



## Eljárás abszorbeálódó mikrorészecskék előállítására

### KIVONAT

A találmány tárgya eljárás beágyazott, kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék előállítására, amelynél a beágyazott kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék mikrorészecskét vagy mikrorészecskéket és egy abszorbeálódó beágyazó polimert tartalmaznak, amelynél

a kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék egy abszorbeálódó, heteroláncú polimer magot és egy vagy több peptidet, egy vagy több proteint vagy ezek kombinációját tartalmazzák az abszorbeálódó heteroláncú polimer magon immobilizálva, ahol az említett valamely peptid lehet: növekedési hormon felszabadító peptid (GHRP), luteinizáló hormon-felszabadító hormon (LHRH), szomatosztatin, bombezin, gasztrin felszabadító peptid (GRP), kalcitonin, bradikinin, galanin, melanocita stimuláló hormon (MSH), növekedési hormon felszabadító faktor (GRF), amilin, tachikinin, szekretin, paratiroid hormon (PTH), enkafelin, endotelin, kalcitonin gén felszabadító peptid (CGRP), neuromedin, paratiroid hormonnal kapcsolatos protein (PTHrP), glükagon, neurotenzin, adrenokortikotropikus hormon (ACTH), peptid YY (PYY), glükagon felszabadító peptid (GLP), vazoaktív intesztinális peptid (VIP), hipofízis adenilát cikláz aktiváló peptid (PACAP), motilin, P anyag, neuropeptid Y (NPY), TSH és ezek analógjai és fragmentjei vagy gyógyszerészetileg elfogadható sói; to-

vábbá, a protein lehet egymástól függetlenül növekedési hormon, eritropoietin, granulocita-kolónia stimuláló faktor, granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor vagy interferon;

és a diszperziót úgy állítjuk elő, hogy a szilárd kötött mikrorészecskéket az abszorbeálódó beágyazó polimer oldatában diszpergáljuk egyidejű homogenizálással, és a kapott diszperziót egy fűvókán át 12 kHz és 36 kHz közötti ultrahangos frekvencia értéken és a porlasztást egy az abszorbeálódó beágyazó polimert nem oldó közegben porlasztjuk és az áramlási sebesség 1 ml/perc és 15 ml/perc közötti érték.

Tóth J.  
jellemzők össze = d  
2000. 06. 27.

P0102373

KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY



A2

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Budapest

**Eljárás abszorbeálódó mikrorészecskék előállítására**

A találmány tárgya eljárás beágyazott, kötött mikrorészecskék előállítására, amely mikrorészecskék egy vagy több peptid, egy vagy több protein vagy ezek kombinációjának nyújtott felszabadulású komplexe egy abszorbeálódó, beágyazó polimert tartalmazó abszorbeálódó polimer részecskén immobilizálva. A találmány szerinti eljárással előállított mikrorészecske komplex tartalmaz peptid(ek)e)t és/vagy protein(ek)e)t, amelyek legalább egy aminocsoportot és/vagy egy karboxilcsoportot tartalmaznak molekulánként, egy szilárd, abszorbeálódó poliészter mikrorészecskét, amely a peptidek és/vagy proteinek megkötéséhez elegendő mennyiségben tartalmaz felületi és felület alatti karboxil- vagy aminocsoportot úgy, hogy az immobilizált peptidek és proteinek mennyisége 0,1-30% legyen a mikrorészecske komplex teljes tömegére számolva, amely egyedenként vagy csoportokban van az abszorbeálódó beágyazó polimerbe ágyazva az immobilizált peptid(ek) és protein(ek) felszabadulásának szabályozására.

Számos hatóanyag szállító rendszert fejlesztettek ki, vizsgáltak és alkalmaztak a gyógyszerkészítmények in vivo szabályozott felszabadulására. Így például poliésztereket, például poli(D-tejsavat), poli(glikolsavat), poli( $\epsilon$ -kaprolaktont) és különböző más kopolimereket alkalmaztak biológiailag aktív

92698-7042 OE/Hoj

10.06.77.

molekulák, például progeszteron felszabadulására; ezek a készítmények lehetnek mikrokapszula, film vagy rúd formájúak (M. Chasin és R. Langer, *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, Dekker, NY 1990). Ezen polimer/terápiás szer készítmények implantálása, például szubkután vagy intramuszkuláris implantálása után a hatóanyag egy meghatározott időn belül felszabadul. Az ilyen biokompatibilis biodegradálható polimer rendszereket úgy tervezik, hogy lehetővé váljon a bezárt terápiás anyag kidiffundálása a polimer matrixból. A hatóanyag felszabadulása után a polimer *in vivo* lebomlik, így elkerülhető az implantátum sebészi eltávolítása. Bár azok a faktorok, amelyek elősegítik a polimer degradációját, nem teljesen tisztázottak, úgy gondolják, hogy az ilyen poliészter degradációt szabályozni lehet a polimer komponensekben lévő észterkötések nem enzimátikus, autokatalitikus hidrolízisével.

Így például, az EP-467 389 számú közzétételi iratban leírják egy hidrofób biodegradálható polimer és proteinek vagy polipeptidek közötti fizikai kölcsönhatást. A kapott készítmények a hatóanyag és egy hidrofób polimer keverékei, amelyekből nyújtott időtartam alatt diffúzióval szabadul fel a hatóanyag a matrixból az egyénbe való bevitelt követően.

Az US 4 767 628 számú szabadalmi leírásban ismertetett készítményből szabályozott mértékben szabadul fel a terápiás hatóanyag, a készítmény egy polimerben kialakított egyenletes diszperzió. A leírás szerint a készítmény szabályozott folyamatos felszabadulását két átlapoló fázis biztosítja: az első a hatóanyagnak a készítmény felületéről való diffúzió-függő ki-



áztatása, a második a felszabadulás a polimer degradációjával indukált vizes csatornákon keresztül.

Más in situ kialakuló biodegradálható implantátumokat és előállítási eljárásukat ismertetik az US 5 278 201 és US 5 077 049 számú szabadalmi leírásokban. Ezen szabadalmi leírások a periodontális szövetek helyreállítására és a foggyökér felületek között az epitheliális sejtek migrációjának megakadályozására szolgáló eljárásra vonatkoznak. Az elsőként említett szabadalmi leírás szerint egy in situ kialakuló, biológiailag lebomlani képes gátat helyeznek a fog felületének szomszédságába. Ez a gát mikroporózus, meghatározott méretű pórusokat foglal magába és tartalmazhat biológiailag aktív anyagokat is. A gát kialakítását úgy végzik, hogy a biodegradálható polimer, például poli(dl-laktid-ko-glikolid) folyékony oldatát, amely polimer vízzel koagulálható, termoplasztikus és vízzel elkeverhető, az oldatot nem toxikus oldószerrel, például N-metil-pirrolidonnal alakítják ki (a polimer koncentráció például 50%), a periodontális tasakba helyezik. A szerves oldószer a periodontális folyadékba disszipálódik és egy biodegradálható vízzel koagulálható polimer alakul ki egy in situ képződött szilárd, biodegradálható implantátum formájában. Az oldószer disszipációja révén pórusok maradnak a szilárd biodegradálható implantátumban, amely elősegíti a sejtek belenövését. A másodikként említett szabadalmi leírásban hasonló indikációjú eljárást ismertetnek, amelynél egy biodegradálható gátat alakítanak ki egy biodegradálható, kikeményíthető, hőre keményedő polimer, egy térhálósító szer és egy vízoldható anyag, így egy só, cukor, valamint egy



vízoldható polimer keverékéből. Térhálósodó, hőre keményedő prepolimerként akrilészter végcsoportú abszorbeálódó polimert említene.

Továbbá, számos ismertetés található biológiailag szabályozott hatóanyagok különböző helyekre történő szállítására alkalmas rendszerekre vonatkozóan a szakirodalomban. Így például az US 5 011 692 számú szabadalmi leírásban nyújtott pulzáló felszabadulású gyógyszerkészítményt ismertetnek, amely egy hatóanyag tartalmú polimer réteget tartalmaz. Ez a polimer réteg csak nagyon kevés hatóanyagot tartalmaz vagy nem is tartalmaz. A teljes felület merőlegesen van kialakítva a réteg síkjára és egy vízben nem oldható polimer anyaggal van bevonva. Az ilyen típusú lökésszerű, pulzáló hatóanyag dózisek alkalmasak a bőr közelében történő beágyazásra.

Az US 5 366 756 számú szabadalmi leírásban eljárást ismertetnek pórusos, biológiailag abszorbeálódó sebészi implantátum anyagok előállítására. Az eljárásnál biológiailag abszorbeálódó implantátum anyag részecskéit állítják elő és ezeket bevonják legalább egy növekedési faktorra. Az implantátum antimikrobás anyagokat is tartalmazhat.

Az US 5 385 738 számú szabadalmi leírásban nyújtott felszabadulású injekciós rendszert ismertetnek, amely a hatóanyag és a gyógyszerészetileg elfogadható, biológiailag lebomlani képes hordozóanyag (például valamely protein poliszacharid vagy szintetikus, nagy molekulatömegű vegyület, előnyösen kollagén, atelo kollagén, zselatin vagy ezek keveréke) szuszpenziója egy viszkózus oldószerben (például valamely növényi olaj, polietilén-glikol, propilén-glikol, szilikonolaj és közepes lán-



hosszúságú zsírsav-triglicerid), a készítmény injekció céljára alkalmas. A készítményben lévő hatóanyag a biodegradálható hordozóanyagba a következő formában épül be: (i) a hatóanyag kémiaailag kötődik a hordozó matrixhoz; (ii) a hatóanyag intramolekuláris kötéssel kötődik a hordozó matrixhoz; vagy (iii) a hatóanyag fizikailag van beágyazva a hordozó matrixba.

