokeen mukaan tämä oli optimaalinen aika. Tutkimme lisäksi LPS:n hetkellä annetun IL-3:n ja IL-4:n vaikutusta mahdollisten, LPS/d-GAL-valmisteessa yhdistelmäproteiinien käytöstä johtuvien ihmiskäden aikaansaamien tulosten poissulkemiseksi. Tutkimme vielä, suojasiko IL-6 tehokkaasti hiiriä endotoksiselta kuolemalta annettaessa 100 µg/hiiri annos ennen LPS:n antoa tai sen annon jälkeen.

Kokeen 2 tulokset (kuva 2) ovat samansuuntaisia kokeen 1 tulosten kanssa. Myös tässä kokeessa IL-6-käsittely suojasi hiiriä endotoksiselta kuolemalta. Kun IL-6 annettiin yhdessä LPS:n kanssa, niin saatu suoja 24 tuntia LPS:n jälkeen oli annoksesta riippuva annoksilla 20 (30 % kuolemia, $p = 0,03$), 4 (50 % kuolemia, $p = 0,16$) ja 0,8 (70 % kuolemia, $p = 0,61$) µg/hiiri, kun taas 100 µg/hiiri suuruinen annos (60 % kuolemia, $p = 33$) suojasi hiiriä vähemmän tehokkaasti kuin 20 µg/hiiri suuruinen annos. Esi- ja jälkikäsittely 100 µg IL-6/hiiri tuotti vastaavanlaisen suojan, kuin havaittiin annettaessa samanlainen annos IL-6:ta yhdessä LPS:n kanssa. Vastaavat hiiren eloonjäämistulokset saatiin 48 tuntia LPS:n jälkeen.

LPS-altistushetkellä annettu IL-4 oli tehoton suojaamaan hiiriä endotoksiinikuolemalta, kun taas IL-2 vähensi hiiren eloonjäämistä.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Biohajoava polymeeri, joka sisältää etyleenikarbonaattiyksikköjä, joilla on kaava A

$$-(-C(O)-O-CH_2-CH_2-O-)- \qquad A$$

ja jonka etyleenikarbonaattipitoisuus on 70 - 100 mooli-%, intrinsiininen viskositeetti 0,4 - 4,0 dl/g kloroformissa ja lasitransitiolämpötila 15 - 50 °C.

2. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen polymeerin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että etyleenioksidia ja CO_2:ta polymeroidaan 10 - 80 °C:een lämpötilassa, 1 : 4 - 1 : 5 -moolisuhteessa ja katalyytin vaikutuksen alaisuudessa, jolloin katalyytti on valmistettu $Zn(C_2H_5)_2$:n ja veden, asetonin, diolin, difenolin tai trifenolin välisellä reaktiolla.

3. Farmaseuttinen koostumus, joka sisältää farmakologisesti aktiivista yhdistettä polymeerissa, jolla esiintyy ei-hydrolyyttista pintaeroosiota.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen farmaseuttinen koostumus, joka sisältää farmakologisesti aktiivista yhdistettä polymeerissa, t u n n e t t u siitä, että polymeerimatriksilla esiintyy lineaarista korrelaatiota aktiivisen yhdisteen vapautumisen ja ei-hydrolyyttisen polymeerimassan hajoamisen välillä ja että polymeerimatriksi suojaa aktiivista yhdistettä.

5. Farmaseuttinen koostumus, joka sisältää patenttivaatimuksen 1 mukaista polymeeria.

6. Patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että koostumus sisältää aktiivista proteiinia tai peptidiä.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 3 - 6 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että koostumus sisältää IL-6:ta aktiivisena aineosana.

8. Farmaseuttinen koostumus, joka sisältää IL-6:ta polymeerimatriksissa.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen farmaseut-

tinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että koostumus on mikropartikkeleiden muodossa tai implantoitavassa muodossa.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että koostumus on tarkoitettu autoimmuuni- tai inflammatoristen tilojen hoitoon.

Fig.1/13

Pronaasin vaikutus poly(etyleenikarbonaatin) massan hajoamiseen in vitro (keskiarvot +/- keskiarvon keskivirhe; n=3)

