

ÖZET**GLATİRAMER ASETAT İÇEREN DEPO SİSTEMİ**

5 Mevcut buluş, glatiramer asetatın ve glatiramerin farmakolojik olarak kabul edilebilir diğer tuzlarının uzun etkili dozaj formları ile ilgilidir. Özellikle tercih edilenler, glatiramer asetatın uzatılmış salımı için depo sistemleri ve diğer implante edilebilir sistemlerdir.

İSTEMLER

1. Terapötik olarak etkili miktarda glatiramer asetat ve farmasötik olarak kabul edilebilir biyobozunur bir taşıyıcı olarak poli(D,L-laktit-ko-glikolit) (PLGA) içeren uzun etkili bir parenteral farmasötik bileşim **olup**, bileşim 20 ila 750 mg arasında bir glatiramer asetat dozu ile haftada bir kereden 6 ayda bir kereye kadar bir dozlama programı için uygun bir sürekli salımlı depo formundadır,
özelligi; bileşimin terapötik olarak etkili miktarda glatiramer asetat içeren bir iç sulu faz, PLGA içeren suyla karışmayan bir polimerik faz ve bir dış sulu fazı içermesi ve bileşimin bir su içinde yağ içinde su çift emülsiyonlaştırma prosesi ile hazırlanan mikropartiküller formunda olmasıdır.
2. İstem 1'e göre farmasötik bileşim **olup, özelliği**; ihtiyaç duyan bir denekte tıbbi olarak kabul edilebilir bir konuma implantasyonu için uygun depo formunda olmasıdır.
3. İstem 1 veya 2'ye göre farmasötik bileşim **olup, özelliği**; 2 haftada bir ila ayda bir seferlik bir dozlama programı için uygun olmasıdır.
4. İstem 1 veya 2'ye göre farmasötik bileşim **olup, özelliği**; glatiramer asetatın 0,14 glutamik asit, 0,43 alanin, 0,10 tirozin ve 0,33 lizin mol oranlarında L-alanin, L-glutamik asit, L-lizin ve L-tirozin içermesidir.
5. İstem 1 veya 2'ye göre farmasötik bileşim **olup, özelliği**; subkütan veya intramüsküler implantasyon için uygun olmasıdır.
6. İstem 1'e göre farmasötik bileşim **olup, özelliği**; dış su fazın polivinil alkol (PVA), polisorbitat, polietilen oksit-polipropilen oksit blok kopolimerleri ve selüloz esterleri arasından seçilmiş bir yüzey aktif madde içermesidir.
7. İstem 1 ya da 2'ye göre farmasötik bileşim **olup, özelliği**; bileşimin lokal ve/veya sistemik seviyede yan etkilerin sıklığının ve/veya şiddetinin azalmasıyla birlikte glatiramer asetatın ticari olarak temin edilebilen günlük enjekte edilebilir dozaj formlarına eşit ya da üstün terapötik etkinlik sağlaması ve bileşimin ayrıca bir denekte glatiramer asetatın bir çabuk salımlı formülasyonunun büyük ölçüde benzer bir dozu

ile karşılaştırıldığında glatiramerin uzatılmış salımını veya uzatılmış etkisini sağlamasıdır.

8. İstem 1'e göre farmasötik bileşim **olup, özelliği**; multipl sklerozun tedavisinde kullanım için olmasıdır.

9. İstem 8'e göre multipl sklerozun tedavisinde kullanım için farmasötik bileşim **olup, özelliği**; glatiramer asetatın en az bir başka aktif madde ile kombinasyon halinde uygulanmasıdır.

TARİFNAME

GLATİRAMER ASETAT İÇEREN DEPO SİSTEMİ

5 Buluşun Alanı

Mevcut buluş, glatiramer asetatın ve glatiramerin farmakolojik olarak kabul edilebilir diğer tuzlarının uzun etkili dozaj formları ile ilgilidir. Özellikle tercih edilenler, glatiramer asetatın uzatılmış salımı için depo sistemleri ve diğer implante edilebilir sistemlerdir.

Buluşun Arka Planı

10 Glatiramer Asetat

Glatiramer asetat olarak da bilinen ve Copaxone® ticari ismi altında pazarlanan kopolimer-1; L-glutamik asit, L-alanin, L-tirozin ve L-lizin içeren polipeptitlerin asetat tuzlarını içerir. Amino asitlerin ortalama molar fraksiyonları sırasıyla 0,141, 0,427, 0,095 ve 0,338'dir ve kopolimer-1'in ortalama molekül ağırlığı 4,700 ila 11,000 dalton arasındadır. Kimyasal olarak, glatiramer asetat L-alanin, L-lizin ve L-tirozin, asetat (tuz) içeren L-glutamik asit polimeri olarak adlandırılır. Yapısal formülü aşağıdaki gibidir: $(\text{Glu}, \text{Ala}, \text{Lys}, \text{Tyr})_x \text{CH}_3\text{COOH}$ $(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4_ \text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2_ \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2_ \text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3)_x \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ [CAS - 147245-92-9], yaklaşık oran $\text{Glu}_{14}\text{Ala}_{43}\text{Tyr}_{10}\text{Lyz}_{34}x(\text{CH}_3\text{COOH})_{20}$. Copaxone®, subkütan enjeksiyon için berrak, renksiz ila hafif sarı, steril, pirojenik olmayan bir çözeltidir. Her mililitre 20 mg glatiramer asetat ve 40 mg mannitol içerir. Çözeltinin pH aralığı yaklaşık 5,5 ila 7,0'dır.

Etki mekanizması

Glatiramer asetat, miyelin bazik proteininde bulunan dört amino asitten oluşan bir random polimerdir (ortalama molekül kütlesi 6,4 kD'dir). Glatiramer asetat için etki mekanizması bilinmemektedir, ancak bu kopolimerin bazı önemli immünolojik özellikleri aydınlığa kavuşmuştur. Kopolimer-1'in uygulanması, T hücrelerini pro-enflamatuar Th1 hücrelerinden enflamatuar yanıtı (FDA Copaxone® etiketi) baskılayan düzenleyici Th2 hücrelerine kaydırır. Miyelin bazik proteinine benzerliği göz önüne alındığında, kopolimer-1 aynı zamanda miyeline karşı bir otoimmün yanıtı başka bir yöne çevirmek için bir tuzak olarak da işlev

görebilir. Bununla birlikte, kan-beyin bariyerinin bütünlüğü, en azından tedavinin erken aşamalarında, kopolimer-1 tarafından önemli ölçüde etkilenmez.

Kopolimer-1, çeşitli türlerde miyelin bazik proteini (MBP) (Sela M vd., Bull Inst Pasteur (1990) 88 303-314), proteolipid protein (PLP) (Teitelbaum D vd., J Neuroimmunol (1996) 64 209-217) ve miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) (Ben-Nun A vd., J Neurol (1996) 243 (Suppl 1) S14-S22) gibi tüm miyelin antijenlerini içeren fare spinal kord homojenatı (MSCH) dahil olmak üzere çeşitli ensefalitojenlerin indüklediği deneysel alerjik ensefalomyeliti (EAE) baskıladığı gösterilen bir otoantijen değildir. EAE multipl skleroz için kabul edilen bir modeldir.

- 10 Kopolimer-1'in deri altından, intraperitoneal, intravenöz veya intramüsküler yoldan enjekte edildiğinde aktif olduğu kanıtlanmıştır (Teitelbaum D vd., Eur J Immunol (1971) 1 242-248; Teitelbaum D ve diğ., Eur J Immunol (1973) 3 273 -279). Faz III klinik çalışmalarında, günlük subkütan kopolimer-1 enjeksiyonlarının, engellilik halinin ilerlemesini yavaşlattığı ve alevlenen-düzelen multipl sklerozda nüks oranını azalttığı bulunmuştur (Johnson KP, 15 Neurology (1995) 1 65-70; www.copaxone.com). Kopolimer-1 terapisi şu anda günlük subkütan uygulama ile sınırlıdır. Yutma veya inhalasyon yoluyla kopolimer-1 ile tedavi, US 6,214,791'de açıklanmıştır, ancak bu uygulama yollarının, insan hastalarda klinik etkinliğe ulaştığı gösterilmemiştir.

Etkinlik

- 20 Nükseden-Düzelen Multipl Skleroz (RR MS) hastalarında relapsların sıklığını azaltmada glatiramer asetatın etkinliğini destekleyen kanıtlar, her ikisi de 20 mg/gün glatiramer asetat dozunu kullanan iki plasebo kontrollü çalışmadan elde edilmiştir. RR MS'nin (www.copaxone.com) plasebo kontrollü çalışmalarında başka bir doz veya doz rejimi araştırılmamıştır. Onaylanmış 20 mg'lık dozun ve 40 mg'lık dozun karşılaştırmalı bir deneyi, 25 bu dozlar arasındaki etkinlik açısından önemli bir farklılık göstermemiştir (9006 çalışması; Cohen JA vd., Neurology (2007) 68 939-944). Glatiramer asetatla çeşitli klinik çalışmalar devam etmektedir. Bunlar, daha yüksek dozda glatiramer asetatla çalışmaları (40 mg - FORTE çalışması); Klinik İzole Sendromlu hastalarda (PreCISe çalışması) yapılan çalışmaları ve ayrıca glatiramer asetatın başka bir aktif ürün ile birlikte veya art arda verildiği 30 sayısız kombinasyon ve indüksiyon protokollerini içerir.