Továbbá, az előzőekben ismertetett, a technika állásából ismert rendszerek (például US 4 938 763) a biodegradálható, mikroporozus, szilárd implantátum in situ kialakulását ismertetik az élő szervezetben egy polimer szerves oldószerrel, például N-metil-2-pirrolidinből készült oldatából történő koagulációval. Azonban, az oldószer, beleértve a kis molekulatömegű szerves oldószereket is, elősegítik az oldat migrációját a felhasználási helyről és ily módon az élő szövet károsodását okozhatják, így például a sejtek dehidratációját vagy nekrozisát. Az oldószerből adódó tömegveszteség a koagulátum zsugorodását és a környező szövetektől való elválását okozhatja.

Az US 5 612 052 számú szabadalmi leírásban kationcserélő mikrorészecskéket ismertetnek, amely karboxilcsoportot tartalmazó poliészter láncokat és ezeken immobilizálva bázikus bioaktív anyagokat tartalmaz, így egy szabályozott felszabadulású rendszert nyernek az abszorbeálódó gélképző folyékony poliészter rendszeren belül. Ezen számú szabadalmi leírás referenciaként szolgál a jelen leírásnál. A karbonsavcsoportok ionos, bázikus polipeptidekkel való konjugálását említik a technika állásában, így az US 5 672 659 és US 5 665 702 számú szabadalmi leírásokban. Azonban, ezek a komplexek oldható kémiai vegyületek, amelyek egy bázikus és

egy karbonsav komponens molekuláris egymásra hatásával képződnek a megfelelő oldataikban, így egy jól meghatározott ion-konjugátumot alkotnak, amely új kémiai vegyület meghatározott fizikokémiai tulajdonságokkal.

A jelen találmány tárgya eljárás (A eljárás) beágyazott, kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék előállítására, amelynél a beágyazott, mikrorészecske vagy mikrorészecskék egy abszorbeálódó beágyazó polimer kötött mikrorészecskéjét vagy mikrorészecskéit tartalmazzák, amelynél a kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék egy abszorbeálódó, heteroláncú polimer magból és egy vagy több peptidből, egy vagy több proteinből vagy ezek kombinációjából áll az említett abszorbeálódó heteroláncú polimer magon immobilizálva és ahol az említett valamely peptid egymástól függetlenül lehet növekedési hormon felszabadító peptid (GHRP), luteinizáló hormon-felszabadító hormon (LHRH), szomatosztatin, bombezin, gasztrin felszabadító peptid (GRP), kalcitonin, bradikinin, galanin, melanocita stimuláló hormon (MSH), növekedési hormon felszabadító faktor (GRF), amilin, tachikinin, szekretin, paratiroid hormon (PTH), enkafelin, endotelin, kalcitonin gén felszabadító peptid (CGRP), neuromedin, paratiroid hormon felszabadító protein (PTHrP), glükagon, neurotenzin, adrenokortikotropikus hormon (ACTH), peptid YY (PYY), glükagon felszabadító peptid (GLP), vasoaktív intesztinális peptid (VIP), hipofízis adenilát cikláz aktiváló peptid (PACAP), motilin, P anyag, neuropeptid Y (NPY), TSH és ezek analógjai és fragmentjei vagy gyógyszerészetileg elfogadható sói; továbbá, a protein lehet egymástól függetlenül növekedési

hormon, eritropoietin, granulocita-kolónia stimuláló faktor, granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor vagy interferon.

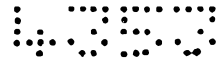
A találmány szerinti eljárást úgy végezzük, hogy előállítunk egy szilárd, kötött mikrorészecskékből és abszorbeálódó beágyazó polimer oldatból álló diszperziót úgy, hogy az abszorbeálódó beágyazó polimer oldatában a szilárd, kötött mikrorészecskéket homogenizáljuk és diszpergáljuk, majd a kapott diszperziót 12 kHz - 32 kHz ultrahang frekvencián egy közegbe porlasztjuk, amely közeg az abszorbeálódó beágyazó polimer számára nem oldó hatású oldószer, az áramlási sebesség 1 ml/perc és 15 ml/perc közötti érték.

A fenti A eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (B eljárás) a közeg izopropanol vagy etanol.

A fenti B eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (C eljárás) az abszorbeálódó polimer oldata 5-30% abszorbeálódó polimert tartalmaz és a közeg hőmérséklete szobahőmérséklet és -80°C közötti érték.

Az A eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (D eljárás) a peptid, peptidek vagy protein vagy proteinek vagy ezek kombinációjának mennyisége a kötött mikrorészecskében 0,1-30 % a kötött mikrorészecske teljes tömegére számolva.

A fenti D eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (E eljárás) az abszorbeálódó polimer mag glikolát egységeket és citrátcsoportokat tartalmaz és a glikolát egységek és citrátcsoportok közötti arány 7-1 és 20-1 közötti érték vagy glikolát egységeket és tartarátcsoportokat tartalmaz, ahol a glikolát egységek és tartarátcsoportok közötti arány 7-1 és 20-1 közötti érték vagy glikolát egységeket és malátcsoportokat tar-



talmaz, ahol a glikolát egységek és malátcsoportok közötti arány 7-1 és 20-1 közötti érték.

Az E eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (F eljárás) az abszorbeálódó beágyazó polimer a következőket tartalmazza:

(a) l-laktid bázisú egységek és glikolid bázisú egységek, ahol az l-laktid bázisú egységek és glikolid bázisú egységek közötti arány 60-40 és 90-10 közötti érték,

(b) d,l-laktid bázisú egységek és glikolid bázisú egységek, ahol a d,l-laktid bázisú egységek és glikolid bázisú egységek közötti arány 60-40 és 90-10 közötti érték,

(c) d,l-laktid bázisú egységek, vagy

(d) l-laktid bázisú egységek és d,l-laktid bázisú egységek, ahol az l-laktid bázisú egységet és a d,l-laktid bázisú egységek közötti arány 80-20.

Az F eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (G eljárás) az abszorbeálódó beágyazó polimer mennyisége 5-70% a beágyazott, kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék teljes tömegére számolva.

A G eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (H eljárás) az abszorbeálódó beágyazó polimer mennyisége 20-60% a beágyazott kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék teljes tömegére számolva.

A H eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (I eljárás) az abszorbeálódó beágyazó polimer mennyisége 30-50% a beágyazott kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék teljes tömegére számolva.

Az I eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (J eljárás) a peptid egy LHRH analóg.



A J eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (K eljárás) az LHRH analóg p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>.

Az I eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (L eljárás) a peptid egy szomatosztatin analóg.

Az L eljárás egy előnyös kiviteli formájánál (M eljárás) a szomatosztatin analóg H-β-D-Nal-Csy-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>, ahol a két Cys diszulfidkötéssel kapcsolódik.

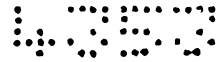
Az L eljárás egy másik előnyös kiviteli formájánál a szomatosztatin analóg N-hidroxietyl piperazinil-acetil-D-Phe\_Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>, ahol a két Cys csoport diszulfidkötéssel kapcsolódik.

Az L eljárás egy további kiviteli formájánál a szomatosztatin analóg N-hidroxietyl piperazinil-etilszulfonil-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>, ahol a két Cys csoport diszulfidkötéssel kapcsolódik.

Az "abszorbeálódó" kifejezés egy vízben oldható anyagot jelent, így egy polimert, amely biológiai környezetben láncszakadással megy át és így vízben oldható melléktermékek képződnek.

A "mikrorészecske" kifejezés abszorbeálódó poliészter részecskékre utal, amelyek előnyösen lényegében gömb formájúak.

A "kötött mikrorészecske" kifejezés olyan mikrorészecskét jelent, amelyhez egy vagy több peptid és/vagy egy vagy több protein van ionosan immobilizálva.



A "beágyazott mikrorészecske" kifejezés olyan polimer bevonattal rendelkező kötött mikrorészecskét jelent, amelynél a polimer bevonat nem szükségszerűen teljesen zárt.

A "polimer mag" kifejezés a mikrorészecske másik elnevezése.

A "beágyazó polimer" kifejezés jelenti azt a polimert, amelyet a kötött mikrorészecskék beágyazására, bevonására alkalmazunk.

A "gélképző folyékony poliészter" kifejezés olyan anyagot jelent, amely oldószereket, így vizet abszorbeál, fázistranszformáción megy keresztül és megtartja háromdimenziós hálószerkezetét, amely reverzibilis deformációra képes.

A leírás során az aminosavakat a standard három betűs rövidítéssel jelöljük, amely a szakterületen ismert, így például Ala=alanin.

A találmány szerinti eljárásnál felhasználásra kerülő mikrorészecske kristályos, abszorbeálódó poliészterből, így poliglikolidból van előállítva, amely egy vagy több karboxilcsoportot tartalmaz az egyes láncokon, ami a mikrorészecske felületén és a mikrorészecske közvetlen felület alatti részén elegendő koncentrációjú karboxilcsoportot eredményez, hogy komplex és ionos formában immobilizálja a peptidet vagy peptideket és/vagy proteint vagy proteineket, amelyek egy vagy több bázikus csoportot tartalmaznak. A poliglikolid karboxilcsoportjai amidálva is lehetnek, így például lehetnek diaminok, előnyösen primer vagy szekunder aminok vagy ezek keverékei, amikor is az amin komplexet képez, amely ionosan immobilizálja az egy vagy több savas csoportot tartalmazó



peptidet vagy peptideket és/vagy proteint, proteineket. Mivel a mikrorészecske felülete szükségszerűen nem teljesen homogén, a "felület alatti rész" résekre és más hasonlókra utal, amelyek a mikrorészecske felülete alatt találhatóak. A kötött mikrorészecskékből a peptidek és/vagy proteinek a betegben szabályozottan szabadulnak fel. Az immobilizált peptidek és/vagy proteinek felszabadulásának további szabályozására a találmány szerinti eljárásnál a kötött mikrorészecskéket beágyazzuk külön-külön vagy csoportosan egy abszorbeálódó beágyazó polimerbe. A kötött mikrorészecskékből a peptidek és/vagy proteinek kb. 2 nap és kb. 3 hónap közötti időtartam alatt, előnyösen 1 hét és 3 hónap közötti idő alatt szabadulnak fel. A beágyazott mikrorészecskékből a peptidek és/vagy proteinek kb. 3 nap és 6 hónap, előnyösen 2 hét és 5 hónap közötti idő alatt szabadulnak fel a betegben.