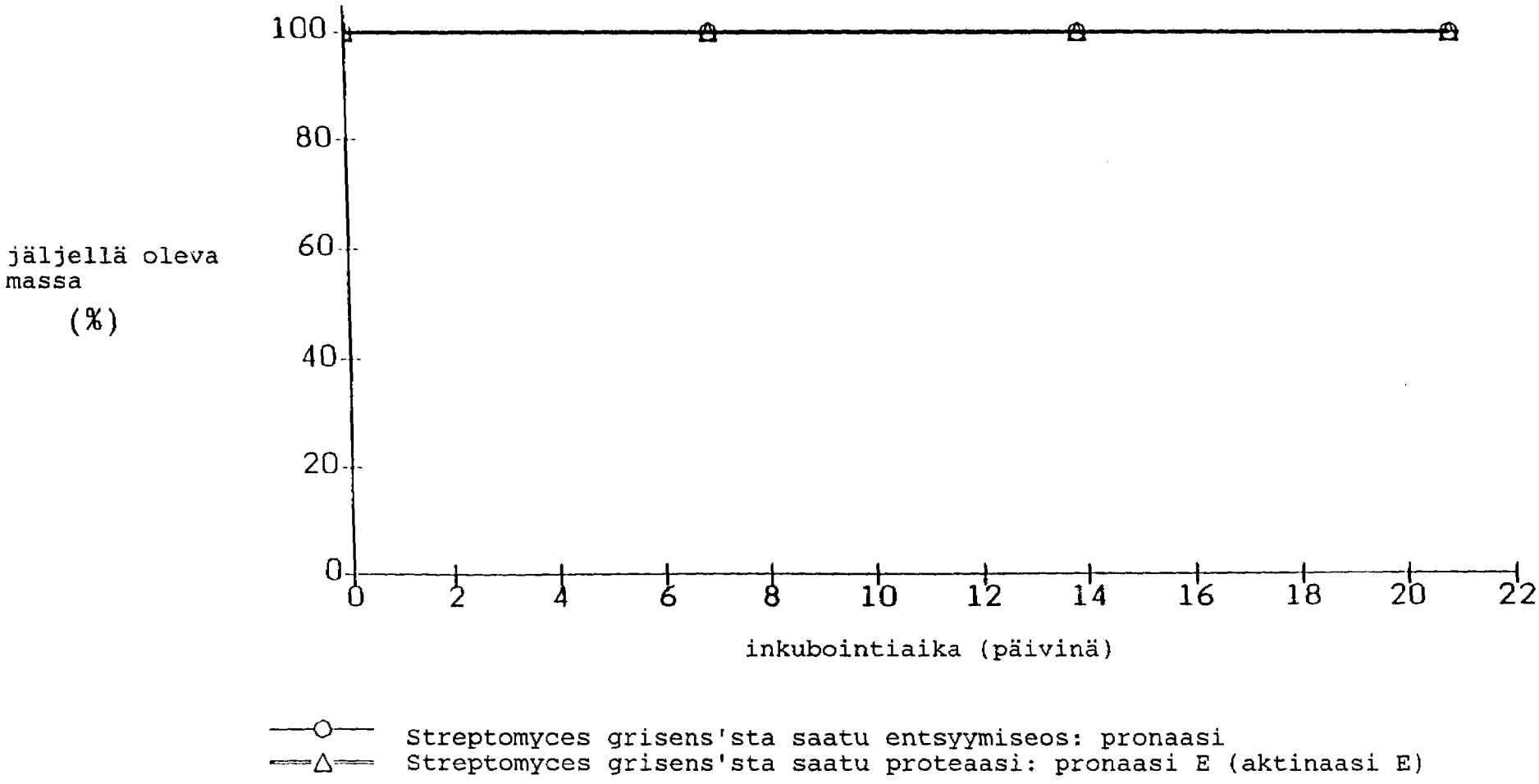


Fig.2/13

Poly(etyleenikarbonaatti)-implanttien turpoaminen fosfaatti-puskuroidussa keittosuolaliuoksessa (PBS), pH 7,4 (keskiarvot +/- keskiarvon keskivirhe; n=3)

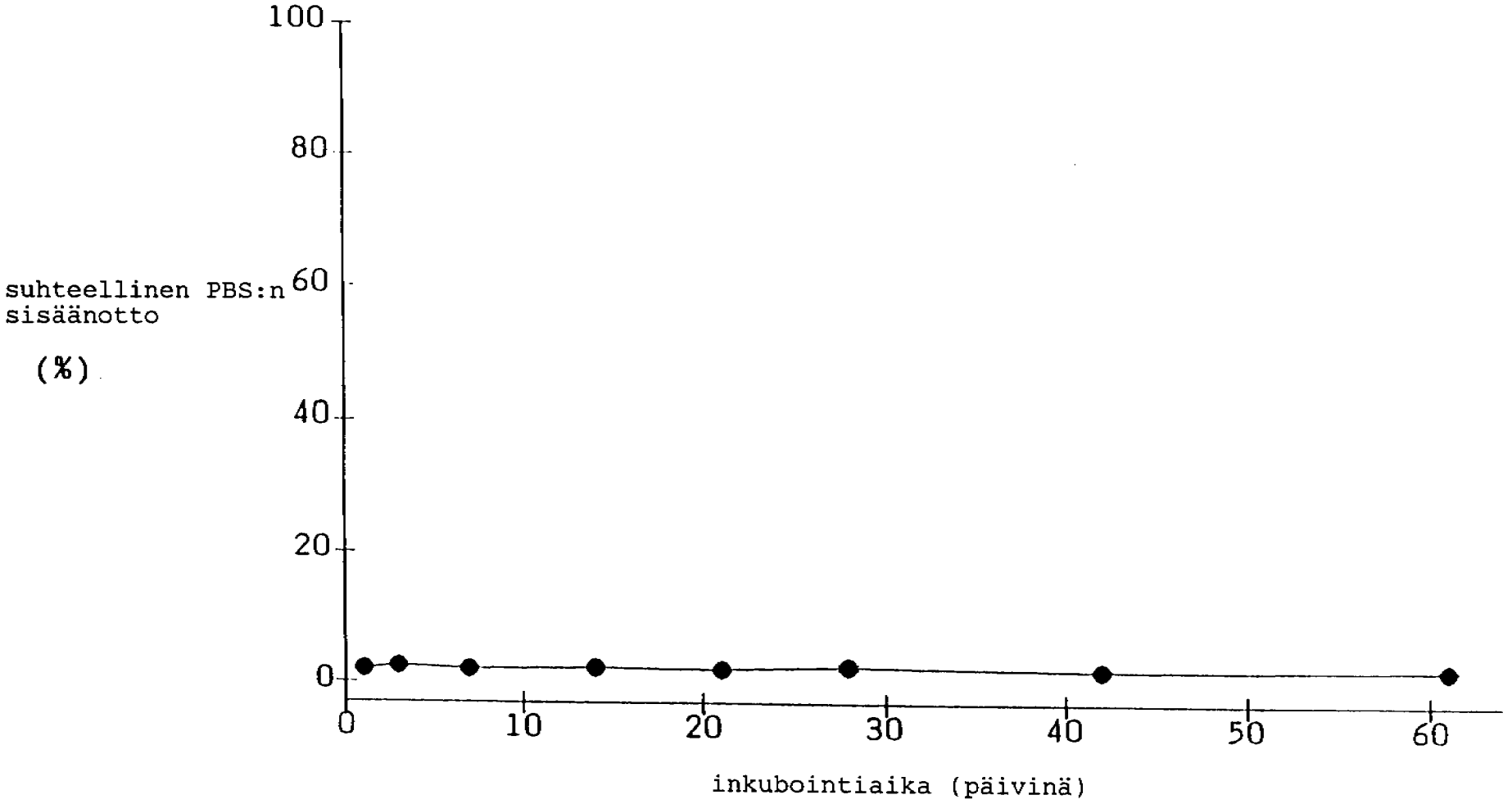


Fig.3/13

D-glukoosilla aloitetun poly(DL-laktidi - ko - glykodin) (54.6 : 45.4) (DL-PLGGLU) ja vast. poly(etyleenikarbonaatin) (PEC) hydrolyyttinen runko-eroosio ja ei-hydrolyyttinen pintaeroosio (keskiarvot +/- kerskiarvon keskivirhe; n=3)