Yan etkiler

Şu anda, hepsi spesifik olarak onaylanmış multipl skleroz tedavileri, aktif maddenin tek başına enjeksiyonunu içerir. Sıklıkla gözlenen enjeksiyon bölgesi problemleri arasında iritasyon, aşırı duyarlılık, inflamasyon, ağrı ve hatta nekroz (interferon 1 β tedavisi durumunda) ve düşük düzeyde hasta uyumu bulunur.

Yan etkiler genellikle enjeksiyon bölgesinde (enjeksiyon bölgesi reaksiyonu) ağrı, ateş ve üşümeyi içerir. Bu yan etkiler doğası gereği genellikle hafiftir. Bazen, enjeksiyondan birkaç dakika sonra kızarma, nefes darlığı, anksiyete ve hızlı kalp atımını içeren bir reaksiyon meydana gelir. Bu yan etkiler otuz dakika içinde yatıştır. Zamanla, lipoatrofi olarak bilinen yağ dokusunun lokal yıkımı nedeniyle enjeksiyon bölgesinde görünür bir çukur gelişebilir. Bu nedenle alternatif bir uygulama yöntemi arzu edilir.

FDA'nın reçeteleme etiketine göre, glatiramer asetat için daha ciddi yan etkiler bildirilmiştir, bunlar vücudun kardiyovasküler sistemi, sindirim sistemi (karaciğer dahil), hemik ve lenfatik sistemi, kas-iskelet sistemi, sinir sistemi, solunum sistemi, özel duyarlar (özellikle gözler), ürogenital sistemindeki ciddi yan etkileri içerir; ayrıca metabolik bozukluklar ve beslenme bozuklukları bildirilmiştir; ancak glatiramer asetat ile bu olumsuz etkiler arasında kesin bir bağlantı belirlenememiştir (FDA Copaxone® etiketi).

Depo Sistemleri

İntravenöz (IV), intramüsküler (IM) veya subkütan (SC) enjeksiyonla parenteral yol, hem küçük hem de büyük molekül ağırlıklı ilaçlar için en yaygın ve etkili iletim şeklidir. Bununla birlikte, iğne çubuklarına bağlı ağrı, rahatsızlık ve zorluk nedeniyle bu ilaç iletim modu hastaların en az tercih ettiği moddur. Bu nedenle, en azından toplam enjeksiyon sayısını azaltabilen herhangi bir ilaç iletim teknolojisi tercih edilir. Uygulamada ilaç dozlama sıklığındaki bu gibi azalmalar, ilaçları yavaş ama öngörülebilir bir tarzda salabilen ve sonuç olarak uyumu arttırabilen enjekte edilebilir depo formülasyonlarının kullanımıyla elde edilebilir. Çoğu ilaç için, doza bağlı olarak, enjeksiyon sıklığını günlük uygulamadan ayda bir veya iki kez veya daha uzun (6 ay) bir aralığa azaltmak mümkün olabilir. Hasta konforunu arttırmaya ek olarak, depo formülasyonları formunda daha az sıklıkta ilaç enjeksiyonu, tepeleri ve vadileri ortadan kaldırarak plazma konsantrasyon-zaman profilini yumuşatır. Plazma profillerinin bu şekilde düzleştirilmesi, çoğu durumda terapötik faydayı arttırmakla

kalmaz, aynı zamanda genellikle büyük molekül ağırlıklı ilaçlar ile ilişkili immünojenisite vb. gibi istenmeyen olayları da azaltır.

- Mikropartiküller, implantlar ve jeller, vücuttaki ilaçların salınmasını uzatmak için kullanılan en yaygın biyobozunur polimerik cihazlardır. Mikropartiküller, enjeksiyondan hemen önce bir sulu ortam içinde süspanse edilir ve süspanسیونlara %40 kadar katı madde yüklenebilir. İmplant/çubuk formülasyonları, kuru haldeki özel iğneler yardımıyla sulu bir ortama gerek kalmadan SC/IM dokusuna iletilir. Çubukların/implantların bu özelliği, daha yüksek kütle formülasyonlarının yanı sıra daha yüksek ilaç içeriğinin verilmesine de olanak tanır. Dahası, çubuklarda/implantlarda, başlangıç püskürme problemleri, mikropartiküllere kıyasla implantlardaki çok daha küçük alan nedeniyle en aza indirilir. Biyobozunur sistemlerin yanı sıra, vücut dışına takılabilen, biyobozunur olmayan implantlar ve infüzyon pompaları da bulunmaktadır. Biyobozunur olmayan implantlar, sadece cihazı SC/IM dokusuna implante etmek için değil, aynı zamanda ilaç salımından sonra çıkarmak için de doktor ziyareti gerektirir.
- Mikropartiküllü preparasyonları içeren enjekte edilebilir bileşimler problemlere özellikle yatkındır. Mikropartikül süspanسیونları, diğer enjekte edilebilir süspanسیون tiplerindeki %0,5-5 katıya kıyasla %40 kadar katı madde içerebilir. Ayrıca, enjekte edilebilir depo ürünlerinde kullanılan mikropartiküller, IM veya SC uygulaması için tavsiye edilen 5 µm'den daha küçük bir parçacık boyutu ile karşılaştırıldığında, yaklaşık 250 µm (ortalama 60-100 µm) büyüklüğe kadar çıkabilir. Daha büyük katı parçacık boyutunun yanı sıra daha yüksek katı madde konsantrasyonları, enjeksiyon için daha büyük bir iğne boyutunu (18-21 gauge civarı) gerektirir. Genel olarak, daha büyük ve rahatsız edici iğnelerin daha seyrek kullanımına rağmen, hastalar daha küçük bir iğne ile günlük ilaç enjeksiyonlarına kıyasla daha az sıklıkla uygulanan dozaj formları tercih etmektedir.
- Poli(laktik asit) (PLA)'nın biyobozunur poliestерleri ve poli (laktit-ko-glikolit) (PLGA) olarak adlandırılan laktit ve glikolit kopolimerleri, biyobozunur dozaj formlarda kullanılan en yaygın polimerlerdir. PLA hidrofobik bir moleküldür ve PLGA, daha hidrofilik glikolit gruplarının varlığı nedeniyle PLA'dan daha hızlı bozunur. Bu biyo-uyumlu polimerler, vücutta normal metabolik bileşikler olan laktik asit ve glikolik asidi oluşturmak için ester bağlarının rastgele, enzimatik olmayan, hidrolitik bölünmesine uğrarlar. Emilebilir dikişler, klipsler ve implantlar bu polimerlerin en erken uygulamalarıdır. Güney Araştırma Enstitüsü, 1970 yılında ilk

sentetik, emilebilir dikişi (Dexon®) geliştirmiştir. PLGA polimerlerinin sürekli salımlı bir dozaj formunda kullanımını tarif eden ilk patent 1973'te (US 3,773,919) çıkmıştır.

WO 2005/070332 A1 belgesi, sinir sistemi bozuklukları için küçük moleküllü ilaçların uzun süreli salınması için uzun süreli iletim formülasyonları ile ilgilidir.

- 5 WO 2005/041933 A1 belgesi, oral uygulama için bir nanoparçacık ve buna elektrostatik olarak eklenmiş herhangi bir peptit, bir polisakkarit veya bir glikoproteini içeren farmasötik bileşimlere ilişkindir.

WO 2005/035088 A2 belgesi, bir aktif maddenin küresel parçacıklarının kontrollü faz ayrımı ile hazırlanmasına yönelik yöntemlerle ilgilidir.

- 10 US 2005/0170005 A1 belgesi, bir aktif maddenin mikrokapsüllenmiş küçük parçacıklarının bileşimleri ile ilgilidir.

US 7,195,778, oral uygulama ve ilaçların kontrollü salımı için bir ilaç iletim cihazına ilişkindir.

US2007/0081976 A1, aljinat sülfat ve hiyalüronan sülfat gibi bir sülfatlanmış polisakkariti ve adı geçen sülfatlanmış polisakkaritin bir sülfat grubunu bağlayabilen en az bir biyoaktif polipeptidi içeren biyokonjugatlar ile ilgilidir.

15

US 2004/0038887 A1 belgesi, multipl sklerozun tedavisi için 14-, 35- ve 50-amino asit kalıntısı (Copaxone® değil) uzunluğuna sahip random üç ve dört-amino asit kopolimeri sağlar.

WO 2007/059342 A2 belgesi, MS tedavisi için random kopolimerlerle (Copaxone® hariç) ilgilidir.

- 20 Günümüzde PLGA polimerleri, birden çok tedarikçiden ticari olarak temin edilebilir; Alkermes (Medisorb polimerleri), Absorbable Polymers International [eski adıyla Birmingham Polymers (Durect'in bir departmanı)], Purac ve Boehringer Ingelheim. PLGA ve PLA'nın yanı sıra, nişasta, nişasta türevleri, dekstran ve PLGA dışı sentetik polimerler gibi doğal selülozik polimerler de bu tür sistemlerde biyobozunur polimerler olarak araştırılmaktadır.