A találmány szerinti eljárásnál a mikrorészecskékhez például a következő peptideket köthetjük vagy immobilizálhatjuk a korlátozás szándéka nélkül: növekedési hormon felszabadító peptid (GHRP), luteinizáló hormon-felszabadító hormon (LHRH), szomatosztatin, bombezin, gasztrin felszabadító peptid (GRP), kalcitonin, bradikinin, galanin, melanocita stimuláló hormon (MSH), növekedési hormon felszabadító faktor (GRF), amilin, tachikinin, szekretin, paratiroid hormon (PTH), enkafelin, endotelin, kalcitonin gén felszabadító peptid (CGRP), neuromedin, paratiroid hormonnal kapcsolatos protein (PTHrP), glükagon, neurotenzin, adrenokortikotropikus hormon (ACTH), peptid YY (PYY), glükagon felszabadító peptid (GLP), vazóaktív intesztinális peptid (VIP), hipofízis adenilát

cikláz aktiváló peptid (PACAP), motilin, P anyag, neuropeptid Y (NPY), TSH vagy ezek analógjai és fragmensei. A mikrorészecskéken immobilizálható vagy köthető proteinek közül említjük a következőket: növekedési hormon, eritropoietin, granulocita kolónia stimuláló faktor, granulocita makrofág stimuláló faktor, vagy interferonok.

A mikrorészecskéket előállíthatjuk egy laktid bázisú polimerből vagy egy szilárd, szemikristályos polilaktonból, így poliglikolidból, amelyet a savcsoportot tartalmazó hidroxilos iniciátorokkal, így glikolsavval, tejsavval, almasavval, borkősavval vagy citromsavval állítunk elő gyűrű nyitós polimerizációval. A találmány szerint felhasználásra kerülő mikrorészecskék előállítását a következő eljárással végezhetjük. Egy reakció tartályban elkeverjük a laktid bázisú monomert és/vagy laktont, így glikolidot és egy savas iniciátort, így borkősavat, almasavat vagy citromsavat. Az edényt 35-45, előnyösen 40°C-ra melegítjük és vákuum alatt tartjuk 20-60 percen, előnyösen 30 percen át. A tartály hőmérsékletét ezután 105-115°C-ra, előnyösen 110°C-ra emeljük. Amikor ezt a hőmérsékletet elértük, a tartályt oxigénmentes nitrogénatmoszféra alá helyezzük és a keveréket keverjük. Ha a keverék megolvadt, katalitikus mennyiségű szerves fém katalizátort adagolunk, amely alkalmas a gyűrűnyitós polimerizációhoz való felhasználásra, ez lehet például ón(II)-etil-hexanoát nem protikus oldószerrel, így például toluollal készült oldata. Ezután ismét vákuumot alkalmazunk 30-90 másodpercen át a toluol eltávolítására nélkül, hogy szignifikáns mennyiségű monomert eltávolítanánk. A keverék hőmérsékletét ezután 115-125°C-ra,

előnyösen 120°C-ra emeljük 5-10 perc alatt, majd tovább emeljük 140-150°C-ra. Ezt a hőmérsékletet tartjuk 3-5 órán át, előnyösen 4 órán át állandó mechanikai keverés közben.

A kapott polimert ezután mikronizáljuk, az első őrlést Knife-berendezésben végezve. A polimert ezután Aljet Micronizer felhasználásával mikronizáljuk nyomás alatti száraz nitrogénáramban. A részecskék átlagos átmérőjét Malvern Mastersizer/E berendezéssel analizáljuk, térfogat eloszlási modell szerint, a diszpergálószer 200/5 cS szilikonolaj.

A polimert ezután tisztítjuk, nátriumsóvá alakítjuk és ezt acetonban diszpergáljuk, ultrahanggal kezeljük kb. 30 percen át. Ezen idő alatt a diszpergálószeret homogenizáljuk is 8000-24 000 fordulat/perc közötti értéknél, előnyösen 9500 fordulat/percnel egy homogenizáló alkalmazásával. Ezután az ultrahangos/homogenizációs lépés után a diszperziót 3000-7000 fordulat/percnel, előnyösen 5000 fordulat/percnel centrifugáljuk előnyösen 30 percen át. A felülúszót eldobjuk, a centrifuga lepényt ismételten friss acetonban szuszpendáljuk, majd megismételjük az ultrahangos/homogenizációs lépést. A második centrifugálási lépés után a felülúszót eldobjuk, a lepényt ismételten ionmentes vízben szuszpendáljuk. Ezután egy végső ultrahangos/homogenizációs lépést végzünk a megmaradó aceton eltávolítására, majd a diszperziót ismételten centrifugáljuk 5000 fordulat/percnel 30 percen át.

A kapott centrifuga lepényt friss ionmentes vízben szuszpendáljuk és megmérjük a pH-ját. Elegendő mennyiségű enyhe bázist, így 0,2 M nátrium-karbonát oldatot adagolunk a pH 8-9 közötti értékre való beállításához. A diszperziót ezután kb. 30



percen át keverjük, majd szűrőpapíron vákumm-szűrjük. A szűrőleplenyt ionmentes vízzel átöblítjük, fagyasztjuk, majd liofilizáljuk.

A tisztítást differential scanning caloriméterrel (DSC) követjük, a melegítés sebessége 5 °C/perc és 15°C/perc közötti érték, előnyösen 10°C/perc.

Anioncserélő mikrorészecskéket nyerünk a kationcserélő mikrorészecskék forró hígított (kb. 80°C-os) diamin oldatában való kezelésével, előnyösen az amin lehet primer amin vagy szekunder amin vagy ezek keveréke, ismert koncentrációban alkalmazzuk dioxánban vagy THF-ben inert gáz, így például argonatmoszférában. A diamin koncentrációját a dioxánban vagy THF-ben acidimetriával határozzuk meg. Ha a reakció gyakorlatilag végbement, az amidált mikrorészecskéket szűréssel elválasztjuk, dioxánnal vagy THF-el átöblítjük és csökkentett nyomáson szárítjuk.

A peptidek és/vagy proteinek immobilizálását a mikrorészecskéken a következő módszer szerint végezhetjük. A mikrorészecske nátriumsóját a peptidek és/vagy proteinek szabad bázisát tartalmazó vizes oldatban diszpergáljuk. A diszperziót szobahőmérsékleten inkubáljuk 2 órás keverés közben, majd a kötött mikrorészecskéket szűréssel eltávolítjuk. A szűrőleplenyt további ionmentesített vízzel átöblítjük, fagyasztjuk, liofilizáljuk. A mintákat ezután elemanalízissel analizáljuk, hogy az immobilizált peptidek és/vagy proteinek mennyiségét meghatározzuk.

A mikrorészecskék mérete szerepet játszik abban, hogy a mikrorészecske milyen mennyiségű peptidet és/vagy proteint



tud immobilizálni. Minél kisebb a mikrorészecske mérete, annál nagyobb a felülete és így annál több peptidet és/vagy proteint képes immobilizálni. A mikrorészecskék mikronos vagy mikron alatti méretre való csökkentését a fentiek szerint végezhjük. A mikrorészecskék átmérője 0,5  $\mu\text{m}$  és 100  $\mu\text{m}$ , előnyösen 1  $\mu\text{m}$  és 10  $\mu\text{m}$ , még előnyösebben 3  $\mu\text{m}$  és 10  $\mu\text{m}$  közötti érték.

Az abszorbeálódó beágyazó polimer lehet kristályos vagy nem kristályos laktid/glikolid kopolimer, amorf l-laktid/d,l-laktid kopolimer, kaprolakton/glikolid kopolimer vagy trimetilén-karbonát/glikolid kopolimer, amelyek a szokásos szerves oldószerekben (például kloroform, metilén-klorid, aceton, acetonitril, etil-acetát vagy etil-formát vagy ezek keverékei) oldhatók. Az abszorbeálódó beágyazó polimereket nem oldó oldószerek közé tartoznak például a víz, alacsony forráspontú alkoholok és szénhidrogének, vagy ezek keverékei. Az abszorbeálódó beágyazó polimert előállíthatjuk laktonok katalizált gyűrűnyitásos polimerizációjával vagy ciklusos monomerek, így  $\epsilon$ -kaprolakton, p-dioxanon, trimetilén-karbonát, 1,5-dioxepán-2-on vagy 1,4-dioxepán-2-on lánciniciátor így hidroxipolikarbonsav jelenlétében végzett polimerizációjával. Egy további módszernél egy szerves polikarbonsavat egy előre formált poliészterrel reagáltatunk, ilyen eljárást ismertetnek az US 5 612 052 számú szabadalmi leírásban.