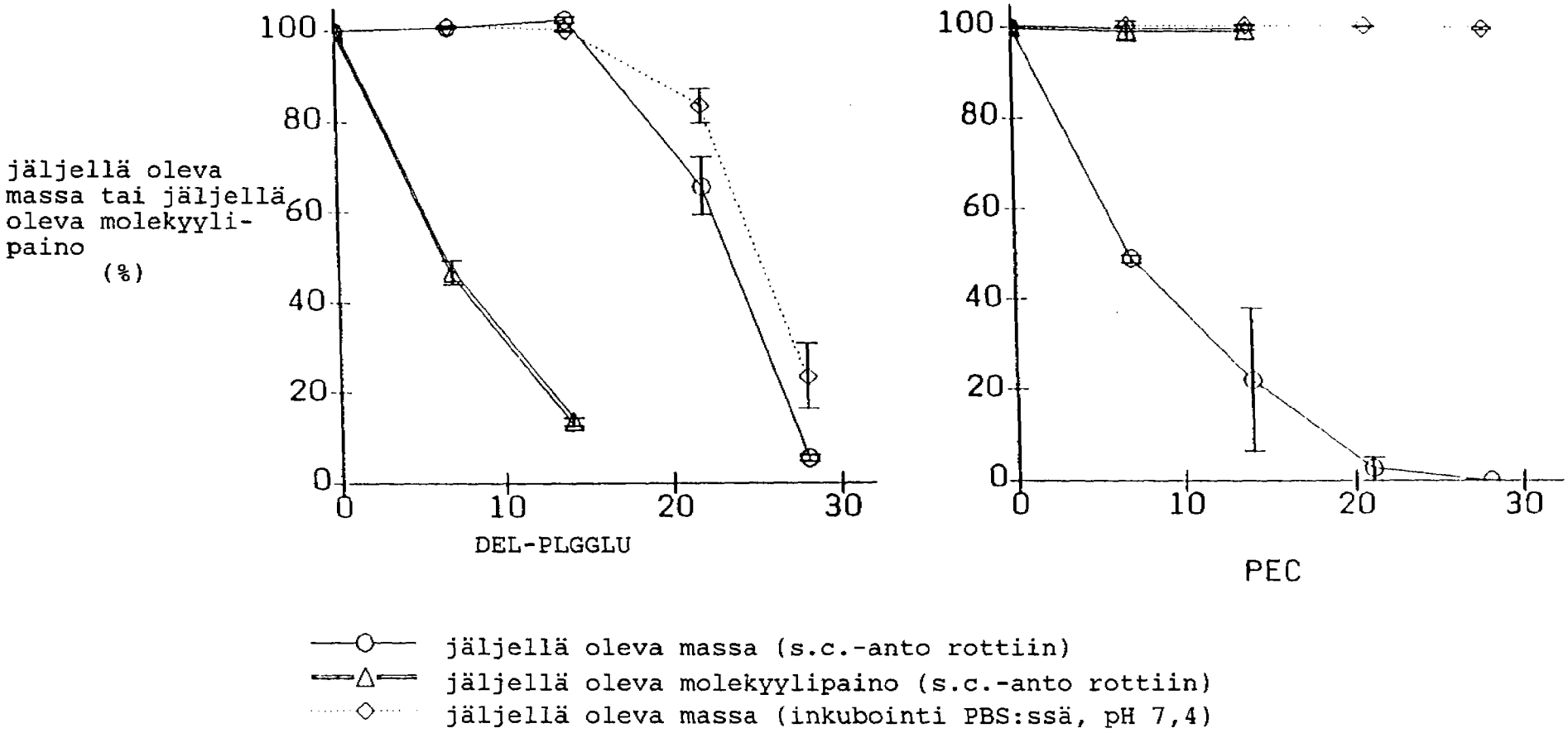


Fig.4/13

Rottiin subkutaanisesti annettujen poly(etyleenikarbonaatti) johdannaisten massan hajoaminen (kskiarvot +/- keskiarvon keskivirhe; n=3)

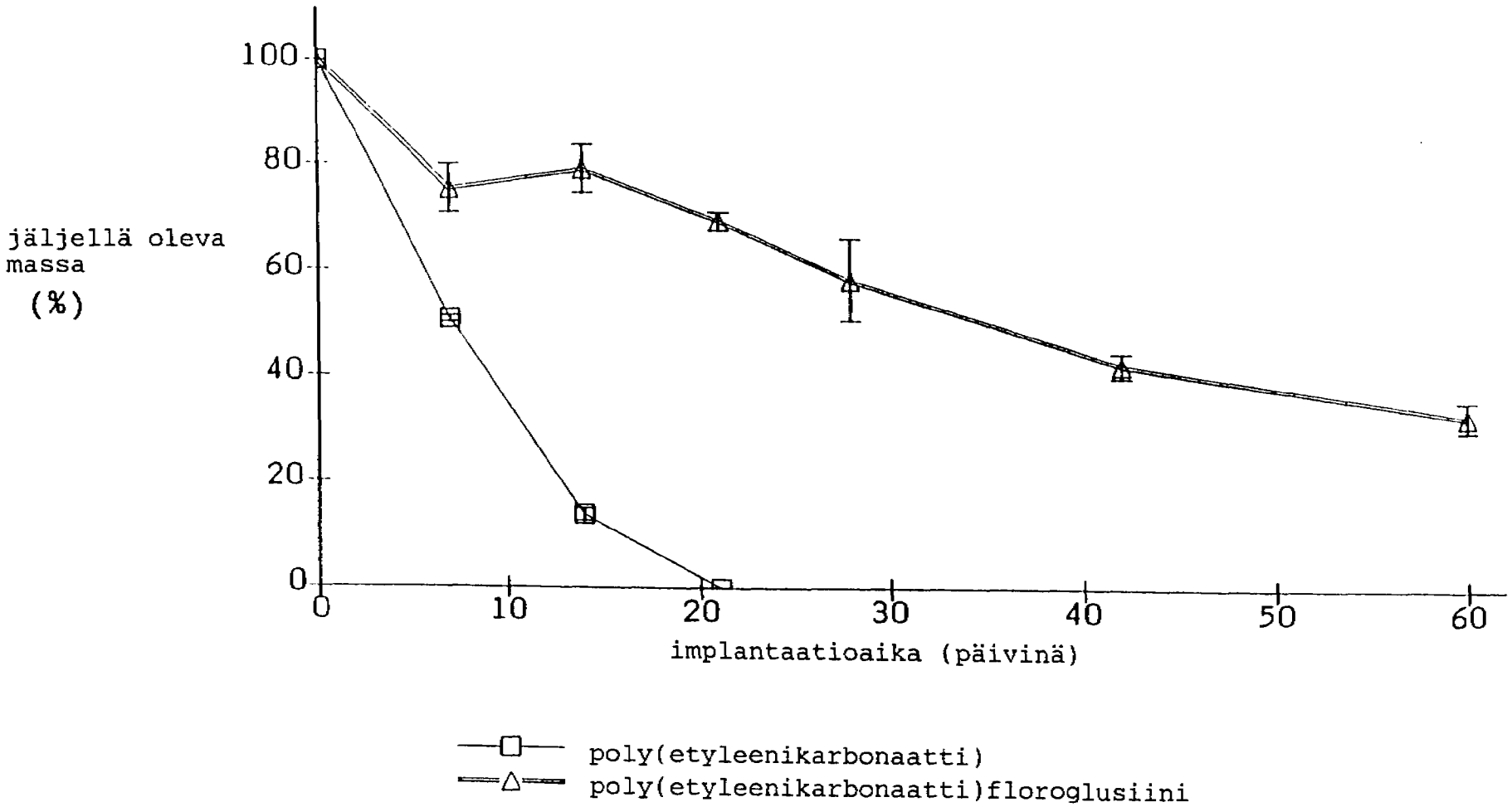


Fig.5/13

Poly(etyleenikarbonaatti)-alkuunpantu superoksidituotto polymorfonukleaarileukosyyteissä (sytokromi C määritys) (keskiarvot +/- keskiarvon keskivirhe; n=3)