- 25 Şu anda glatiramer asetatın uzun etkili dozaj formları mevcut değildir. Bu, büyük bir karşılanmamış tıbbi ihtiyaçtır, çünkü bu formülasyonlar, özellikle nörolojik semptomları veya fiziksel engelleri olan birçok hasta için son derece faydalı olacaktır.

Buluşun Özeti

Buluş istemlerde tarif edilen düzenlemelere ilişkindir.

Buluş, aynı zamanda aşağıdakilerle ilgilidir:

- Madde 1. Terapötik olarak etkili miktarda glatiramer asetat ve farmasötik olarak kabul edilebilir biyobozunur bir taşıyıcı olarak poli(D,L-laktit-ko-glikolit) (PLGA) içeren uzun etkili bir parenteral farmasötik bileşim olup, bileşim 20 ila 750 mg arasında bir glatiramer asetat dozu ile haftada bir kereden 6 ayda bir kereye kadar bir dozlama programı için uygun bir sürekli salımlı depo formundadır, burada bileşim, terapötik olarak etkili bir miktarda glatiramer asetat, PLGA içeren suyla karışmayan bir polimerik faz ihtiva eden bir iç sulu fazı ve bir dış sulu fazı içerir ve burada bileşim, su içinde yağ içinde su çift emülsiyonlaştırma işlemi ile hazırlanan mikropartiküller formundadır.
- Madde 2. Madde 1'e göre farmasötik bileşim olup, ihtiyaç duyan bir denekte tıbbi olarak kabul edilebilir bir konuma implantasyon için uygun depo formundadır.
- Madde 3. Madde 1 veya 2'ye göre farmasötik bileşim olup, 2 haftada bir ila ayda bir seferlik bir dozlama programı için uygundur.
- Madde 4. Madde 1 veya 2'ye göre farmasötik bileşim olup, burada glatiramer asetat, 0,14 glutamik asit, 0,43 alanin, 0,10 tirozin ve 0,33 lizin mol oranlarında L-alanin, L-glutamik asit, L-lizin ve L-tirozin içerir.
- Madde 5. Subkütan veya intramüsküler implantasyon için uygun madde 1 veya 2'ye göre farmasötik bileşim.
- Madde 6. Madde 1'e göre farmasötik bileşim olup, burada dış su fazı, polivinil alkol (PVA), polisorbit, polietilen oksit-polipropilen oksit blok kopolimerleri ve selüloz esterleri arasından seçilmiş bir yüzey aktif maddeyi içerir.
- Madde 7. Madde 1 ya da 2'ye göre farmasötik bileşim olup, burada bileşim lokal ve/veya sistemik seviyede yan etkilerin sıklığının ve/veya şiddetinin azalmasıyla birlikte glatiramer asetatın ticari olarak temin edilebilen günlük enjekte edilebilir dozaj formlarına eşit ya da üstün terapötik etkinlik sağlar ve

burada bileşim ayrıca bir denekte glatiramer asetatın bir çabuk salımlı formülasyonunun büyük ölçüde benzer bir dozu ile karşılaştırıldığında glatiramerin uzatılmış salımını veya uzatılmış etkisini sağlar.

Madde 8. Multipl sklerozun tedavisinde kullanım için madde 1'e göre farmasötik bileşim.

Madde 9. Madde 8'e göre multipl sklerozun tedavisinde kullanım için farmasötik bileşim olup, burada glatiramer asetat en az bir başka aktif madde ile kombinasyon halinde uygulanır.

Burada glatiramerin farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu, ör. glatiramer asetatı içeren uzun etkili parenteral farmasötik bileşimler sağlanmaktadır. Özellikle, bir depo formunda terapötik olarak etkili bir miktarda glatiramer tuzu içeren, ihtiyaç duyan bir denekte tıbbi olarak kabul edilebilir bir konumda parenteral uygulama için uygun olan uzun etkili bir farmasötik bileşim sağlanmaktadır. Mevcut tarifname, ayrıca multipl sklerozun tedavi edilmesine yönelik, farmasötik olarak kabul edilebilir bir glatiramer tuzunun, tercihen glatiramer asetatın terapötik olarak etkili bir miktarını içeren bir bileşimin parenteral uygulamasını veya implantasyonunu içeren bir yöntem sağlamaktadır.

10 Beklenmedik bir şekilde, mevcut buluşun prensiplerine göre olan uzun etkili farmasötik bileşimlerin, lokal ve/veya sistemik seviyede yan etkilerin sıklığının ve/veya şiddetinin azalmasıyla birlikte glatiramer asetatın ticari olarak temin edilebilen günlük enjekte edilebilir dozaj formlarına eşit ya da üstün terapötik etkinlik sağladığı bulunmuştur.

15 Tarifnemenin bazı düzenlemelerine göre, glatiramer asetat, 0,14 glutamik asit, 0,43 alanin, 0,10 tirozin ve 0,33 lizin molar oranlarında L-alanin, L-glutamik asit, L-lizin ve L-tirozin asetat tuzlarını içerir.

Tarifnemenin diğer düzenlemelerine göre, glatiramer asetat veya diğer farmasötik olarak kabul edilebilir glatiramer tuzu yaklaşık 15 ila yaklaşık 100 amino asit içerir.

20 Açıklamanın belirli uygulamalarına göre, implante edilebilir depo, subkütan veya intramüsküler implantasyon için uygundur.

Tarifnamenin alternatif düzenlemelerine göre, uzun etkili parenteral farmasötik bileşim, glatiramer asetat gibi glatiramer tuzları için farmasötik olarak kabul edilebilir biyobozunur veya biyobozunur olmayan bir taşıyıcı içerir.

5 Açıklamanın bazı düzenlemelerine göre, taşıyıcı PLGA, PLA, PGA, polikaprolakton, polihidroksibütirat, poliortoesterler, polialkananhidritler, jelatin, kolajen, oksitlenmiş selüloz ve polifosfazenden seçilir. Her olasılık buluşun ayrı bir düzenlemesini temsil eder.

Açıklamanın özel düzenlemelerine göre, mevcut buluşun uzun etkili farmasötik bileşimleri, su içinde yağ içinde su emülsiyonlaştırma işlemiyle hazırlanan mikropartiküller formundadır. Mevcut buluşun tercih edilen düzenlemelerinde, mevcut buluşun uzun etkili farmasötik 10 bileşimleri, farmasötik olarak kabul edilebilir bir glatiramer tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarını içeren bir iç sulu faz, biyobozunur ve biyobozunur olmayan bir maddeden seçilen bir taşıyıcı içeren, suyla karışmayan bir polimerik faz ve bir dış sulu fazı içerir. Açıklamanın tercih edilen diğer düzenlemelerinde, suyla karışmayan polimerik faz, PLA ve PLGA'dan seçilen biyobozunur bir polimeri içerir. Her olasılık tarifnamenin ayrı bir düzenlemesini temsil 15 eder. Tarifnamenin ilave düzenlemelerinde dış sulu faz, polivinil alkol (PVA), polisorbitat, polietilen oksit-polipropilen oksit blok kopolimerleri ve selüloz esterleri arasından seçilmiş bir yüzey aktif maddeyi içerir. Her olasılık tarifnamenin ayrı bir düzenlemesini temsil eder.

Mevcut tarifname, multipl sklerozun tedavisi için ihtiyaç duyan bir kişiye glatiramer asetat veya herhangi bir farmasötik olarak kabul edilebilir glatiramer tuzunun uygun olan bir depo 20 formunda implantasyon için kullanımını kapsamaktadır.

Mevcut tarifname ayrıca bir denekte glatiramerin uzatılmış salımını veya uzatılmış etkisini sağlamak için uygun olan glatiramer asetatın implante edilebilir deposunun kullanımını da kapsar.

Mevcut tarifname, multipl sklerozun tedavisinde veya bir denekte uzatılmış salım veya 25 uzatılmış etkinin sağlanmasında kullanıma uygun depo formunda farmasötik olarak kabul edilebilir bir glatiramer tuzunu kapsamaktadır.

Tarifname, aynı zamanda bir glatiramer asetatın en az bir ilave ilaç, tercihen bir immünosupresan, özellikle de fingolimod ile kombinasyonunu kapsar. Tarifnamenin bazı

düzenlemelerine göre, uzun etkili farmasötik bileşim, haftada bir kez ila her 6 ayda bir kez olmak üzere bir dozlama programı için uygundur.

Tarifnamenin özel düzenlemelerine göre bileşim, 2 haftada bir kez ila ayda bir kez olmak üzere bir dozlama için uygundur.

- 5 Tarifnamenin bazı düzenlemelerine göre, uzun etkili bileşimler, enjeksiyon başına 20-750 mg glatiramer asetat arasında bir doz içerir.

Uzun etkili bileşimlerin spesifik örnekleri, biyobozunur veya biyobozunur olmayan mikroküreler, herhangi bir uygun geometrik şekildeki implantlar, implante edilebilir çubuklar, implante edilebilir kapsüller, implante edilebilir halkalar, uzatılmış salım jelleri ve aşınabilir matrisleri içerecektir. Her olasılık tarifnamenin ayrı bir düzenlemesini temsil eder.