A kötött mikrorészecskék beágyazásánál a találmány szerinti eljárásnál egy ultrahangos atomizer-t alkalmazunk, a kötött mikrorészecskéknek az abszorbeálódó polimerrel készült oldatát mikrocseppek formájában egy hűtött, nem oldó hatású



közegbe visszük be (ez az oldószer nem oldja az abszorbeálódó beágyazó polimert). A kötött mikrorészecskéket bevonjuk, beágyazzuk a laktidból és glikolidből álló abszorbeálódó beágyazó kopolimerbe, ezt a mikrorészecskéket a polimer oldatban való koagulálásával végezzük, majd egy ultrahangos atomizálón (porlasztón) keresztül egy folyékony közegbe visszük, amely a beágyazó polimert nem oldja, de amely folyékony közeg képes a beágyazó polimer oldat oldószerét a beágyazott szilárd mikrorészecskéknél extrahálni. A porlasztást 12-36 kHz frekvenciánál végezzük, előnyösen 34-36 kHz frekvenciát alkalmazunk. A frekvencia nagysága befolyásolhatja a találmány szerinti eljárást olyan értelemben, hogy a nagyobb frekvencia lehetővé teszi nagyobb viszkozitású oldatok alkalmazását és az abszorbeáló beágyazó polimert és kötött mikrorészecskéket tartalmazó diszperziók nagyobb áramlási sebességét. A mikrorészecskék beágyazására szolgáló polimer oldat koncentrációjától függően a beágyazott mikrorészecskékben lévő eredetileg kötött mikrorészecskék száma 1 és több 100 között változhat, a beágyazott mikrorészecskék átlagos átmérője 0,5  $\mu\text{m}$  és 100  $\mu\text{m}$  közötti érték.

A következő eljárással a beágyazott peptid-tartalmú és/vagy protein-tartalmú (továbbiakban peptid-tartalmú) kationcserélők (CE) előállítását mutatjuk be porlasztással. A felhasználásra kerülő beágyazó kopolimert az oldószerben (például acetonitril, etil-acetát vagy etil-formát) feloldjuk. Elegendő mennyiségű így kapott oldatot alkalmazunk a peptid-tartalmú CE előállításához úgy, hogy a peptid-tartalmú CE és a beágyazó kopolimer közötti tömegarány 30:70 és 80:20 kö-



zötti érték legyen. A diszpergálást nagy sebességű homogenizációval végezzük. A peptid-tartalmú kationcserélőt a beágyazó kopolimer acetonitriles vagy etilén-acetátos oldatában diszpergáljuk. A beágyazó kopolimer koncentrációja 10-25 tömeg% etil-acetát és 12,5-30 tömeg% acetonitril esetén, függően a kívánt részecske jellemzőjétől (morfológia, méret, fajlagos felület). Az oldatot egy homogenizálóban, például Ultra-turrax T25 (IKA, Staufen, Németország) homogenizáljuk, amelyhez egy diszpergáló szerszám van csatlakoztatva. 10-es (10-gauge) diszpergáló szerszámot alkalmazunk 1 ml és 50 ml közötti térfogat esetén és 25-ös szerszámot (50 ml és 2,5 l térfogat esetén). A diszpergáló szerszám forgási sebessége 8000 és 24 000 fordulat/perc körüli érték. A homogenizálási/diszpergálási lépés a polipeptid-tartalmú kationcserélőnek a beágyazó polimer oldatban való egyenletes eloszlását biztosítja anélkül, hogy ultrahangos kezelésre vagy forgatásra szükség lenne. A diszperziót 1 ml/perc és 10 ml/perc közötti sebességgel adagoljuk az ultrahangos atomizáló fuvókába, amelynek frekvenciája változtatható - 12 kHz és 36 kHz között - nagyobb frekvenciánál nagyobb áramlási sebességet tudunk fenntartani a részecske jellemzők fenntartásával. A diszperziót így egy gyűjtő tartályba porlasztjuk, amely legalább 1-10-szeres feleslegben tartalmaz folyadékot, így izopropanolt vagy etanolt (a beágyazó kopolimert oldó oldószerhez viszonyítva), ennek hőmérséklete szobahőmérséklet vagy megfelelő mennyiségű szárazjég darabokkal van lehűtve (általában 0,5-1 kg/l IPA) úgy, hogy a zagy hőmérséklete  $-50^{\circ}\text{C}$  és  $-80^{\circ}\text{C}$  legyen a permetezési művelet alatt. Ezt a zagyot 300 és 700 fordulat/perc közötti se-



bességgel keverjük a térfogattól függően. Acetonitril vagy etil-acetát oldószerek esetében a permetcseppek azonnal megfagynak a zaggyal való érintkezéskor. Ha a porlasztást befejeztük, a teljes diszperziót hagyjuk magától felengedni 10 °C és szobahőmérséklet közötti értékre a vákuumos szűrést megelőzően. A szűrőlepenyeket ionmentesített vízzel leöblítjük a nem-oldószer felesleg eltávolítására. A kapott részecskék sima felületű mikrogömbök, túlnyomó részt d,l-laktid beágyazó kopolimerek esetén, a felületük enyhén hullámos, ha a beágyazó polimer túlnyomó részt l-laktid bázisú.

A mikrorészecske ioncserélők kapacitását a következőképpen lehet meghatározni. Például kationcserélő mikrorészecskék esetén meghatározott tömegű mikrorészecskén a hozzáférhető karboxilcsoportokat semlegesítjük ismert koncentrációjú hideg, hígított vizes nátrium-karbonát oldattal. A semlegesített mikrorészecskéket szűréssel elválasztjuk, hideg ionmentesített vízzel átöblítjük és szárítjuk. A szilárd mikrorészecskéket ezután híg, ismert koncentrációjú Pilocarpine hidroklorid oldatban inkubáljuk, amelynek a koncentrációja olyan, hogy a várható kötési kapacitási érték feletti kis feleslegben tartalmazza a bázikus hatóanyagot. A megmaradó Pilocarpine HCl koncentrációját a vizes közegben addig követjük, amíg a mikrorészecskék által szignifikáns mértékű bázis megkötés már nem történik. Az immobilizált bázis százalékos mennyiségét az exhauziós adatokból határozzuk meg, majd nitrogénre végzett elemeléssel igazoljuk.

Az anioncserélők (amidált részecskék) kötési kapacitását a következőképpen határozzuk meg: (1) nitrogénre végzett elem-

analízissal és (2) Naproxenhez való kötés mértékével, amelyet a híg oldatból eltávolított Naproxen mennyiségének meghatározásával mérünk HPLC alkalmazásával. Ez utóbbit ismert koncentrációjú híg nátrium-hidroxiddal a felszabadított, immobilizált Naproxen mennyiségével igazoljuk.

A találmány szerinti eljárással előállított beágyazott mikrorészecskéket a betegeknek ismert módon adagolhatjuk, így például parenterálisan vagy orálisan. Előnyösen por vagy szuszpenzió formájában végezzük az adagolást intranazálisan vagy inhalációval a pulmonáris rendszeren keresztül. Ha az adagolást parenterálisan végezzük, előnyösen izotóniás vizes közegben vagy nem vizes, abszorbeálódó, gélképző folyékony poliészterrel képzett diszperziót alkalmazunk.

A találmány szerinti eljárással előállított beágyazott mikrorészecskék hatásos dózisát a kezelőorvos vagy állatorvos meg tudja határozni, a dózis nagysága függ az alkalmazott peptidektől és/vagy proteinektől és azok a mikrorészecskéken immobilizált mennyiségétől. Ezek a dózisok ismertek vagy ismert módon határozhatók meg.

A találmányt a következő példákkal mutatjuk be közelebről:

#### **I. példa**

**Kationcsérlők céljára (CE) citromsavval iniciált poliglikolsav polimerek (PGCA) előállítása, mikronizálása és tisztítása**

#### **Ia. példa: 7/1 PGCA**

Egy 500 ml-es üvegreaktorba bemérünk 242,63 g glikolidot (Purac Biochem, Arkelsedjik, Hollandia) és 57,37 g



citromsavat (Aldrich, Gillingham, Dorset, UK). A citromsavat szilikagélen szárítottuk (Fisher Scientific Loughborough, Leics, UK) egy Abderhalden készülékben (Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). A reakcióedényt olajfürdőbe merítjük és vákuum alá helyezzük (0,04 mbar) kb. 30 percig. A fürdőt ezután leengedjük és a hőmérsékletet 110°C-ra emeljük. Ha ezt a hőmérsékletet elérjük, a reaktort oxigénmentes nitrogénatmoszféra alá helyezzük, majd ismételten az olajfürdőbe merítjük. A keveréket 100 fordulat/perc mellett keverjük Heidolph keverő alkalmazásával (Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Németország). Ha a reaktor tartalma megolvadt, hozzáadunk 1,09 ml 0,1 M ón-2-etil-hexanoát oldatot (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) toluolban (Riedel de-Haen, Seelze, Németország) (sztöchiometrikus arány 50 ppm). Ezután újra vákuumot alkalmazunk egy folyékony nitrogéncsapon keresztül 30 másodpercig a toluol eltávolítására anélkül, hogy szignifikáns mennyiségű monomert eltávolítanánk. Az olajfürdő hőmérsékletét ezután 120°C-ra emeljük kb. 5 perc alatt, majd tovább emeljük 150°C-ra. Ezen a hőmérsékleten tartjuk kb. 4 órán át állandó mechanikus keverés közben, ezt 100 fordulat/perc értéken végezzük. Így nyerjük a cím szerinti polimert.

**Ib. példa: 10/1 PGCA**

A cím szerinti polimert az I(a) példában leírtak szerint nyerjük, de 257,40 g glikolidot, 42,60 g citromsavat és 1,10 ml 0,1 M ón-2-etil-hexanoát/toluol oldatot alkalmazunk, (sztöchiometrikus arány 50 ppm).

**Ic. példa: 15/1 PGCA - 15/1 PGCA**

Egy lánggal szárított edénybe, amely mechanikai keverővel és egy argonbevezető csővel van ellátva, beadagolunk 2,586 mól (300 g) glikolidot, 0,172 mól (33 g) vízmentes citromsavat és 862 ml (0,172 mmól, 0,2 M/toluol) ón-oktaátot. A polimerizációs reaktort és a tartalmát vízmentes argonnal többször átöblítjük. Miután a keverék megolvadt, a reagenseket 160°C-ra melegítjük és addig keverjük, amíg a polimer kezd az olvadékból kicsapódni. Röviddel a részleges kiválás után a keverést leállítjuk és a reakciót 160°C-on 2 órán át végezzük. A polimerizáció befejezésével a hőmérsékletet 120°C alá csökkentjük és a felesleges monomert csökkentett nyomáson eltávolítjuk. A kapott polimer összetételét infravörös és NMR spektroszkópiával igazoljuk.