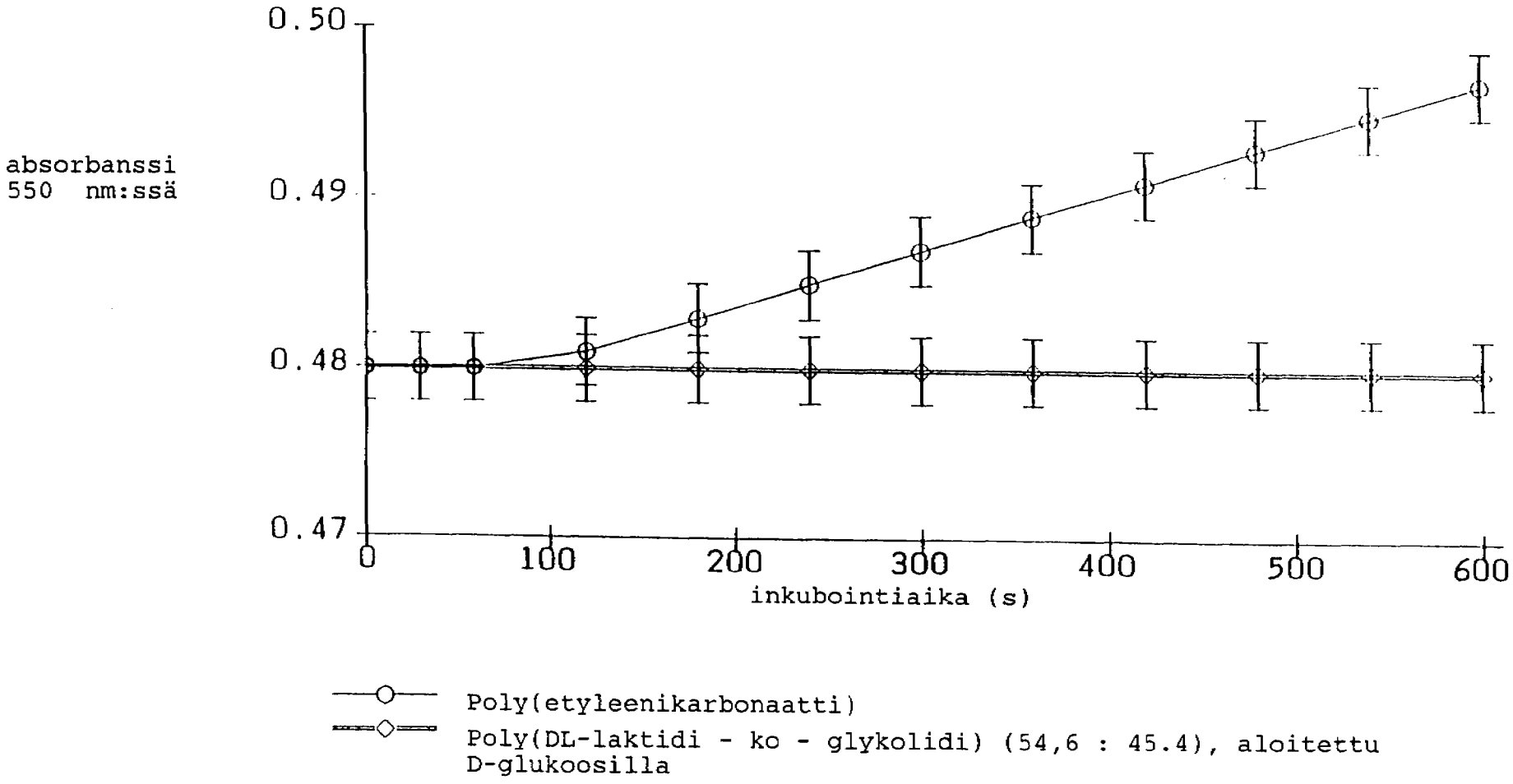


Fig.6/13

Poly(etyleenikarbonaatin) massan hajoaminen in vivo ja in vitro molekyylipainon funktiona (keskiarvot +/- keskiarvon keskivirhe; n=2-6)

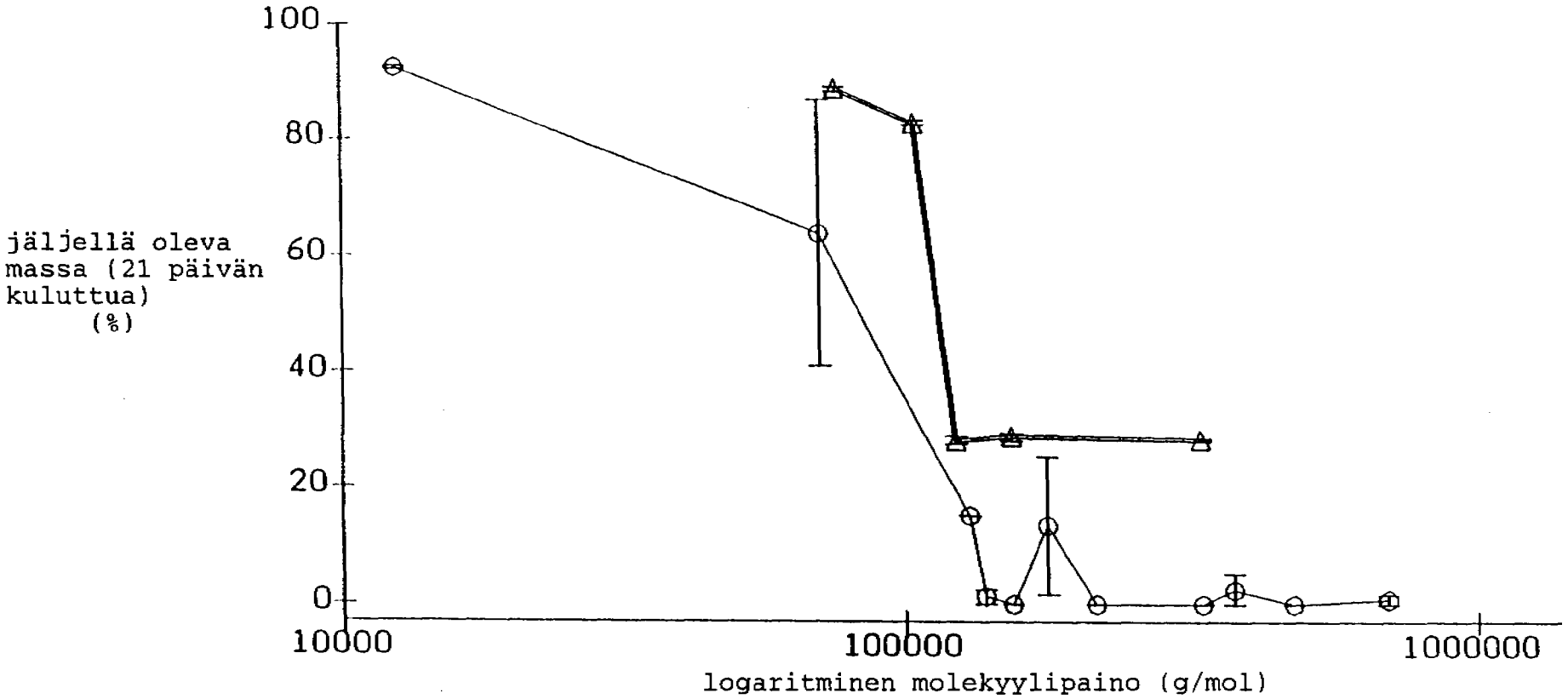


Fig.7/13

Superoksidiradikaalin sieppaajien vaikutus poly(etyleenikarbonaatin) massan hajoamiseen 14 päivän kuluttua subkutaanisesta annostuksesta rottiin (keskiarvot +/- keskiarvon keskivirhe; n=3)