Şekillerin Kısa Açıklaması

Şekil 1. 37 °C'de PBS içinde glatiramer asetatın, PLGA mikropartikülat formülasyonu MPG-02 - 07'den salımı. Gösterilen veriler, aynı koşullarda depolanmış standart peptit çözeltisine normalleştirilir.

- 15 **Şekil 2.** 37 °C'de PBS içinde glatiramer asetatın PLG mikropartikülat formülasyonu MPG-05R, 08-11'den ve glatiramerin tokoferil süksinat tuzundan (1:1) salımı. Sunulan veriler, aynı koşullarda depolanmış standart peptit çözeltisine normalleştirilir.

- Şekil 3.** 37 °C'de PBS içinde glatiramer asetatın PLGA mikropartikülat formülasyonları MPG-12 - 15'den salımı. Gösterilen veriler, aynı koşullarda depolanmış standart peptit çözeltisine normalleştirilir.

Şekil 4. 37 °C'de, pH 7,4'te PBS içinde glatiramer asetatın PLBS mikropartikülat formülasyonları MPG-14SU-1 ve MPG-15SU-1'den in vitro salımı.

Şekil 5. 37 °C'de, pH 7,4'te PBS içinde glatiramer asetatın PLBS mikropartikülat formülasyonları MPG-14SU-2 ve MPG-15SU-2'den in vitro salımı.

25 Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Mevcut buluş, günlük enjeksiyonlara eşit veya bunlardan üstün terapötik etkinliğe sahip olan ve böylece hasta uyumunun artmasını sağlayan, glatiramer asetatın uzun etkili parenteral

farmasötik preparasyonlarını sağlar. Aynı terapötik etkinliğin sağlanmasına ek olarak, uzun etkili enjeksiyonlar veya implantlar, sık enjeksiyonlardan kaynaklanan glatiramer yan etkilerini (lokal ve/veya sistemik) azaltır.

Burada, glatiramer asetatın veya glatiramerin farmasötik olarak kabul edilebilir herhangi bir başka bir tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarını içeren uzun etkili parenteral farmasötik bileşimler sağlanmaktadır. Burada kullanıldığı şekliyle "parenteral" terimi, subkütan (SC), intravenöz (IV), intramüsküler (IM), intradermal (ID), intraperitoneal (IP) ve benzerlerinden seçilen yolları belirtir. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder. Burada kullanıldığı şekliyle "terapötik olarak etkili miktar" terimi, multipl skleroz semptomlarının hafifletilmesi amacına ulaşan kopolimer miktarını nitelendirmek üzere kullanılır. Uygun doz, her dozaj formu için 20-750 mg içerir. Bununla birlikte, uygulanan kopolimer miktarının, seçilen uygulama yolu, yaş, ağırlık ve hastanın semptomlarının şiddeti gibi çeşitli parametrelere göre bir hekim tarafından belirleneceği anlaşılmaktadır.

Çeşitli düzenlemelere göre, en az bir kopolimerin terapötik olarak etkili miktarı yaklaşık 1 mg ila yaklaşık 500 mg/gün aralığındadır. Alternatif olarak, en az bir kopolimerin terapötik olarak etkili miktarı yaklaşık 20 mg ila yaklaşık 100 mg/gündür.

Ayrıca, glatiramer asetatın veya glatiramerin farmasötik olarak kabul edilebilir herhangi bir başka bir tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarını ihtiyaç duyan bir denekte tıbbi olarak kabul edilebilir bir konumda parenteral uygulama için uygun olan bir depo formunda içeren uzun etkili bir farmasötik bileşim sağlanmaktadır. Burada kullanıldığı şekliyle "uzun etkili" terimi, glatiramer tuzunun bir deneğin genel sistemik dolaşımında veya bir deneğin lokal etki alanlarında uzun süreli, sürekli veya uzatılmış salınımını sağlayan bir bileşime değinmektedir. Bu terim ayrıca bir denekte glatiramer tuzunun uzun süreli, sürekli veya uzatılmış etki süresini (farmakokinetiği) sağlayan bir bileşimi ifade edebilir. Özellikle, uzun etkili farmasötik bileşimler, haftada bir ila 6 ayda bir arasında değişen bir dozlama rejimi sağlar. Hali hazırda tercih edilen düzenlemelere göre, dozlama rejimi haftada bir kez, ayda iki kez (2 haftada bir kez olmak üzere) ila ayda bir kez arasında değişmektedir. Gerekli olan etki süresine bağlı olarak, bu buluşun her bir depo veya implante edilebilir cihazı tipik olarak birkaç haftadan birkaç aya kadar değişen bir süre boyunca salınacak şekilde tasarlanan yaklaşık 20 ila 750 mg aktif bileşen içerir.

Bazı düzenlemelerde, burada sağlanan depo formülasyonları, bunlarla sınırlı olmamak üzere glatiramerin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun su, yağ veya mum fazında süspansiyonlarını; glatiramerin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun zayıf çözünürlüğe sahip polielektrolit komplekslerini; suyla karışabilen çözücünün

5 glatiramer veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ile kombinasyonuna dayanan "in-situ" jel oluşturunca matrisleri; ve glatiramer veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun katıldığı biyobozunur polimerik mikropartikülleri içerir. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder. Özellikle, burada sağlanan bileşimler, enjekte edilebilir mikropartiküller formundadır, burada glatiramer veya farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu,

10 biyobozunur veya biyobozunur olmayan bir taşıyıcı içine hapsedilir. Burada sağlanan mikropartiküllü bileşimler, su içinde yağ içinde su çifte emülsiyonu içerebilir. Burada, glatiramer veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren bir iç sulu faz, biyobozunur veya biyobozunur olmayan bir polimeri içeren bir yağ fazı veya suyla karışmayan bir fazı ve bir dış sulu fazı içeren bir mikropartikül bileşimi sağlanmaktadır. Dış

15 sulu faz ayrıca bir yüzey aktif maddeyi, tercihen polivinil alkol (PVA), polisorbitat, polietilen oksit-polipropilen oksit blok kopolimerleri ve selüloz esteri içerebilir. "Yağ fazı" ve "suyla karışmayan faz" terimleri, burada birbirinin yerine kullanılabilir.

Burada, multipl sklerozun, glatiramer asetatın veya glatiramerin farmasötik olarak kabul edilebilir herhangi bir başka bir tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarını içeren uzun etkili

20 farmasötik bileşimin ihtiyaç halindeki bir deneğe parenteral olarak uygulanması ile tedavi edilmesi için bir yöntem açıklanır. Ayrıca, multipl sklerozun, glatiramer asetatın veya glatiramerin farmasötik olarak kabul edilebilir herhangi bir başka bir tuzunun ihtiyaç duyan bir kişiye bir depo formunda uygulanmasıyla tedavi edilmesi için bir yöntem açıklanmaktadır. Burada kullanıldığı şekliyle "tedavi etme" terimi, multipl sklerozun başlangıcından sonra

25 semptomların bastırılması veya hafifletilmesi anlamına gelir. Multipl sklerozun başlangıcından sonra görülen yaygın semptomlar arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere görmede azalma veya görme kaybı, yürümede zorluk ve dengesiz yürüme, geveleyerek konuşma, sık idrara çıkma ve idrar kaçırma yer alır. Ayrıca, multipl skleroz duygu durum değişikliklerine ve depresyona, kas spazmlarına ve şiddetli felce neden olabilir. İlacın verildiği

30 "denek", tercihen bir insan ile sınırlı olmamak üzere bir memelidir. Burada kullanıldığı şekliyle "multipl skleroz" terimi, yukarıda tarif edilen semptomlardan bir veya daha fazlasının eşlik ettiği merkezi sinir sisteminin oto-immün bir hastalığı anlamına gelir.

Burada kullanıldığı şekliyle "glatiramer asetat" terimi, Copaxone® ticari ismi altında satılan, daha önce Kopolimer 1 olarak bilinen ve aşağıda belirtilen dört doğal olarak oluşan amino asidi içeren sentetik polipeptitlerin asetat tuzlarından oluşan bir bileşiğe karşılık gelir: sırasıyla 0,141, 0,427, 0,095 ve 0,338'lik bir ortalama molar fraksiyon ile L-glutamik asit, L-alanin, L-tirozin ve L-lizin. Copaxone®'daki glatiramer asetatın ortalama moleküler ağırlığı 4,700-11,000 dalton'dur (FDA Copaxone® etiketi) ve amino asit sayısı yaklaşık 15 ila yaklaşık 100 amino asit arasındadır. Terim ayrıca bileşiğin kimyasal türevleri ve analoglarına değinmektedir. Tipik olarak bileşik, US Patent No. 5,981,589; 6,054,430; 6,342,476; 6,362,161; 6,620,847 ve 6,939,539 belgelerinin herhangi birinde belirtildiği gibi hazırlanır ve karakterize edilir.