#### **Mikronizálás**

Az I(a), I(b) és I(c) példák szerint nyert polimereket először egy Knife-örlő berendezéssel (IKA, Staufen, Németország) őröljük. Ezután Alljet Micronizer berendezésben (Fluid Energy Aljet, Plumsteadsville, Pennsylvania, USA) mikronizáljuk nyomás alatti száraz nitrogénáramban. Az I(a) példa szerinti polimer közepes részecskemérete 24,84  $\mu\text{m}$  Malvern Mastersizer/E (Malvern, Worcs., UK) berendezéssel meghatározva, a térfogat eloszlási modell és 200/5 cS szilikonolaj (Dow Corning, Senefte, Belgium) mint diszpergálószer alkalmazásával. Az I(b) és I(c) példák szerinti polimerek átlagos részecskemérete 4,69  $\mu\text{m}$ , illetve 6,31  $\mu\text{m}$  mikronizálás után.

#### **Tisztítás/nátrium só képzés**

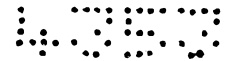
50 g I(a), I(b) és I(c) példák szerinti polimereket 2-2 l acetonban diszpergálunk (Riedel de-Haen, Seelze, Németor-



szág) és egy ultrahang készülékbe (Branson Ultrasonics BV, Soest, Hollandia) visszük 30 percre. Ezen idő alatt a diszperziókat homogenizáljuk is 9500 fordulat/percnél Ultra-turrax homogenizáló (IKA, Staufen, Németország) alkalmazásával. Az ultrahangos/homogenizálási lépés után a diszperziót 5000 fordulat/percnél 30 percen át centrifugáljuk Sorvall centrifugában (Sorvall, Wilmington, Delaware, USA). A felülúszót ezután eldobjuk, a centrifuga lepényeket ismételtén friss acetonban szuszpendáljuk és az ultrahangos/homogenizálási lépést megismételjük. Ha a második centrifugálást befejeztük, a felülúszót eldobjuk, a centrifuga lepényt ionmentesített vízben szuszpendáljuk. Egy végső ultrahangos/homogenizálási lépést végzünk ezután az aceton nyomok eltávolítására és a diszperziót még egyszer centrifugáljuk 5000 fordulat/percnél 30 percen át.

A centrifuga lepényeket ezután friss ionmentesített vízben szuszpendáljuk és megnézzük a pH értékét. Elegendő mennyiségű 0,2 M nátrium-karbonát oldatot adagolunk keverés közben, hogy a pH értékét 8 és 9 közötti értékre beállítsuk. A diszperziót ezután 30 percen át keverjük, majd vákuumban szűrjük Whatman no. 1 (24 cm átmérő) szűrőpapíron (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, Kent, UK). A szűrőlepényeket ezután ionmentesített vízzel átöblítjük, fagyasztjuk, majd liofilizáljuk Edwards SuperModulyo Lyophilizer berendezésben (Edwards, Crawley, West Sussex, UK).

A tisztítást differential scanning caloriméterrel (DSC) követjük TA DSC912S (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA) alkalmazásával, a melegítési sebesség  $10^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ . A kapott DSC termogramok egyik esetben sem mutatnak endoterm



csúcsot, amely a monomer glikolidra utal, de endotermeket mutat 176°C-nál, 178°C-nál és 180°C-nál az I(a), I(b), illetve I(c) példák esetében.

## **II. példa**

### **Glikolid/almasav kopolimer (PGMA) kationcserélő mikrorészecske előállítása**

A cím szerinti mikrorészecskét az I(c) példában leírtak szerint állítjuk elő, de 2,586 mól (300 g) glikolidot, 0,172 mól (23 g) vízmentes almasavat és 862 ml (0,172 mmól, 0,2M toluolban) ón-oktaátot alkalmazunk. A polimer o.p.-jét differential scanning calorimetriával határozzuk meg (o.p.=206°C).

A szilárd polimert őröljük 125 µm-es átlagos részecskeátmérő eléréséig Wiley malomban. Ezután a részecskék méretét 5-10 µm átmérőre csökkentjük egy jet-malom alkalmazásával nyomás alatti vízmentes nitrogénáramban. A kapott mikrorészecskéket acetonnal átöblítjük a monomer nyomok és a kis molekulatömegű oligomerek eltávolítására. A terméket ezután csökkentett nyomáson 40°C-on szárítjuk a felhasználásig. A száraz mikrorészecskék átlagos átmérőjét részecskeanalizátorral határozzuk meg.

## **III. példa**

### **Borkósavval iniciált poli(glikolsav) polimer (PGTA) előállítása, mikronizálása és tisztítása, kationcserélő (CE) céljára**

#### **III(a) példa: 10/1 PGTA**

Egy 500 ml-es üvegreaktorba bemérünk 264,65 g glikolidot (Purac, Biochem, Arkeldsedjik, Hollandia) és 34,22 g l-borkósavat (Riedel de-Haen, Seelze, Németország). A bor-

kősavat szilikagélen szárítottuk (Fisher Scientific, Loughborough, Leics, UK) egy Abderhalden berendezésben (Aldrich, St. Louis, MO.) A reaktor egy olajfürdőbe merítjük 40°C-on, vákuum alá helyezzük (0,04 mbar) 30 percre. A fürdőt ezután leeresztjük, a hőmérsékletét 110°C-ra emeljük, majd ha a hőmérséklet ezt az értéket elérte, a reaktort oxigénmentes nitrogénatmoszféra alá helyezzük, majd ismételten bemerítjük. A tartalmát 100 fordulat/perc sebességgel keverjük (Heidolph Elktro GmbH, Kelheim, Németország). Amikor a reaktor tartalma megolvadt, hozzáadunk 1,14 ml 0,1 M ón-2-etil-hexanoát oldatot (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) toluolban (Riedel de-Haen, Seelze, Németország) (sztöchiometrikus arány 50 ppm). A vákuumot ismételten alkalmazzuk egy folyékony nitrogéncsapon keresztül 30 másodpercig a toluol eltávolítására anélkül, hogy szignifikáns mennyiségű monomert eltávolítsunk. Az olajfürdő hőmérsékletét ezután 120°C-ra emeljük kb. 5 perc alatt, majd 150°C-ra emeljük. Ezen a hőmérsékleten tartjuk kb. 4 órán át konstans mechanikus keverés közben, ezt 100 fordulat/perc értéken végezzük. Így nyerjük a cím szerinti polimert.

### **Mikronizálás**

A III(a) példa szerinti polimerek először egy Knife-örlő berendezéssel (IKA, Staufen, Németország) őröljük, majd Alljet Micronizer berendezésben (Fluid Energy Aljet, Plumsteadsville, Pennsylvania, USA) mikronizáljuk nyomás alatti száraz nitrogénáramban. A kapott átlagos részecskeátmérő 12,42 µm Malvern Mastersizer/E berendezéssel meghatározva (Malvern, Worcs., UK), a térfogat eloszlási modell és disz-

pergálószerként 200/5 cS szilikonolaj (Dow Corning, Seneffe, Belgium) alkalmazásával.

### **Tisztítás/nátrium só képzés**

50 g-os adagokban III(a) példa szerinti polimert diszpergálunk 2 l acetonban (Riedel de-Haen, Seelze, Németország) és egy ultrahangos készülékbe visszük (Branson Ultrasonics BV, Soest, Hollandia) 30 percre. Ezen idő alatt a diszperziót homogenizáljuk is 9500 fordulat/percnél Ultraturrax T25 homogenizáló (IKA, Staufen, Németország). Az ultrahangos/homogenizálási lépés után a diszperziót 5000 fordulat/percnél 30 percig centrifugáljuk Sorvall centrifugában (Sorvall, Wilmington, Delaware, USA). A felülúszót eldobjuk, a centrifuga lepényt ismételten friss acetonban szuszpendáljuk és az ultrahangos/homogenizálási lépést megismételjük. Ha a második centrifugálást befejeztük, a felülúszót eldobjuk, a szűrőlepényt ionmentesített vízben szuszpedáljuk. Ezután egy végső ultrahangos/homogenizálási lépést végzünk az aceton nyomok eltávolítására, majd a diszperziót ismételten centrifugáljuk 5000 fordulat/percnél 30 percen át.

A centrifuga lepényt ezután friss ionmentesített vízben szuszpendáljuk és megmérjük a pH értékét. Elegendő mennyiségű 0,2 M nátrium-karbonát oldatot adagolunk a pH 8 értékre való beállításához. A diszperziót ezután 30 percen át keverjük, majd vákuumban szűrjük Whatman no. 1 (24 cm átmérő) szűrőpapíron (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, Kent, UK). A szűrőlepényt ezután ionmentesített vízzel átöblítjük, fagyasztjuk, majd liofilizáljuk Edwards SuperModulyo Lyophilizer berendezésben (Edwards, Crawley, West Sussex, UK).



A tisztítást DSC-vel követjük TA DSC912S (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA) alkalmazásával, a melegítési sebesség  $10^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ . A kapott DSC termogramok nem mutatnak endoterm csúcsot, amely a monomer glikolidra jellemző, de endotermet mutat  $181^{\circ}\text{C}$  értéknél.

### **III(b) példa**

#### **15/1 PGTA**

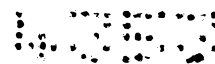
A cím szerinti polimert az I(c) példában leírtak szerint állítjuk elő, de 2,586 mól (300 g) glikolidot, 0,172 mól (2,68 g) vízmentes bórkősavat és 862 ml (0,0172 mmól, 0,2 M/toluol) ón-oktoátot alkalmazunk. A polimer o.p.-jét differential scanning calorimetriával határozzuk meg, o.p.:  $204^{\circ}\text{C}$ .