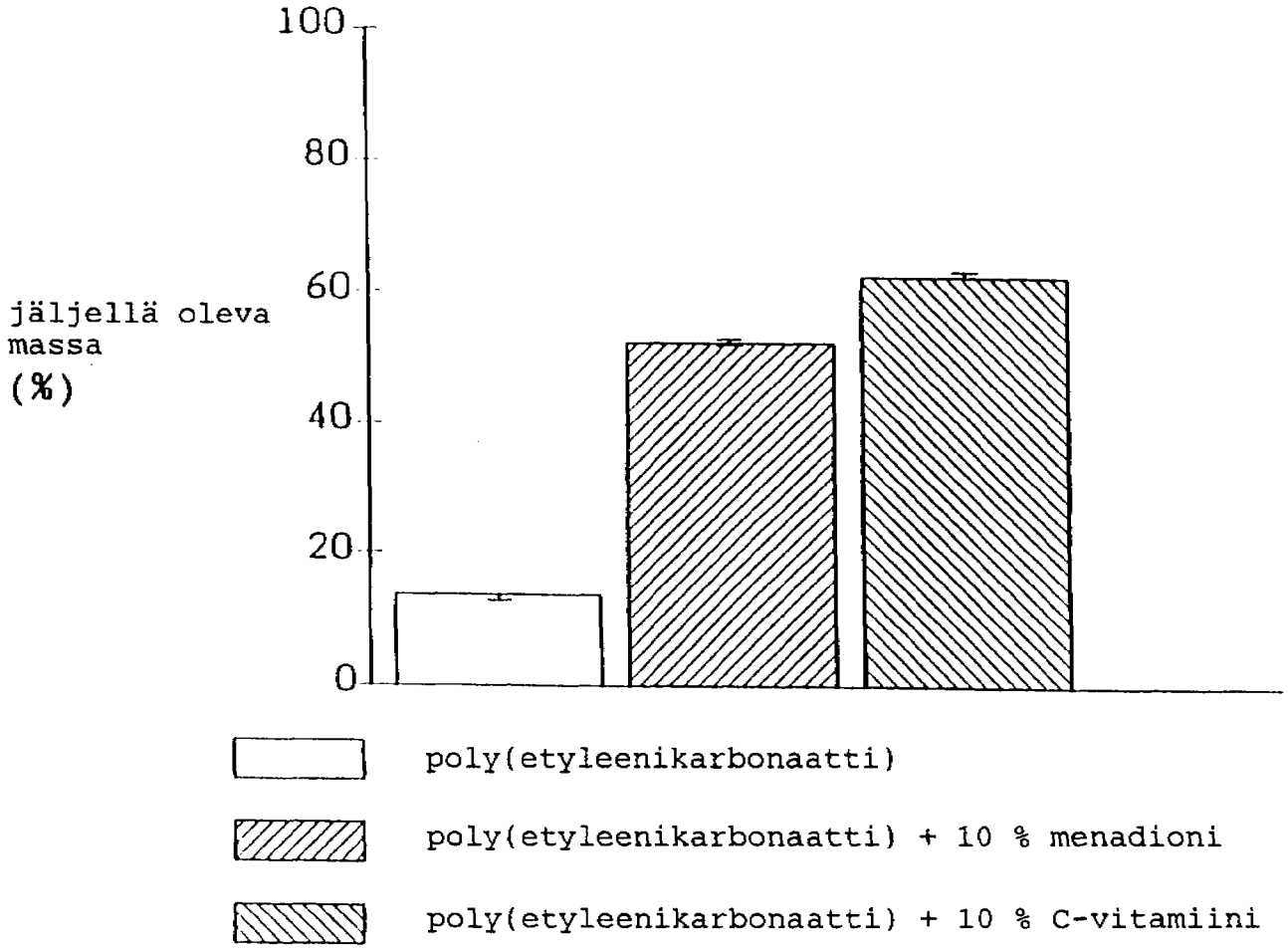
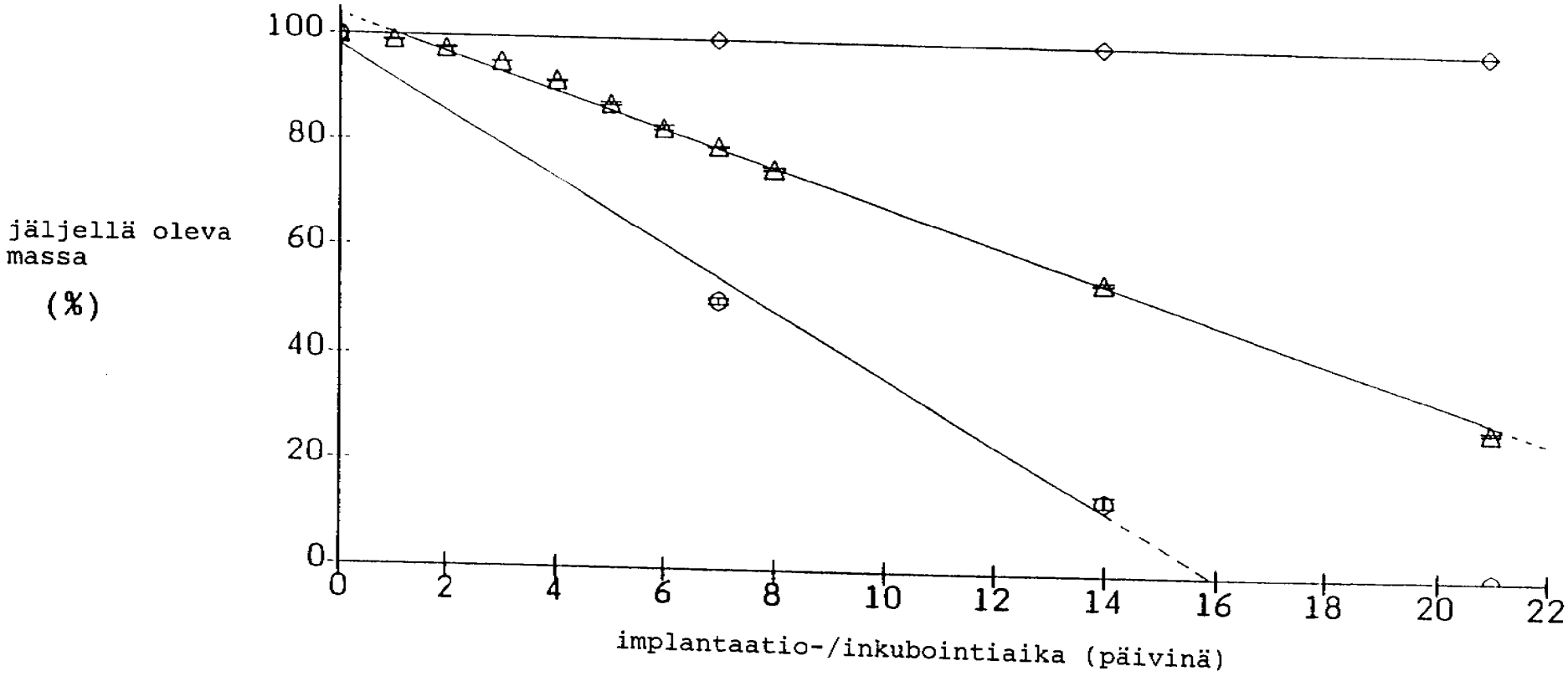