Bazı düzenlemelerde bileşim, bunlarla sınırlı olmamak üzere sülfat, piro-sülfat, bisülfat, sülfid, bisülfid, fosfat, monohidrojenfosfat, dihidrojenfosfat, metafosfat, pirofosfat, hidroklorür, hidrobromür, hidroiyodür, asetat, nitrat, propiyonat, dekanat, kaprilat, akrilat, format, izobütirat, kaprat, heptanoat, propiyolat, oksalat, malonat, süksinat, tokoferil süksinat, suberat, sebakat, fumarat, maleat, bütün-1,4-dioat, heksin-1,6 -dioat, benzoat, klorobenzoat, metilbenzoat, dinitrobenzoat, hidroksibenzoat, metoksibenzoat, ftalat, tereftalat, sülfonat, ksilensülfonat, fenilasetat, fenilpropiyonat, fenilbütirat, sitrat, laktat, p-hidroksibutirat, glikollat, tartarat, metansülfonat, propansülfonat, naftalen-2-sülfonat , p-tolüensülfonat, mandelat ve benzeri tuzlar dahil olmak üzere, herhangi bir farmasötik olarak kabul edilebilir glatiramer tuzunu içerebilir. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder.

Kopolimerler, teknikte uzman bir kişi için mevcut herhangi bir prosedürle yapılabilir. Örneğin kopolimerler, çözelti halindeki istenen amino asit molar oranı kullanılarak kondenzasyon koşulları altında veya katı faz sentetik prosedürleriyle yapılabilir. Kondenzasyon koşulları arasında bir peptid bağı oluşturmak için bir amino asidin karboksil grubunun başka bir amino asidin amino grubu ile kondenzasyonu için uygun sıcaklık, pH ve çözücü koşulları yer alır. Kondenzasyon ajanları, örneğin disikloheksilkarbodiimid, peptid bağının oluşumunu kolaylaştırmak için kullanılabilir.

Yan zincir kısımları ve bazı amino veya karboksil grupları gibi fonksiyonel grupları istenmeyen yan reaksiyonlara karşı korumak için bloklayıcı gruplar kullanılabilir. U.S. Patent No. 3,849,550 belgesinde açıklanan proses, buluşun kopolimerlerini hazırlamak için kullanılabilir. Örneğin tirozin, alanin, γ -benzil glutamat ve N, ϵ -trifloroasetil-lizinin N-karboksianhidritleri, ortam

sıcaklığında, bir başlatıcı olarak dietilamin ile susuz dioksan içinde polimerize edilir. Glutamik asidin γ -karboksil grubu, glasiyal asetik asit içinde hidrojen bromür ile debloke edilebilir. Trifloroasetil grupları, bir molar piperidin tarafından lizinden çıkarılır. Teknikte uzman bir kişi, istenen amino asitleri yani kopolimer 1'deki dört amino asitten üçünü içeren peptitleri ve polipeptitleri yapmak için, prosesin glutamik asit, alanin, tirozin veya lizinden herhangi biriyle ilgili reaksiyonları seçici olarak elimine ederek uyarlanabileceğini anlayacaktır. U.S. Patent No. 6,620,847; 6,362,161; 6,342,476; 6,054,430; 6,048,898 ve 5,981,589 glatiramer asetatın (Cop-1) hazırlanması için geliştirilmiş yöntemleri açıklar. Burada "ortam sıcaklığı" ve "oda sıcaklığı" terimleri tipik olarak yaklaşık 20 °C ile yaklaşık 26 °C arasında değişen bir sıcaklık anlamına gelir.

Kopolimerlerin molekül ağırlığı, polipeptit sentezi sırasında veya polimerler yapıldıktan sonra ayarlanabilir. Polipeptit sentezi sırasında molekül ağırlığını ayarlamak için, sentetik koşullar veya amino asit miktarları, polipeptit yaklaşık istenen uzunluğa ulaştığında sentezin durması için ayarlanır. Sentezden sonra, istenen molekül ağırlığına sahip polipeptitler, polipeptitlerin bir molekül ağırlık boyutlandırma kolonu veya jeli üzerinden kromatografisi ve istenen molekül ağırlığı aralığının toplanması gibi herhangi bir mevcut boyut seçim prosedürüyle elde edilebilir. Mevcut polipeptitler, ayrıca, örneğin asit veya enzimatik hidroliz ile yüksek molekül ağırlıklı türleri uzaklaştırmak için kısmen hidrolize edilebilir ve daha sonra asitleri veya enzimleri uzaklaştırmak için saflaştırılabilir.

Bir düzenlemede, istenen molekül ağırlığına sahip kopolimerler, istenen molekül ağırlığı profiline sahip olan bir trifloroasetil-polipeptidi oluşturmak için korunmuş bir polipeptidin, hidrobromik asit ile reaksiyona sokulmasını içeren bir işlem ile hazırlanabilir. Reaksiyon, bir veya daha fazla test reaksiyonu ile önceden belirlenen bir sürede ve bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Test reaksiyonu sırasında, zaman ve sıcaklık değişir ve belirli bir test polipeptit partisinin molekül ağırlığı aralığı belirlenir. Bu partideki polipeptitler için optimal molekül ağırlığı aralığını sağlayan test koşulları, parti için kullanılır. Böylece, istenen molekül ağırlığı profiline sahip bir trifloroasetil-polipeptit, korunmuş polipeptidin test reaksiyonu tarafından önceden belirlenen bir süre boyunca ve bir sıcaklıkta hidrobromik asit ile reaksiyona sokulmasını içeren bir proses ile üretilebilir. Arzu edilen molekül ağırlığı profiline sahip trifloroasetil-polipeptit daha sonra arzu edilen molekül ağırlığına sahip olan korumasız bir polipeptit oluşturmak için sulu bir piperidin çözeltisiyle işleminden geçirilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, belirli bir partiden korunmuş polipeptidin bir test örneği, yaklaşık 20-28 °C'lik bir sıcaklıkta yaklaşık 10-50 saat boyunca hidrobromik asit ile reaksiyona sokulur. Bu parti için en iyi koşullar, birkaç test reaksiyonu gerçekleştirilerek belirlenir. Örneğin, bir düzenlemede, korunan polipeptit yaklaşık 26 °C'lik bir sıcaklıkta yaklaşık 17 saat

5 boyunca hidrobromik asit ile reaksiyona sokulur.

Bazı düzenlemelerde, dozaj formlar, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte PLGA bazlı enjekte edilebilir depo sistemleri gibi biyobozunur enjekte edilebilir depo sistemleri; PLGA bazlı olmayan enjekte edilebilir depo sistemleri ve enjekte edilebilir biyobozunur jelleri veya dispersiyonları içerir. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder.

- 10 Burada kullanıldığı şekliyle "biyobozunur" terimi, en azından kısmen, çevre doku sıvılarında bulunan maddeler ile temas etmek için veya hücresel etki nedeniyle zamanla yüzeylerinden aşınan veya bozulan bir bileşeni ifade eder. Özellikle, biyobozunur bileşen, bunlarla sınırlı olmamak üzere polilaktitler, örneğin poli (D,L-laktit), yani PLA gibi laktik asit bazlı polimerler; poliglikolitler (PGA), örneğin Durect'den Lactel® gibi glikolik asit bazlı polimerler; poli (D,L-
- 15 laktit-ko-glikolit) yani PLGA, (Boehringer'den Resomer® RG-504, Resomer® RG-502, Resomer® RG-504H, Resomer® RG- 502H, Resomer® RG-504S, Resomer® RG-502S, Durect'den Lactel®); Poli (ε-kaprolakton) yani PCL (Durect'den Lactel®) gibi polikaprolaktonlar; polianhidritler; poli(sebasik asit) SA; poli(risenolik asit) RA; poli(fumarik asit), FA; poli(yağ asidi dimeri), FAD; poli(tereftalik asit), TA; poli(izoftalik asit), IPA; poli(p-
- 20 {karboksifenoksi}metan), CPM; poli(p-{karboksifenoksi}propan), CPP; poli(p-{karboksifenoksi}heksan)lar CPH; poliaminler, poliüretanlar, poliesteramidler, poliortoesterler {CHDM: cis/trans-sikloheksil dimetanol, HD:1,6-heksandiol. DETOU: (3,9-dietiliden-2,4,8,10-tetraoksaspiro undekan)}; polidioksanonlar; polihidroksibutiratlar; polialkilen oksalatlar; poliamidler; poliesteramidler; poliüretanlar; poliasetaller; poliketaller;
- 25 polikarbonatlar; poliortokarbonatlar; polisiloksanlar; polifosfazenler; süksinatlar; hiyalüronik asit; poli(malik asit); poli(amino asitler); polihidroksivaleratlar; polialkilen süksinatlar; polivinilpirolidon; polistiren; sentetik selüloz esterleri; poliakrilik asitler; polibütirik asit; triblok kopolimerleri (PLGA-PEG-PLGA), triblok kopolimerleri (PEG-PLGA-PEG), poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm), poli(etilen oksit)- poli(propilen oksit)- poli(etilen oksit) tri-
- 30 blok kopolimerleri (PEO-PPO-PEO), poli valerik asit; polietilen glikol; polihidroksialkilselüloz; kitin; çitosan; poliortoesterler ve kopolimerler, terpolimerler; kolesterol, lesitin gibi lipitler;

poli(glutamik asit-ko-etil glutamat) ve benzerleri veya bunların karışımları gibi bir polimerdir. Bazı düzenlemelerde, mevcut tarifnamenin bileşimleri PLGA, PLA, PGA, polikaprolakton, polihidroksibütirat, poliortoesterler, polialkananhidritler, jelatin, kolajen, oksitlenmiş selüloz ve polifosfazen ve benzerleri arasından seçilen ancak bunlarla sınırlı olmayan bir biyobozunur polimeri içerir. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder.