A kapott szilárd polimert ezután őröljük  $125\ \mu\text{m}$  átlagos részecskeátmérő eléréséig Wiley malomban. A részecskeméretet tovább csökkentjük  $5\text{-}10\ \mu\text{m}$  értékre jet malom alkalmazásával nyomás alatti száraz nitrogénáramban. A kapott mikrorészecskéket acetonnal átöblítjük a monomer nyomok és a kis molekulatömegű oligomerek eltávolítására. A terméket ezután csökkentett nyomáson kb.  $40^{\circ}\text{C}$ -on szárítjuk. Az átlagos átmérőt részecskeméret analízissal határozzuk meg.

### **IV. példa**

#### **Poliglikolid bázisú anioncserélő mikrorészecske (AE-1) előállítása**

Az anioncserélőt két lépésben állítjuk elő. Először kis molekulatömegű poliglikolidot állítunk elő az I(c) példában leírtak szerint, de a következő keveréket alkalmazzuk: 1 mól, 116 g glikolid, 30 mmól (2,22 g) 1,3 propándiol mint iniciátor és 0,03 mmól ón-oktoát. A részecskeméret csökkentést és a tisztítást



títást az I(c) példában leírtak szerint végezzük. A 2. lépésben a gyakorlatilag nem-ionos mikrorészecskéket forró híg diamin oldatban (kb. 80°C) inkubáljuk például ismert koncentrációjú hexándiamin/dioxán oldatot alkalmazunk argonban. A diamin koncentrációját a dioxánban acidimetrával határozzuk meg. Ha a reakció gyakorlatilag befejeződött, az amidált mikrorészecskéket szűrjük, dioxánnal átöblítjük, majd csökkentett nyomáson szárítjuk. Az anioncserélő (amidált részecskék) kötési kapacitását úgy határozzuk meg, hogy 1) a nitrogénre elemanalízist végzünk, és 2) meghatározzuk a Naproxen kötés mértékét úgy, hogy mérjük a híg oldatból eltávolított hatóanyag mennyiségét HPLC-vel. Ez utóbbit az immobilizált Naproxen felszabadulásával igazoljuk, ezt ismert koncentrációjú híg nátrium-hidroxid oldattal végzzük.

#### **V. példa**

##### **Propándiollal iniciált poli(alkid-ko-glikolid)**

##### **kopolimerek előállítása beágyazó anyagként való alkalmazásra**

##### **V(a) példa: 75/25 P(I)LGPD**

Egy 500 ml-es üvegreaktorba bemérünk 235,01 g l-laktidot (Purac, Biochem, Arkeldsedjik, Hollandia) és 63,09 g glikolidot (Purac, Biochem, Arkeldsedjik, Hollandia) és 1,90 g propándiolt (Riedel de-Haen, Seelze, Németország), majd hozzáadunk 3,96 ml 0,1 M ón-2-etil-hexanoát oldatot (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) toluolban (Riedel de-Haen, Seelze, Németország) (sztöchiometrikus arány 200 ppm). A keveréket ezután vákuumban kb. 1 órán át szárítjuk a toluol eltávolítására, majd a reaktort oxigénmentes nitrogénatmoszféra alá he-

lyezzük és olajfürdőbe merítjük, amelyet 160°C-ra előmelegítettünk. A reaktor tartalmát 100 fordulat/perc mellett keverjük (Heidolph keverő, Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Németország). Amikor a reaktor tartalma megolvadt, a hőmérsékletet kb. 180°C-ra emeljük, majd ezen az értéken tartjuk 3 órán át. Így egy amorf kopolimert kapunk. A kopolimer molekulatömege (Mw) 12 500 g/mól géelpermeációs kromatográfiával (GPC) meghatározva Waters 510 Pump, Waters 410 differenciál refraktométer (Waters, Milford, Massachusetts, USA), fényszórásos detektálás, Wyatt Minidawn Light Scattering Detector (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California, USA) alkalmazásával.

**V(b) példa**

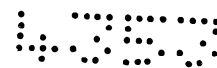
**90/10 P(l)LGPD**

A cím szerinti terméket az V(a) példában leírtak szerint állítjuk elő, de 274,31 g l-laktidot, 24,55 g glikolidot, 1,14 g propándiolt és 3,89 ml 0,1 M ón-2-etil-hexanoát/toluol oldatot (sztöchiometrikus arány 200 ppm) alkalmazunk. Egy kristályos kopolimert nyerünk, ennek molekulatömege 20 780 g/mól GPC-vel meghatározva.

**V(c) példa**

**90/10 P(d,l)LGPD**

A cím szerinti terméket az V(a) példában leírtak szerint állítjuk elő, de 274,31 g d,l-laktidot, 24,55 g glikolidot, 1,14 g propándiolt és 3,86 ml 0,1 M ón-2-etil-hexanoát/toluol oldatot (sztöchiometrikus arány 200 ppm) alkalmazunk. Amorf kopolimert nyerünk. A kopolimer molekulatömege 20 650 g/mól GPC-vel meghatározva.



### **V(d) példa**

#### **Propándiollal iniciált poli(l-laktid-ko-d,l-laktid) kopolimer (PLGPD) alkalmazása bevonóanyagként 80/20 P(l)L(d,l)LPD**

A cím szerinti terméket az V(a) példában leírtak szerint állítjuk elő, de 239,09 g l-laktidot, 59,77 d,l-laktidot, 24,55 g glikolidot és 1,14 g propándiolt, valamint 3,96 ml 0,1 M ón-2-  
-etil-hexanoát/toluol oldatot (sztöchiometrikus arány 200 ppm) alkalmazunk. Amorf kopolimert nyerünk, ennek molekulatömege ( $M_w$ ) 22 320 g/mól GPC-vel meghatározva. Üvegesedési hőmérséklete 48°C DSC-vel meghatározva.

#### **Tisztítás**

Az V(a), V(b) és V(c) példák szerint előállított polimereket átmoszuk úgy, hogy a 30 tömeg%-os acetonitriles (Labscan, Dublin, Írország) oldatot 8 ml/perc sebességgel ionmentesített vízbe porlasztjuk, amely 2°C-ra van lehűtve, ezt egy 6 l-es köppennyel ellátott reaktor tartalmazza, amelyet egy keringető fűrdőhöz kapcsolunk és 350 fordulat/perc mellett keverjük egy Heidolph keverővel (Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Németország). Az oldatokat egy Vibra-Cell VC 50 Atomization típusú fűvókába tápláljuk (Bioblock, Illkirch, Franciaország) egy Masterflex szivattyú (Cole Parmer Instrument Co., Niles, Illinois, USA) alkalmazásával, a porlasztást 12 kHz ultrahang frekvencia alkalmazásával végezzük. A kapott diszperziót Whatman No. 1 szűrőpapíron (24 cm) (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, Kent, UK) szűrjük, a szűrőlepenyt ionmentesített vízzel átmoszuk, fagyasztjuk, majd liofilizáljuk Edwards



SuperModulyo Lyophilizer berendezésben (Edwards, Crawley, West Sussex, UK).

A tisztaságot DSC-vel ellenőrizzük TA DSC912s alkalmazásával (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA), a melegítés sebessége 10°C/perc, az üvegesedési hőmérséklet értéke (T<sub>g</sub>) 44°C, 49°C, 45°C és 48°C az V(a), V(b), V(c), illetve V(d) polimerek esetén.

## VI. példa

### Peptid-tartalmú kationcserélők előállítás

#### VI(a) példa

#### Peptid A bevitele (p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>, LHRH analóg)

4-4 g I(a), I(b), I(c) és II(a) példák szerinti nátriumsót diszpergálunk 70 ml ionmentesített vízben oldott 1,33 g szabad bázis formájú Peptid A-ban (Kinerton Ltd., Dublin, Írország). A kapott diszperziót szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáljuk, majd 9 cm átmérőjű Whatman no. 1 szűrőpapíron (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, Kent, UK) szűrjük. A szűrőlepenyeket ionmentesített vízzel átöblítjük, fagyasztjuk, majd liofilizáljuk Edwards SuperModulyo Lyophilizer berendezésben (Edwards, Crawley, West Sussex, UK). A mintákat ezután elemanalízissel nitrogénre bevizsgáljuk a kötött Peptid A mennyiségének meghatározására. Az alábbi eredményeket kapjuk:

Példa száma	CE példa száma	CE polimer	Peptid A tömeg% kötött
VI(a)(i)	I(a)	7/1 PGCA	24,52%
VI(a)(ii)	I(b)	10/1 PGCA	12,60%
VI(a)(iii)	I(c)	15/1 PGCA	19,29%
VI(a)(iv)	10/1 PGTA	17,60%	



### VI(b) példa

**Peptid B bevitele (H- $\beta$ -D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>, a két Cys diszulfidkötéssel kapcsolódik, szomatosztatin analóg)**

A VI(b) példában leírtak szerint járunk el, 4 g I(a), I(b), I(c) és II(a) példák szerinti nátriumsó és 1,33 g szabad bázis formájú Peptid B (Kinerton Ltd., Dublin, Írország) alkalmazásával, így nyerjük az I(a), I(b), I(c) kötött mikrorészecskéket, amelyeken Peptid B van immobilizálva. A mintákat nitrogéntartalomra analizáljuk a kötött Peptid B meghatározására. A kapott eredmények a következők:

Példa száma	CE példa száma	CE polimer	Peptid B tömeg% kötött
VI(b)(i)	I(a)	7/1 PGCA	25,20%
VI(b)(ii)	I(b)	10/1 PGCA	13,10%
VI(b)(iii)	I(c)	16/1 PGCA	19,64%
VI(b)(iv)	III(a)	10/1 PGTA	14,23%

### VII. példa

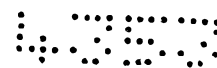
**Beágyazott, polipeptid-tartalmú kationcserélő előállítás porlasztással**

Polipeptid-tartalmú kationcserélőt diszpergálunk a beágyazó kopolimerek acetonitriles (Labscan, Dublin, Írország) oldatában az alábbiak szerint. A diszpergálást homogenizálással végezzük Ultra-turrax T25 (IKA, Staufen, Németország) kb. 9500 fordulat/percnél 5 percig. A beágyazó kopolimer/acetonitril oldatok koncentrációja 12,5 t% és 25 t% közötti érték, a



beágyazó kopolimer és a polipeptid-tartalmú kationcserélő közötti tömegarány 1:1 és 1,3:1 közötti érték.