Fig.8/13

Poly(etyleenikarbonaatin) massan hajoaminen in vivo ja in vitro
(keskiarvot +/- keskiarvon keskivirhe; n=3)



○ subkutaaninen anto rottiin
△ inkubointi kaliumsuperoksidivesiliuoksessa (140 mM, pH 12)
◇ inkubointi vesiliuoksessa, pH 12

Fig.9/13

hIL-3:n vapauttaminen in vitro poly(etyleenikarbonaatti) (PEC)-implanteista (seerumia sisältävä liuotusväliaine; hIL-3 analytiikka: ELISA) (keskiarvon keskivirhe; n=3)

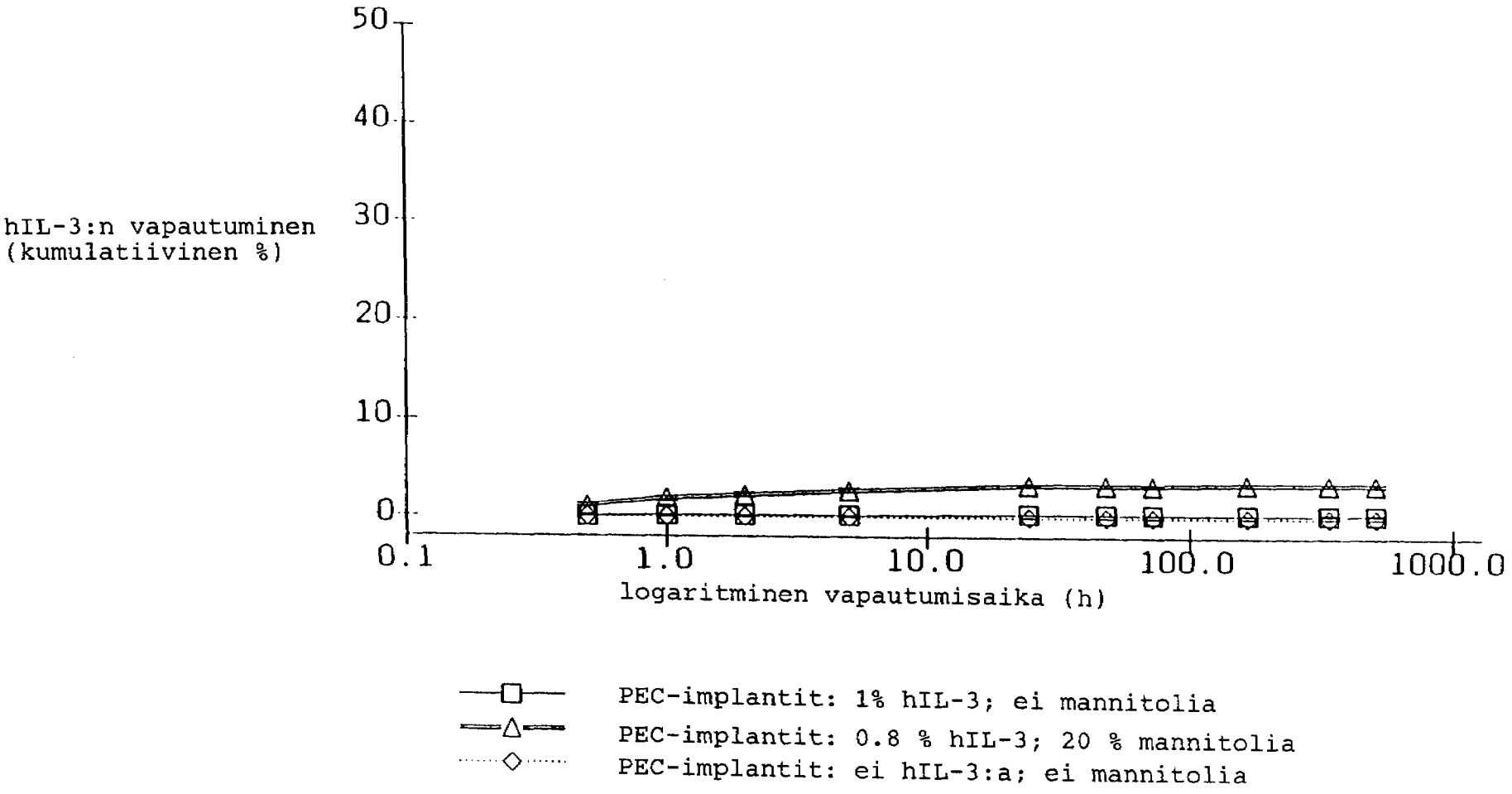
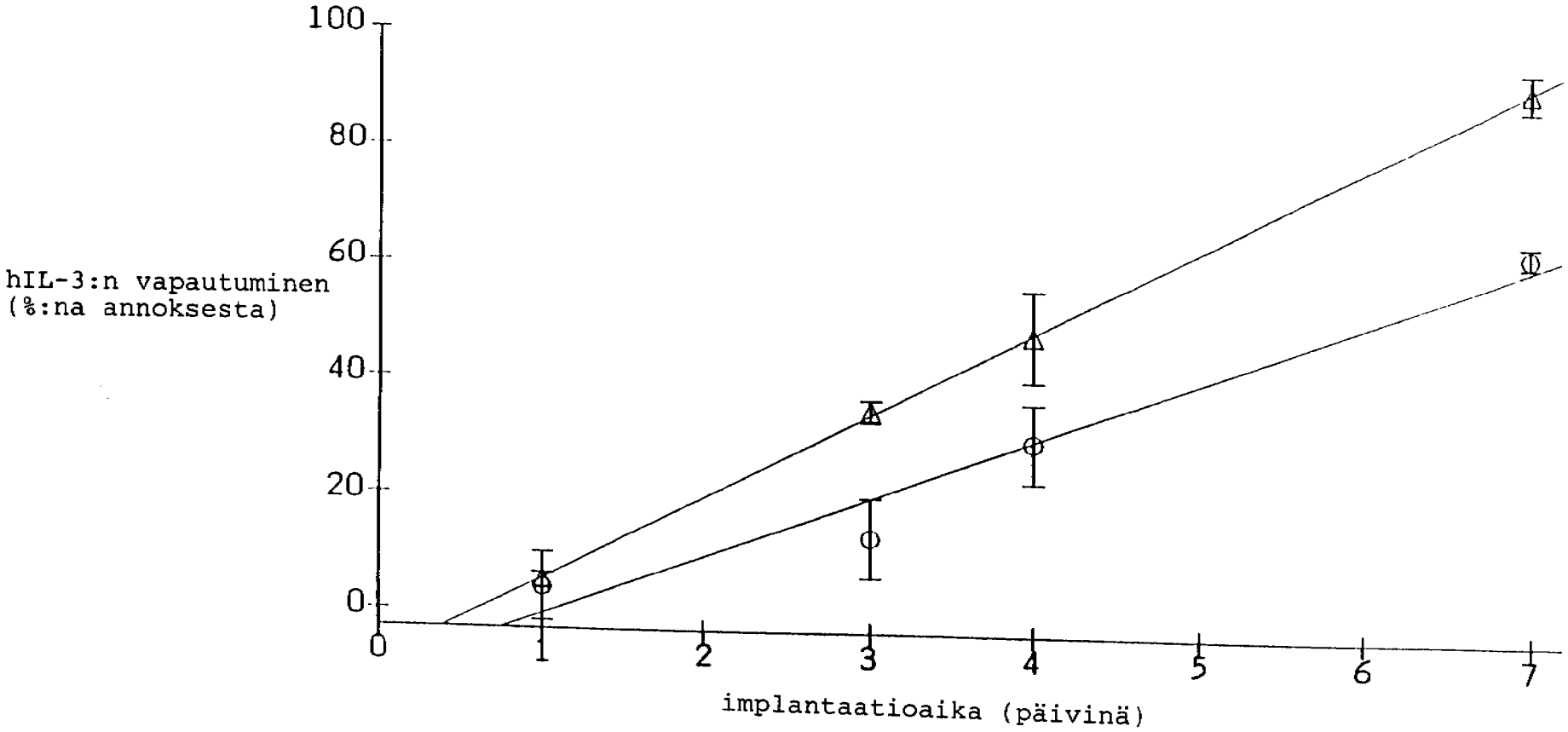