Buluşa göre biyobozunur polimer, poli(D,L-laktit-ko-glikolit), yani PLGA'dır. Tercihen, biyobozunur polimer, ağırlıkça bileşimin yaklaşık %10 ila yaklaşık %98'i arasında bir miktarda bulunur. Laktik asit bazlı polimer, 100:0 ila yaklaşık 0:100, tercihen 100:0 ila yaklaşık 10:90 aralığında bir laktik asit/glikolik asit oranına sahiptir ve yaklaşık 1,000 ila 200,000 dalton arasında bir ortalama molekül ağırlığına sahiptir. Bununla birlikte, biyobozunur polimer miktarının, kullanım süresi ve benzeri gibi parametreler tarafından belirlendiği anlaşılmaktadır.

Burada sağlanan bileşimler, ayrıca bunlarla sınırlı olmamakla birlikte yardımcı yüzey aktif maddeler, çözücüler/yardımcı çözücüler, suyla karışmayan çözücüler, su, suyla karışabilen çözücüler, yağlı bileşenler, hidrofilik çözücüler, emülsiyonlaştırıcılar, koruyucular, antioksidanlar, köpük önleyici ajanlar, stabilizanlar, tamponlama ajanları, pH ayarlama ajanları, ozmotik ajanlar, kanal oluşturucu ajanlar, ozmotik ayarlama ajanları veya teknikte bilinen herhangi bir başka ekşiyan arasından seçilen bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir ekşiyan içerebilir. Uygun yardımcı yüzey aktif maddeler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere polietilen glikoller, "poloksamer" olarak bilinen polioksietilen-polioksipropilen blok kopolimerleri, dekaglisiril monolaurat ve dekaglisiril monomiristat gibi poligliserin yağ asidi esterleri, sorbitan monostearat gibi sorbitan yağ asidi esterleri, polioksietilen sorbitan monooleat (Tween) gibi polioksietilen sorbitan yağ asidi esterleri, polioksietilen monostearat gibi polietilen glikol yağ asidi esterleri, polioksietilen lauril eter gibi polioksietilen alkil eterler, polioksietilen hint yağı ve polioksietilen katılaştırılmış hint yağı gibi katılaştırılmış hint yağı ve bunların benzerleri veya karışımları bulunur. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder. Uygun çözücüler/yardımcı çözücüler arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte alkoller, triasetin, dimetil izosorbit, glikofürol, propilen karbonat, su, dimetil asetamid ve bunların benzeri veya karışımları bulunur. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder. Uygun köpük önleyici ajanlar arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte silikon emülsiyonları veya sorbitan seskuioleat bulunur. Mevcut buluşun

bileşimlerdeki bileşenlerin bozulmasını önlemek veya azaltmak için uygun stabilizanlar arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere glizin, α -tokoferol veya askorbat, BHA, BHT ve benzeri gibi antioksidanlar veya bunların karışımları bulunur. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder. Uygun tonisite modifiye edici maddeler arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte mannitol, sodyum klorür ve glikoz bulunur. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder. Uygun tamponlama ajanları arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere asetat, fosfat ve uygun katyonlara sahip sitratlar bulunur. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder.

Burada sağlanan bileşimler, teknikte bilinen herhangi bir şekilde hazırlanabilir. Şu anda tercih edilen, glatiramer veya bunun bir kopolimerinin bir koloidal iletim sistemine, ör. biyobozunur mikropartiküllere dahil edilmesidir, böylelikle partikülün polimerik duvarları boyunca difüzyon ile ve vücuttaki biyolojik sıvılar veya su ortamındaki polimer bozunması ile salımın gecikmesine izin verilir. Burada sağlanan bileşimler, "çift emülsiyonlaştırma" olarak bilinen bir proses ile enjekte edilebilir mikropartiküller formunda hazırlanabilir. Kısaca, suda çözünebilir kopolimerin konsantre çözeltisi, suyla karışmayan uçucu organik çözücü (ör. metilen klorür, kloroform ve benzerleri) içinde biyobozunur veya biyobozunur olmayan bir polimer çözeltisinde dağıtılır. Bu şekilde elde edilen "su içinde yağ" (w/o) emülsiyonu, daha sonra "su içinde yağ içinde su (w/o/w) çift emülsiyon" damlacıkları oluşturmak için yüzey aktif madde (örneğin polivinil alkol - PVA, polisorbitatlar, polietilen oksit-polipropilen oksit blok kopolimerleri, selüloz esterleri ve benzerleri) içeren sürekli bir dış su fazında dağıtılmaktadır. Organik çözücünün buharlaştırılmasından sonra, mikropartiküller katılaşır ve süzme veya santrifüjleme ile toplanır. Toplanan mikropartiküller (MP'ler), yüzey aktif maddenin ve bağlanmayan peptidin çoğunu elimine etmek için saflaştırılmış su ile yıkanır ve tekrar santrifüj edilir. Yıkanmış MP'ler toplanır ve katkı maddeleri olmadan veya sonraki sulandırılmaları kolaylaştırmak için kriyoprotektan (mannitol) ilavesiyle liyofilize edilir.

"Su içinde yağ içinde su (w/o/w) çift emülsiyon"un partikül büyüklüğü, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte bu adımda uygulanan kuvvetin miktarı, karıştırma hızı, yüzey aktif madde türü ve konsantrasyonu, vb. dahil olmak üzere çeşitli parametrelerle belirlenebilir. Uygun partikül boyutu yaklaşık 1 ila 100 μ m arasındadır. Burada sağlanan depo sistemleri, teknikte uzman bir kişi tarafından bilinen herhangi bir formu kapsamaktadır. Uygun formlar arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte biyobozunur veya biyobozunur olmayan mikroküreler,

implante edilebilir çubuklar, implante edilebilir kapsüller ve implante edilebilir halkalar bulunur. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder.

Ayrıca, uzun süreli salınan jel deposu ve aşınabilir matrisler de tasarlanır. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder. Uygun implante edilebilir sistemler, örneğinUS 2008/0063687

5 belgesinde açıklanmaktadır.

İmplante edilebilir çubuklar, örneğin <http://www.randcastle.com/prodinfo.html>'de tarif edilenler gibi uygun mikro-ekstrüderler kullanılarak teknikte bilindiği gibi hazırlanabilir .

Mevcut buluşun prensiplerine göre, mevcut buluşun uzun etkili farmasötik bileşimleri, lokal ve/veya sistemik seviyede yan etkilerin sıklığının ve/veya yan etkilerin şiddetinin azalmasıyla

10 birlikte glatiramer asetatın ticari olarak temin edilebilen günlük enjekte edilebilir dozaj formlarına eşit ya da üstün terapötik etkinlik sağlar. Bazı düzenlemelerde, mevcut buluşun bileşimleri bir denekte glatiramer asetatın bir çabuk salımlı formülasyonunun büyük ölçüde benzer bir dozu ile karşılaştırıldığında glatiramerin uzatılmış salımını veya uzatılmış etkisini sağlar. Burada, en az bir başka aktif madde ile bir glatiramer asetat veya herhangi bir başka

15 farmasötik olarak kabul edilebilir glatiramer tuzunun bir kombinasyon terapisi yer alır. Mevcut buluşun kapsamı dahilindeki aktif maddeler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere interferonlar, örneğin pegillenmiş veya pegillenmemiş α -interferonlar veya β -interferonlar, ör. interferon β -1a veya interferon β -1b veya τ -interferonlar; isteğe bağlı olarak antiproliferatif/antineoplastik aktiviteye sahip immünosüpresanlar, ör. mitoksantron,

20 metotreksat, azatioprin, siklofosfamid veya steroidler, örneğin metilprednizolon, prednizon veya deksametazon veya steroid salgılayan ajanlar, ör. ACTH; adenzin deaminaz inhibitörleri, ör. kladribin; çeşitli T-hücresi yüzey markörleri için IV immünoglobulin G (ör.Neurology, 1998, Mayıs 50(5): 1273-81) monoklonal antikorları, ör. natalizumab (ANTEGREN®) veya alemtuzumab; TH2'yi teşvik eden sitokinler, ör. IL-4, IL-10 veya TH1'i

25 teşvik eden sitokinlerin ifadesini inhibe eden bileşikler, ör. fosfodiesteraz inhibitörleri, ör. pentoksifilin; baklofen, diazepam, pirasetam, dantrolen, lamotrijin, rifluzol, tizanidin, klonidin, beta blokerleri, siproheptadin, orfenadrin veya kanabinoidleri içeren antispastisite ajanları; AMPA glutamat reseptör antagonistleri, ör. 2,3-dihidroksi-6-nitro-7-sülfamoilbenzo(f) kinoksalin, [1,2,3,4-tetrahidro-7-morfolin-il-2,3-diokso-6-

30 (triflorometil)kuinoksalin-i-il]metilfosfonat, 1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metilen-dioksi-5H-2,3-benzodiazepin veya (-)-1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metilen-dioksi-4,5-dihidro-3-

metilkarbamoyl-2,3-benzodiazepin; VCAM-1 ifadesi inhibitörleri veya ligandının antagonistleri, ör. α 4p1 integrin VLA-4 ve/veya α -4-p-7 integrinlerin antagonistleri, ör. natalizumab (ANTEGREN®); anti-makrofaj göç inhibitör faktörü (Anti-MIF); xii) Katepsin S inhibitörleri; xiii) mTor inhibitörleri bulunur. Her olasılık ayrı bir düzenlemeyi temsil eder.