A diszpergálás után a diszperziót egy Vibra-Cell VC50 atomizálóba visszük (Bioblock, Illkirch, Franciaország), az ultrahangos frekvencia 16 kHz, ezt egy kerámia szivattyúval (FMI, Oyster Bay, NY, USA) biztosítjuk, amely 2 ml/perc áramlási sebesség értékre van beállítva. A szelepből a diszperziót izopropil-alkoholba (IPA, Labscan, Dublin, Írország) porlasztjuk, amelyet  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttünk szárazjég pelletek adagolásával (A.I.G., Dublin, Írország). A nem oldó hatású IPA-t 30 fordulat/perc mellett keverjük Heidolph keverő alkalmazásával (Heidolph Elktro GmbH, Kelheim, Németország), majd a porlasztás befejezése után a teljes diszperziót hagyjuk szobahőmérséklet és  $10^{\circ}\text{C}$  közötti értékre melegedni. A beágyazott mikrorészecskéket ezután vákuumszűréssel Whatman no. 1 szűrőpapíron eltávolítjuk (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, Kent, UK), a szűrőlepenyt ionmentesített vízzel átmoszuk, fagyaszttjuk liofilizáljuk Edwards SuperModulyo Lyophilizer berendezés (Edwards, Crawley, West Sussex, UK) alkalmazásával. A kapott beágyazott mikrorészecskéket analizáljuk Malvern Mastersizer/E alkalmazásával (Malvern, Worcs, UK), a diszpergálószer 1% Tween 20 vízben. A beágyazott mikrorészecskének meghatározzuk a nitrogéntartalmát a peptidkötések meghatározására. A következő táblázatban összefoglaljuk a kísérleti eredményeket:

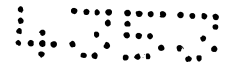


Példa száma	Peptid tartalmú CE példa száma	Beágyazó kopolimer példa száma	Beágyazó kopolimer koncentrációja az acetonitrilben t%	Beágyazó kopolimer: peptid tartalmú CE	Átlagos részecske átmérő	Peptid tartalom t%
VII(a)	VI(a)(ii)	V(a)	24,31%	1:1	122,14 $\mu$ m	5,38% Peptid A
VII(b)	VI(a)(ii)	VI(b)	22,41%	1:1	120,15 $\mu$ m	6,38% Peptid A
VII(c)	VI(a)(iii)	V(b)	12,5%	1:1	79,30 $\mu$ m	7,76% Peptid A
VII(d)	VI(a)(iii)	V(c)	12,5%	1:1	77,85 $\mu$ m	8,93% Peptid A
VII(e)	VI(a)(iv)	V(c)	14,95%	1:1	136,74 $\mu$ m	8,75% Peptid A
VII(f)	VI(a)(i)	V(c)	14,92%	1,27:1	80,59 $\mu$ m	10,31% Peptid A
VII(g)	VI(b)(ii)	V(a)	25,37%	1:1	140,58 $\mu$ m	2,63% Peptid B
VII(h)	VI(b)(ii)	V(b)	20%	1,51:1	96,77 $\mu$ m	5,98% Peptid B
VII(i)	VI(b)(iii)	V(b)	12,5%	1:1	102,56 $\mu$ m	7,69% Peptid B
VII(j)	VI(b)(iii)	V(c)	12,5%	1:1	83,72 $\mu$ m	7,90% Peptid B
VII(k)	VI(b)(iv)	V(c)	14,95%	1:1	135,14 $\mu$ m	6,69% Peptid B
VII(l)	VI(b)(i)	V(c)	14,92	1,26:1	123,18 $\mu$ m	10,11% Peptid B

A mintákat 180  $\mu$ m-es szűrőn szűrjük (Bioblock, Illkirch, Franciaország) az in vivo és/vagy in vitro vizsgálatot megelőzően.

A kötött mikrorészecskéket vagy beágyazott mikrorészecskéket in vitro vizsgáljuk a kötött peptid vagy kötött protein felszabadulásának meghatározására a következő eljárás szerint.

50 mg tömegű alikvot kötött mikrorészecskét vagy beágyazott



mikrorészecskét egy folyamatos áramlású cella rendszerbe visszük, ahol a kb. 37°C hőmérsékletű és kb. 7,2 pH-jú pufferolt foszfát oldat a kötött mikrorészecskék vagy beágyazott mikrorészecskék teljes tömegén áramlik át kb. 45 ml/óra sebességgel. A felszabadult hatóanyagot tartalmazó puffer mintákat 4°C-on analizáljuk peptid vagy protein tartalomra 1 vagy 2 napos intervallumokban. A mikrorészecskék felszabadulási profilját 2 hét át vizsgáljuk.

A kötött mikrorészecskéket vagy beágyazott mikrorészecskéket *in vivo* rendszerben is vizsgáljuk a kötött peptid vagy kötött protein felszabadulásának meghatározására. A vizsgálati mintákat hím Wistar patkányoknak adagoljuk (Bioresources, Trinity College, Dublin, Írország) intramuszkuláris injekció formájában combjukba. A szuszpenzió közeg 3%-os karboximetil-cellulóz és 1% Tween 20 sóoldatban. A Peptid A-tartalmú minták esetében a hatásos ekvivalens dózis 40 µg/kg/nap. A dózis a Peptid B-tartalmú minták esetében 1 mg/kg/nap. Szív punkcióval mintákat veszünk és megvizsgáljuk Peptid A-ra és Peptid B-re specifikus radioimmun vizsgálattal (RIA). A Peptid A tartalmú minták esetében (a Peptid A egy LHRH analóg) tesztoszteron RIA-t is alkalmaztunk a tesztoszteron szupresszió meghatározására. A szuszpenzió-közeg helyett gélképzőket is lehet alkalmazni bizonyos esetekben. A kapott eredményeket a következő A és B táblázatokban foglaljuk össze.

**A táblázat**

Peptid A példa	Peptid A (> 150 pg/ml) napok száma	Tesztoszteron (<1 ng/ml) napok száma
VII(a)	20	21
VII(b)	10	10
VII(c)	2	11
VII(d)	2	11
VII(e)	2	13
VII(f)	2	16
VII(a) gél formában	25	44

**B. táblázat**

Peptid B példa	Peptid B (> 1000 pg/ml) napok száma
VII(g)	nem vizsgálva
VII(h)	nem vizsgálva
VII(i)	nem vizsgálva
VII(j)	15
VII(k)	10
VII(l)	10

**VIII. példa****VIII(a) Permetezés oldószerként acetonitril és nem-oldó hatású anyagként szobahőmérsékletű IPA alkalmazásával**

1,06 g I(c) példa szerinti kationcserélőt (nem polipeptidhez kötve) 25,24 tömeg% V(a) példa szerinti beágyazó kopolimer acetonitriles (Labscan, Dublin, Írország) oldatában diszpergálunk olyan arányban, hogy a kationcserélő és a beágyazó kopolimer közötti tömegarány 1,03:1. A diszpergálást homogenizálással végezzük Ultra-turrax T25 berendezés (IKA,

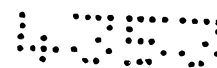


Staufen, Németország) alkalmazásával 9500 fordulat/perc, 5 perc alatt.

A diszpergálás után a diszperziót egy Vibra-Cell VC50 atomizáló fúvókájára visszük (Bioblock, Illkirch, Franciaország), az ultrahangos frekvencia értékét 16 kHz értékre állítjuk be kerámia szivattyú (FMI, Oyster Bay, NY, USA) alkalmazásával, áramlási sebesség 2 ml/perc. A fúvóka elérése után a diszperziót IPA-ba (Labscan, Dublin, Írország) porlasztjuk szobahőmérsékleten 17-22°C. Az IPA nem oldó hatású oldószer, ezt keverjük 300 fordulat/percnel Heidolph keverő alkalmazásával (Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Németország). Ha a porlasztást befejeztük, a diszperziót további 60 percen át szobahőmérsékleten keverjük, majd a beágyazott részecskéket vákuumban szűréssel elválasztjuk Whatman szűrőpapír alkalmazásával (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, Kent, UK). A szűrőleplenyt ionmentesített vízzel átöblítjük, fagyasztjuk, liofilizáljuk Edwards SuperModulyo Lyophilizer berendezés (Edwards, Crawley, West Sussex, UK) alkalmazásával. Meghatározzuk a kapott részecskék részecskeméretét Malvern Mastersizer/E (Malvern, Worcs., UK) alkalmazásával, diszpergálószer 1% Tween 20 vízben. A kapott részecskék átlagos részecskemérete ( $d(0,5)$ ) 84,75  $\mu\text{m}$ .

#### **VIII(b) Porlasztás oldószerként etil-acetát és nem oldó hatású szobahőmérsékletű IPA alkalmazásával**

A porlasztást lényegében a VIII(a) példában leírtak szerint végezzük 0,99 g I(c) példa szerinti kationcserélő (nem polipeptidhez kötve) alkalmazásával, ezt 24,88 tömeg% V(a) példa szerinti beágyazó kopolimert etil-acetátban tartalmazó

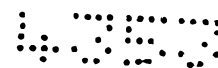


oldatban diszpergáljuk úgy, hogy a kationcserélő és a beágyazó kopolimer közötti tömegaránya 0,96:1. A kapott részecskék átlagos részecskemérete ( $d(0,5)$ ) 100,56  $\mu\text{m}$ .