Fig.10/13

Subkutaaninen hIL-3:n vapautuminen poly(etyleenikarbonaatti) (PEC)-implanteista rotissa (hIL-3 analytiikka:HPLC) (keskiarvot +/- keskiarvon keskivirhe; n=3)

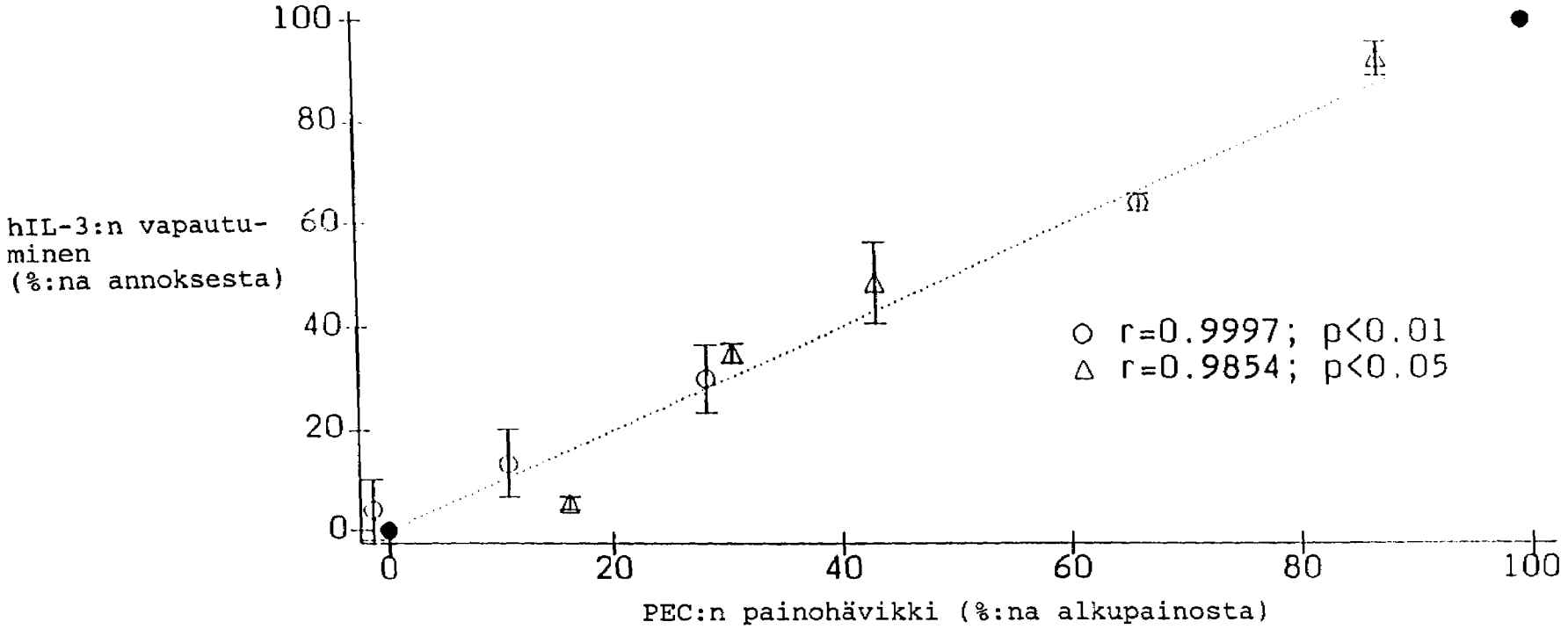


○ PEC-implantit: 1 % hIL-3; ei mannitolia

△ PEC-implantit: 0.8 % hIL-3; 20 % mannitolia

Fig.11/13

Poly(etyleenikarbonaatin) (PEC) painohävikin ja hIL-3:n vapautumisen välinen korrelaation rotissa (keskiarvot +/- keskiarvon keskivirhe; n=3)



○ PEC-implantit: 1 % hIL-3; ei mannitolia

△ PEC-implantit: 0.8 % hIL-3; 20 % mannitolia

●····· ideaalikuvaaja painohävikki/lääkeaineen vapautumisen 1:1 korrelaatiolle

Fig.12/13

SMS-PA:n plasmatasot ratissa ja kaniineissa (keskiarvot +/- keskiarvon keskivirhe; n=2-3)