- 5 Halen tercih edilen bir başka aktif madde, immünoşüpresanlar sınıfına ait FTY720 (2-amino-2-[2-(4-oktilfenil)etil] propan-1,3-diol; fingolimod)'dür.

Aşağıdaki örnekler, buluşun belirli uygulamalarını daha iyi açıklamak amacıyla sunulmuştur.

Örnekler

Örnek 1: Genel hazırlama yöntemleri

10 PLGA bazlı enjekte edilebilir depo partikülleri

- Mikropartiküller çözücü ekstraksiyonu/buharlaştırma yöntemi (tekli emülsiyon) ile hazırlanmıştır. 250 mg PLGA ve 200 mg glatiramer asetat içeren bir 50:50'lik diklorometan/etanol çözeltisi, %2 PVA içeren sulu bir çözeltiye (200 ml) yavaş yavaş dökülmüş ve 25 °C'de mekanik bir karıştırıcı (300 rpm) kullanılarak emülsiyon haline getirilmiştir. Organik çözücü 2 saat karıştırılarak (100 rpm) buharlaştırılmıştır. Bu şekilde oluşturulan mikropartiküller santrifüjleme ile toplanmış ve aşırı emülsiyonlaştırıcıyı uzaklaştırmak için damıtılmış su ile yıkanmıştır. Son süspansiyon daha sonra ince bir toz elde etmek için dondurularak kurutulmuştur.

Polikaprolakton bazlı enjekte edilebilir depo partikülleri

- 20 Mikropartiküller çözücü ekstraksiyonu/buharlaştırma yöntemi (tekli emülsiyon) ile hazırlanmıştır. 500 mg polikaprolakton ve 200 mg glatiramer asetat içeren bir 70:30'luk diklorometan/aseton çözeltisi, %2 PVA, %1 Tween 80 içeren sulu bir çözeltiye (200 ml) yavaş yavaş dökülmüş ve 25 °C'de mekanik bir karıştırıcı (500 rpm) kullanılarak emülsiyon haline getirilmiştir. Organik çözücü 4 saat karıştırılarak (300 rpm) buharlaştırılmıştır. Bu şekilde oluşturulan mikropartiküller santrifüjleme ile toplanmış ve aşırı emülsiyonlaştırıcıyı uzaklaştırmak için damıtılmış su ile yıkanmıştır. Son süspansiyon daha sonra ince bir toz elde etmek için dondurularak kurutulmuştur.

PLGA bazlı implant çubuklar

20 mm uzunluğunda ve 2 mm çapında PLGA bazlı biyobozunur çubuk şekilli implantlar çözücü ekstraksiyonu/buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. 250 mg PLGA ve 200 mg glatiramer asetat ihtiva eden 50:50'lik bir diklorometan/etanol çözeltisi yavaşça özel çubuk şekilli kalıba dökülmüştür. Organik çözücü, 12 saat boyunca oda sıcaklığında vakum etüvünde buharlaştırılmıştır. Alternatif olarak, çubuk şeklindeki implant, 85-90 °C sıcaklıkta, 0,8 veya 1,0 mm'lik kalıp çapına sahip vidalı tip bir ekstrüder (Microtruder Rancastle RCP-0250 veya benzeri) kullanılarak, 250 mg PLGA ve 200 mg glatiramer karışımının ekstrüzyonu ile hazırlanmıştır.

Örnek 2: Analitik yöntem - glatiramer asetatın analizi

10 Ekipman

Spektrofotometre

Analitik terazi, 0,01 mg'a kadar hassas tartım yapabilir

Malzemeler ve Reaktifler

Referans standart olarak %83'lük glatiramer asetat

15 MeOH içinde %5'lik 2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit (TNBS, pikrilsülfonik asit, 170,5 mM)

0,1 M borat tamponu pH 9,3 (sodyum tetraborat dekahidrat MW 381,37)
saflaştırılmış su

0,5, 1,0, 2,0 ve 7,0 mL hacimli pipetler

çeşitli cam eşyalar.

20 Preparasyonlar

400 ug/mL glatiramer stok çözeltisinin hazırlanması

4,8 mg glatiramer asetat (referans standart için baz olarak %83), tartılarak 10 ml'lik bir volümetrik şişeye konmuştur. Ultrasonik banyoda glatiramer asetatın çözünmesini sağlamak için yaklaşık 7 ml 0,1 M borat tamponu eklenmiştir. Çözelti, 400 ug/ml glatiramer stok çözeltisi (baz olarak) elde etmek için 0,1 M borat tamponu ile daha fazla seyreltilmiştir.

%0,25'Lik TNBS çalışma çözeltisinin hazırlanması

Kullanımdan önce, %5'lik TNBS stok çözeltisi, %0,25'lik TNBS çalışma çözeltisi elde etmek için suyla (20 kez; örneğin 50 µl ve 950 µl su) seyreltilmiştir.

Kalibrasyon eğrisi standartlarının hazırlanması

- 5 Sekiz glatiramer kalibrasyon standart çözeltisi (cSTD, her biri 4 ml), Tablo 1'e göre hazırlanmıştır.

Tablo 1. Glatiramer asetatın standart çözeltileri

cSTD #	Glatiramerin (baz olarak) konsantrasyonu µg/ml	Glatiramer stok çözeltisinin hacmi (ml)	Glatiramer Std 3'ün hacmi (ml)	0,1 M Borat tamponu hacmi (ml)
Std 0	0		-	4
Std 1	2		0,4	3,6
Std 2	10		2	2
Std 3	20	0,2		3,8
Std 4	50	0,5		3,5
Std 5	100	1		3
Std 6	200	2		2
Std 7	400	4		-

Optik yoğunluk ölçümü

- 10 Her bir glatiramer kalibrasyon standardı çözeltisinin 1,0 ml'si, numuneler (iki kez) ve kör reaktif (0,1 M borat tamponu), %0,25'lik 50 µl TNBS çalışma çözeltisinin eklendiği 1,5 ml polipropilen santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Çözelti iyice karıştırılmış ve 30 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur. Elde edilen çözeltilerin her birinin optik yoğunlukları 420 nm ve 700 nm'de okunmuş ve kolloidal sistemlerde ışık dağılımına bağlı hatadan kaçınmak için bu
- 15 yoğunlukların farkı hesaplanmıştır. Seçilen konsantrasyon aralığı için bir kalibrasyon eğrisi hesaplanmıştır.

Kabul şartları

Yinelenen numune preparatları için sonuçlar arasındaki fark, aşağıdaki denklem ile hesaplanan NMT %5'dir:

$$D = \frac{(R_{spl1} - R_{spl2}) \times 2}{R_{spl1} + R_{spl2}} \times 100,$$

5

Burada, R_{spl1}, örnek 1 için elde edilen sonuçtur ve R_{spl2}, örnek 2 için elde edilen sonuçtur.

Örnek 3: Glatiramer asetat yüklü PLGA mikropartiküllerinin hazırlanması

(Sürekli) Dış su fazı: Ayrıca bir yüzey aktif madde olarak %0,5 kısmen hidrolize (%87-89) polivinil alkol (PVA), MPG-10 için %0,2 polisorbit-80 (Tween-80) ve kör MP'nin hazırlanması için %2 PVA içeren, saflaştırılmış suda %0,75'lik 30 ml NaCl çözeltisi.

10

İç su fazı (peptit çözeltisi için): 25-30 mg glatiramer asetat başına 150-200 µl saf su. Glatiramer asetat, bir ultrason banyosu kullanılarak suda çözündürülmüştür.

Organik polimerik çözelti (yağ fazı): 2-5 mL metilen klorür içinde 165-300 mg PLGA. İsteğe bağlı olarak, organik fazda ayrıca bir karşı-iyon çözündürülmüş veya dağıtılmıştır.

15 Hazırlık işlemleri

Yağ içinde su (w/o) emülsiyonunun hazırlanması: Çözölmüş glatiramer asetat içeren iç su fazı, CH₂Cl₂ içinde PLGA çözeltisi içeren yağ fazı ile bir test tüpü içinde, doğrudan karıştırılmıştır. Karışım iyice çalkalanmış ve ultrasonik indenter (titanyum uç, maksimum güç 120 watt, çalışma gücü %10-15, 5 saniyelik 3-5 döngü) ile muamele edilmiştir. Metilen klorürün kaynamasını önlemek için buz veya buzlu su kullanılarak isteğe bağlı olarak soğutma uygulanmıştır.

20

Çift emülsiyonun (w/o/w) hazırlanması: Polimerik PLGA organik çözeltisinde glatiramer asetat çözeltisinin bu şekilde elde edilen w/o emülsiyonu, ayrıca 30-120 saniye boyunca çeşitli hızlarda daha yüksek kesme mikseri (küçük mikser, VDI-12, shaft çapı 10 mm ve daha büyük mikser, OMNI-1100, shaft çapı 18 mm) ile muamele edilmiştir.