### **VIII(c) Porlasztás oldószerként etil-acetát és nagyobb frekvencia alkalmazásával**

Kb. 1,02 g I(c) példa szerinti kationcserélőt (nem polipeptidhez kötve) 15,414 tömeg% V(a) példa szerinti beágyazó kopolimert etil-acetátban tartalmazó oldatban diszpergálunk úgy, hogy a kationcserélő és a beágyazó kopolimer közötti tömegarány 1,05:1. A diszpergálást homogenizálással végezzük Ultra-turrax T25 (IKA, Staufen, Németország) alkalmazásával, 9500 fordulat/perc, 5 perc.

A diszpergálás után a diszperziót Martin Walter 400 GSIP porlasztóra visszük (Sodeva, Le Bouget du Lac, Franciaország), az ultrahangos frekvencia értékét 34,6 kHz-re állítjuk be egy kerámia szivattyú (FMI, Oyster Bay, NY, USA) alkalmazásával, az áramlási sebesség 5 ml/perc. A fúvóka elérése után a diszperziót IPA-ba porlasztjuk (Labscan, Dublin, Írország), amely  $-77^{\circ}\text{C}$ -ra van lehűtve szárazjég pelletekkel (A.I.G., Dublin, Írország). Az IPA nem oldó hatású oldószer, ezt 300 fordulat/perccel keverjük Heidolph keverő alkalmazásával (Heidolph Elktro GmbH, Kelheim, Németország). A porlasztás befejeztével a bevonatos részecskéket vákuumban szűréssel Whatman no. 1 szűrőpapíron elválasztjuk, (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, Kent, UK), a szűrőlepenyeket ionmentesített vízzel mossuk, fagyasztjuk és liofilizáljuk Edwards SuperModulyo Lyophilizer berendezésben (Edwards, Crawley, West Sussex, UK). A kapott részecskéknek meghatározzuk a részecskemérete-



tét Malvern Mastersizer/E (Malvern, Worcs., UK) berendezésben, diszpergálószer 1%, Tween 20 vízben. A kapott részecskék átlagos részecskemérete ( $d(0,5)$ ) 95,69  $\mu\text{m}$ .

### **IX. példa**

**Szomatosztatin analóg C és D peptidek CE-hez való kötése, majd beágyazása**

#### **IX(a): Peptid C bevitele**

1,01 g I(c) példa szerinti nátriumsót, 0,25 g szabad bázis formájú C peptidet 40 ml ionmentesített vízben tartalmazó oldatban diszpergálunk (C peptid: N-hidroxietilpiperazinil-acetil-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>, a két Cys csoport diszulfidkötéssel van kapcsolva, Kinerton Ltd., Dublin, Írország). A diszperziót keverés közben 2 órán át inkubáljuk, majd 9 cm átmérőjű Whatman no. 1 szűrőpapíron szűrjük (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, Kent, UK). A szűrőlepenyt ionmentesített vízzel átöblítjük, fagyasztjuk, majd liofilizáljuk Edwards SuperModulyo Lyophilizer berendezésben (Edwards, Crawley, West Sussex, UK). A mintát ezután nitrogénre analizáljuk, ennek alapján a kötött peptid mennyisége 20,21%.

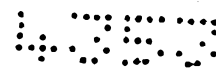
#### **IX(b): D peptid bevitele**

A IX(a) példában leírtak szerint járunk el, de 2,04 g I(c) példa szerinti nátriumsót alkalmazunk, ezt 0,51 g szabad bázis formájú D peptidet (N-hidroxietilpiperazinil-etilszulfonil-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>, a két Cys csoport diszulfidkötéssel van kapcsolva), tartalmazó 80 ml oldatban diszpergáljuk. Ezután meghatározzuk a minta nitrogéntartalmát, ennek alapján a kötött peptid tartalom 19,53%.

### X. példa

A IX(a) és IX(b) példák szerinti kötött mikrorészecskéket a 7. példában leírtak szerint eljárva beágyazunk, a következő eredményeket kapjuk:

Példa száma	Peptid tartalmú CE	Beágyazó kopolimer	Bevonó kopolimer koncentrációja az acetonitrilben t%	Bevonó kopolimer: peptid tartalmú CE	Átlagos részecske átmérő	Peptid tartalom t%
X(a)	IX(a)	V(c)	12,52%	1:1	83,33	9,48%
X(b)	IX(b)	V(c)	12,48%	0,98:1	72,15	8,87%
X(c)	IX(b)	V(d)	12,35%	0,98:1	86,03	6,74%



## Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás beágyazott, kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék előállítására, amelynél a beágyazott, kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék kötött mikrorészecskét vagy mikrorészecskéket és egy abszorbeálódó, beágyazó polimert tartalmaznak, amelynél

a kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék egy abszorbeálódó, heteroláncú polimer magot és egy vagy több peptidet, egy vagy több proteint vagy ezek kombinációját tartalmazzák az abszorbeálódó heteroláncú polimer magon immobilizálva, ahol az említett valamely peptid lehet: növekedési hormon felszabadító peptid (GHRP), luteinizáló hormon-felszabadító hormon (LHRH), szomatosztatin, bombezin, gasztrin felszabadító peptid (GRP), kalcitonin, bradikinin, galanin, melanocita stimuláló hormon (MSH), növekedési hormon felszabadító faktor (GRF), amilin, tachikinin, szekretin, paratiroid hormon (PTH), enkafelin, endotelin, kalcitonin gén felszabadító peptid (CGRP), neuromedin, paratiroid hormonnal kapcsolatos protein (PTHrP), glükagon, neurotenzin, adrenokortikotropikus hormon (ACTH), peptid YY (PYY), glükagon felszabadító peptid (GLP), vazoaktív intesztinális peptid (VIP), hipofízis adenilát cikláz aktiváló peptid (PACAP), motilin, P anyag, neuropeptid Y (NPY), TSH és ezek analógjai és fragmentjei vagy gyógyszerészetileg elfogadható sói; továbbá, a protein lehet egymástól függetlenül növekedési hormon, eritropoietin, granulocita-kolónia stimuláló fak-



tor, granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor vagy interferon;

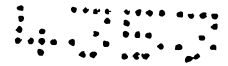
és a diszperziót úgy állítjuk elő, hogy a szilárd kötött mikrorészecskéket az abszorbeálódó beágyazó polimer oldatában diszpergáljuk egyidejű homogenizálással, és a kapott diszperziót egy fúvókán át 12 kHz és 36 kHz közötti ultrahangos frekvencia értéken és a porlasztást egy az abszorbeálódó beágyazó polimert nem oldó közegben porlasztjuk és az áramlási sebesség 1 ml/perc és 15 ml/perc közötti érték.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az említett közeg izopropanol vagy etanol.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy az abszorbeálódó polimert tartalmazó oldatban az abszorbeálódó polimer mennyisége 5-30% és a közeg hőmérséklete szobahőmérséklet és  $-80^{\circ}\text{C}$  közötti érték.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy a mikrorészecskékhez kötött peptid, peptidek, protein vagy proteinek vagy ezek kombinációinak mennyisége 0,1-30 tömeg% a kötött mikrorészecske tömegére számolva.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy az abszorbeálódó polimer mag glikolát egységeket és citrátcsoportokat tartalmaz, ahol a glikolát egységek és citrátcsoportok közötti arány 7-1 és 20-1 közötti érték vagy glikolát egységet és tartarátcsoportokat tartalmaz, ahol a glikolát egységek és a tartarátcsoportok közötti arány 7-1 és 20-1 közötti érték vagy glikolát egységeket és malátcsoportokat tartalmaz, ahol a glikolát egységek és malátcsoport közötti arány 7-1 és 20-1 közötti érték.



6. Az 5. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy a beágyazó polimer a következőket tartalmazza:

(a) l-kaltid bázisú egységek és glikolid bázisú egységek, ahol az l-laktid bázisú egységek és glikolid bázisú egységek közötti arány 60-40 és 90-10 közötti érték,

(b) d,l-laktid bázisú egységek és glikolid bázisú egységek, ahol a d,l-laktid bázisú egységek és glikolid bázisú egységek közötti arány 60-40 és 90-10 közötti érték,

(c) d,l-laktid bázisú egységek, vagy

(d) l-laktid bázisú egységek és d,l-laktid bázisú egységek, ahol az l-laktid bázisú egységet és a d,l-laktid bázisú egységek közötti arány 80-20.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy az abszorbeálódó beágyazó polimer mennyisége 5-70 tömeg% a beágyazott kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék tömegére számolva.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy az abszorbeálódó beágyazó polimer mennyisége 20-60 tömeg% a beágyazott, kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék tömegére számolva.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy az abszorbeálódó beágyazó polimer mennyisége 30-50 tömeg% a beágyazott kötött mikrorészecske vagy mikrorészecskék tömegére számolva.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy a peptid egy LHRH analóg.



11. A 10. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy az LHRH analóg p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>.

12. A 9. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy a peptid egy szomatosztatin analóg.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy a szomatosztatin analóg H-β-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>, ahol a két Cys csoport diszulfidkötéssel kapcsolódik, vagy N-hidroxietilpiperazinil-acetil-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>, ahol a két Cys diszulfidkötéssel kapcsolódik, vagy N-hidroxietilpiperazinil-etilszulfonil-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>, ahol a két Cys csoport diszulfidkötéssel van kapcsolva

A meghatalmazott:

**DANUBIA**

*Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.*

**Olchváry Gézáne**  
szabadalmi ügyvivő

*Olchváry Gézáne*  
*2001. 06.27.*