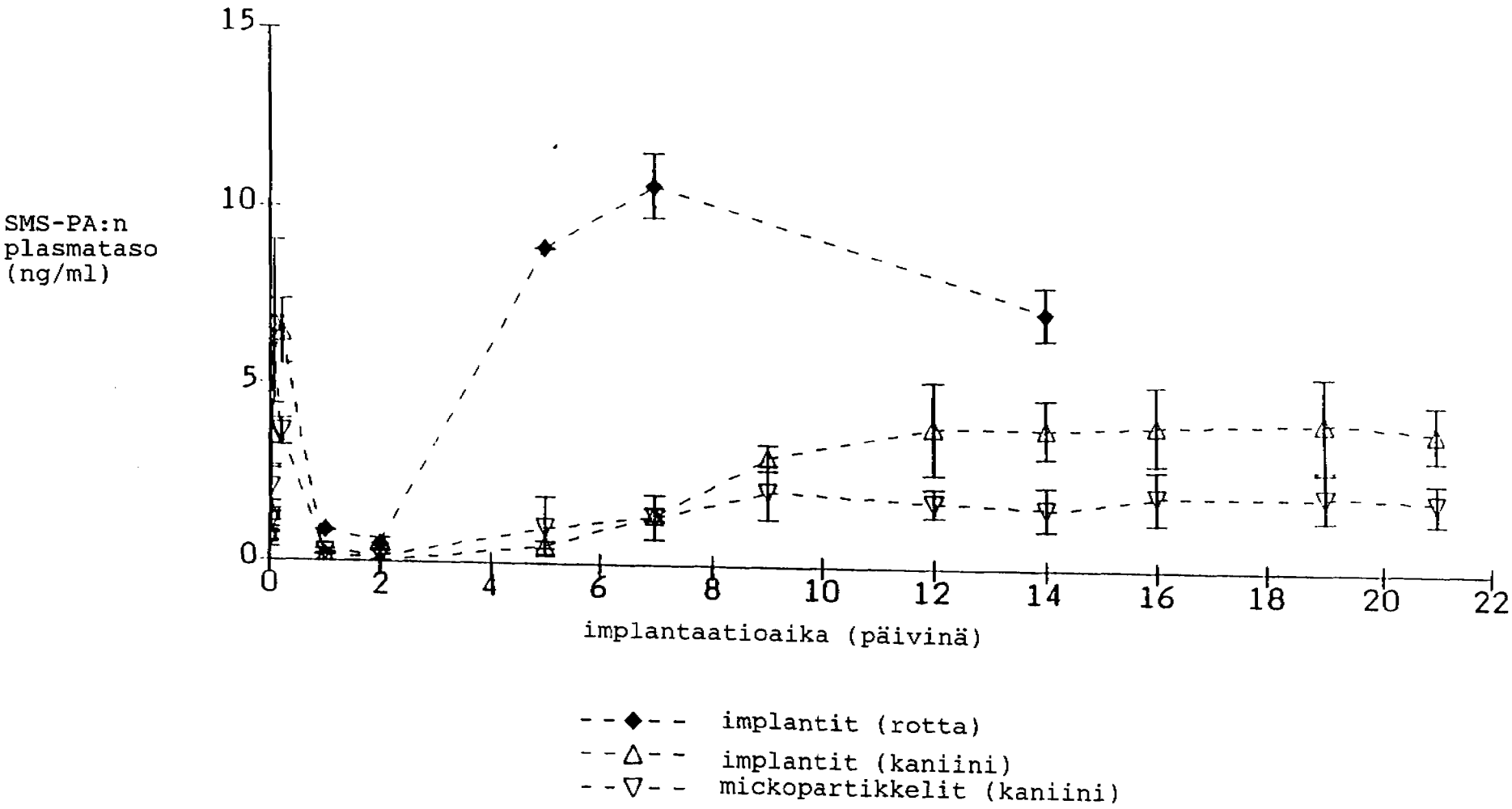
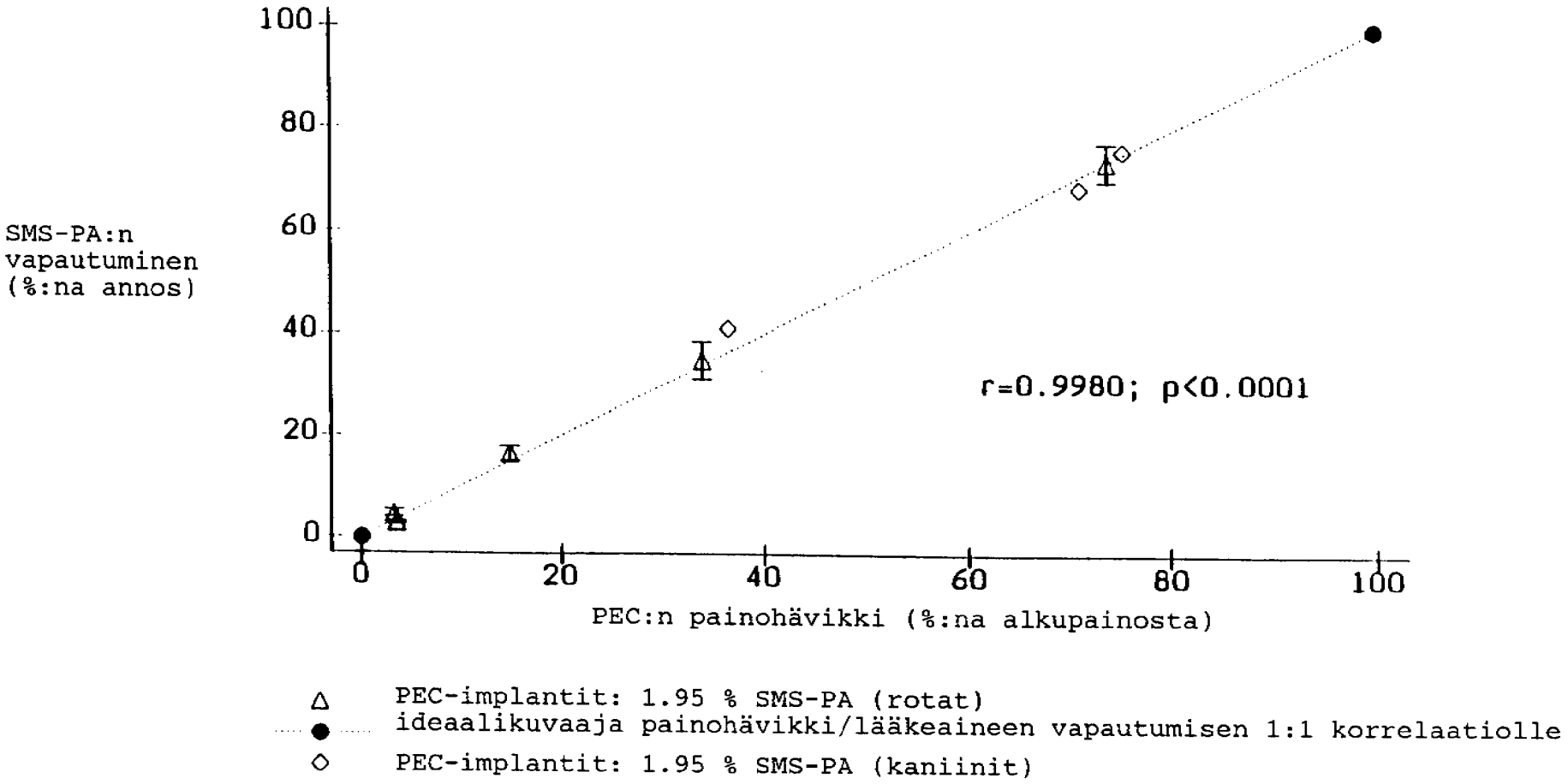


Fig.13/13

Poly(etyleenikarbonaatin) (PEC) painohävikin ja SMS-PA:n välinen korrelaatio rotissa ja kaniineissa (S.C. , SMS-PA, analytiikka: HPLC) (keskiarvot +/- keskiarvon keskivirhe; n=2)



Hak.n:o 960892

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US 3585168 A

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

Käännä Vänd

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Allekirjoitus