25

Çözücünün giderilmesi: bu şekilde oluşturulan çift emülsiyon ile açık bir beher, manyetik plakalı karıştırıcıya yerleştirilmiş ve tüm metilen klorür buharlaşana ve mikropartiküller katılaşıya kadar bir çeker ocak içinde oda sıcaklığında 3-4 saat karıştırılmıştır.

5 Mikropartiküllerin santrifüjlenmesi: Katılaştıran mikropartiküllerin süspansiyonu, 10 dakika boyunca 2000 - 5000 g'de santrifüjlenmiş, üst faz ayrı bir kaba aktarılmış ve peptidin katılmasını ve bağlanmasını hesaplamak üzere glatiramer asetat muhtevası için analiz edilmiştir.

10 Mikropartiküllerin yıkanması: Yukarıda tarif edilen prosedürden gelen çökeltilmiş mikropartiküller, vorteks ve ultrasonik banyo kullanılarak 10 ml saflaştırılmış su içinde süspansiyon edilmiş ve 2-3 dakika çalkalanmış ya da sonike edilmiştir. Mikropartiküllerin süspansiyonu 10 dakika boyunca 2000 - 5000 g'da tekrar santrifüj edilmiş, üst faz ayrı bir kaba aktarılmış ve glatiramer asetat içeriği için analiz edilmiştir.

15 Liyofilizasyon: Mikropartiküllerin yıkanmış çökeltisi, 3-5 ml saflaştırılmış su veya %5'lik mannitol içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiş, 10 ml'lik önceden tartılmış cam viallere aktarılmış, -37-43 °C'de liyofilizatör plakası kullanılarak dondurulmuş ve liyofilize edilmiştir (ana kurutma için -20 °C'de 0,05 bar vakumda 16-48 saat ve son kurutma için + 20 °C'de 0,025 bar vakumda 12-16 saat). Liyofilizasyondan sonra vialler tartılmış, bromobütil kauçuk tıpalarla kapatılmış ve kullanılıncaya kadar buzdolabında saklanmıştır.

20 Parçacık boyutunun kestirilmesi: mikropartiküllerin partikül büyüklüğü, 40x ve 10x objektiflere ve 1-1000 µm aralığında ölçekli numune tablasına sahip ışık alanı ve faz kontrast mikroskobu (Leutz Orthoplan™, Almanya) kullanılarak değerlendirilmiştir.

25 Tüm mikropartikül formülasyonları, dış ozmotik basıncı arttırmak ve suda çözünebilen yüklü ilacın katılımını iyileştirmek için %0,75 sodyum klorür içeren su fazı kullanılarak hazırlanmıştır. Kör (boş) mikropartiküller (ilk deney) bir yüzey aktif madde olarak %2 PVA ile elde edilirken, tüm peptit yüklü formülasyonların hazırlanması için %0,5 PVA kullanılmıştır.

Preparasyon işleminin bileşimleri ve parametreleri Tablo 2-5'te sunulmaktadır.

Tablo 2. Glatiramer asetatın (GA) sürekli salımı için PLGA mikropartikülleri (formülasyon 1-4)

	MP Kör	MPG-01	MPG-02	MPG-03	MPG-04
İç su fazı					
GA, mg		17	60,25	30	18,7
GA kuru baz, mg	0	14,11	50,0	24,9	15,5
GA için su, µl		100	400	200	100+50 µl %2 PVA
Yağ fazında polimer					
PLGA RG 502H, mg	215	270			165
PLGA RG 502, mg			500	220	
Yağ fazı					
Tokoferil süksinat		100	120	50	65
Metilen klorür	2 ml (2,3 g)	4,5 g	9g	3,2 g	3g
Dış su fazı					
PVA (%2 veya %0,5)	23 ml %2	65 ml %0,5	60 ml %0,5	30 ml %0,5	30 ml %0,5
NaCl	0	0,5 g	0,5 g	0,25 g	0,25 g
Hazırlık süreci açıklaması (işlemci, hız ayarı, buharlaşma süresi)	IKA VDI-12 #5 30 sn, gece boyunca buharlaşma, RT, manyetik karıştırıcı	IKA VDI-12 #5 2 dk, gece boyunca buharlaşma, RT, manyetik karıştırıcı	IKA VDI-12 #5 2 dk, gece boyunca buharlaşma, RT, manyetik karıştırıcı	IKA VDI-12 #5 2 dk, buharlaşma 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı	IKA VDI-12 #5 2 dk, buharlaşma 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı
Mikropartiküllerin açıklaması	küresel MP 10-50 µm pürüzsüz yüzey	küresel MP 5-20 µm gözenekli yüzey	agrega MP 10-30 µm gözenekli yüzey	küresel MP 10-15 µm hafif gözenekli	küresel MP 10-15 µm hafif gözenekli

				yüzey	yüzey
Bağlanma (MP'ler ile bağlanma)		%86	%34	%61	%70

Küçük çaplı stator (şaft 12 mm) ve 8-30,000 rpm'lik hız aralığı ile IKA Almanya'dan VWR VDI-12 yüksek kesme mikseri, # 5 konumuna (yaklaşık 24,000 rpm) ayarlanmıştır. Kör MP numunesi hazırlamak için %2'lik PVA fazında metilen klorür içinde yaklaşık %10'luk PLGA çözeltisinin kısa süreli işlemi (30 sn) kullanılmıştır; bu nispeten geniş boyutlu dağılımı (10-50 µm) olan düzgün küresel mikropartiküller ile sonuçlanmıştır. Köpürme nedeniyle, diğer işlemler daha düşük yüzey aktif madde konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon süresi de daha dar bir boyut dağılımı elde etmek için uzatılmıştır (1 veya 2 dakikalık işlem).

- 10 Çift emülsiyon içinde iç su fazının mevcudiyetinden dolayı, glatiramer peptidi ile hazırlanan tüm mikropartiküller optik mikroskop altında gözlemlendiğinde ya MP yüzeyinde ya da partikül içinde gözle görülebilir çukurlara ve gözenek işaretlerine sahip olmuştur.

Tablo 3. Glatiramer asetatın (GA) sürekli salımı için PLGA mikropartikülleri (formülasyon 5-7)

	MPG-05	MPG-06	MPG-07
İç su fazı			
GA, mg	30,8	20	20
GA kuru baz, mg	25,6	16,6	16,6
GA için su, µl	100+50 µl %2 PVA	166	175
Yağ fazında polimer			
PLGA RG 502H, mg	165		
PLGA RG 502, mg		200	250
Yağ fazı			
Disetilfosfat		75	
Dimiristoilfosfatidil gliserol sodyum (DMPG Na)			60
Metilen klorür	2,7 g	2,5 g	3,25 g

Dış su fazı			
PVA (%0,5)	30 ml	30 ml	30 ml
NaCl	0,25 g	0,25 g	0,25 g
Gözlemler ve yorumlar		DCP ve GA'dan oluşan pullar	DMPG'nın CH ₂ Cl ₂ içindeki çözünürlüğü zayıftır
Hazırlık süreci açıklaması (işlemci, hız ayarı, buharlaşma süresi)	IKA VDI-12 #5 2 dk, buharlaşma, 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı	IKA VDI-12 #5 2 dk, buharlaşma, 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı	IKA VDI-12 #5 2 dk, buharlaşma, 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı
Mikropartiküllerin açıklaması	küresel MP 10-15 µm hafif gözenekli yüzey	düzensiz partiküller	küresel MP 5-15 µm
Bağlanma (MP'ler ile bağlanma)	%81	%76	%84

Oluşan glatiramer asetat yüklü mikropartiküller santrifüj edilmiş; pelet, arıtılmış suda yeniden süspansiyon haline getirilmiş, yıkanmış ve tekrar tekrar santrifüj edilmiştir. Üst faz ve bazı durumlarda yıkama suyu glatiramer asetat içeriği için analiz edilmiştir. Santrifüjlenmiş 5 çökelti, saflaştırılmış su veya %5 mannitol çözeltisi içinde yeniden süspanse edilmiş ve liyofilize edilmiştir.

Tablo 4: Glatiramer asetatın (GA) sürekli salımı için PLGA mikropartikülleri (formülasyon 05R, 08-011 ve glatiramerin tokoferil süksinat tuzu)

	MPG-08	MPG-09	MPG-10	MPG-11	MPG-05R	Tokoferil süksinat tuzu 1:1
İç su fazı						

GA, mg	30,1	30,1	30,1	30,1	30,9	30,1
GA kuru baz, mg	25,0	25,0	25,0	25,0	25,6	25,0
Su, µl	150	200	200	200	200	200
Polimer						
PLGA RG 502H, mg	165	165			165	
PLGA RG RG-503, mg			165	165		0
Yağ fazı						
Tokoferil süksinat	20	50	20	50	0	10
Metilen klorür	2,7 g	2,7 g	2,7 g	3,2 g	3,7 g	2 g
Dış su fazı						
Yüzey aktif madde	30 ml %0,5 PVA	30 ml %0,5 PVA	30 ml %0,2 Tw80	30 ml %0,5 PVA	30 ml %0,5 PVA	20 ml H ₂ O
NaCl	0,25 g	0,25 g	0,25 g	0,25 g	0,25g	-
Hazırlık süreci açıklaması (işlemci, hız ayarı, buharlaşma süresi)	OMNI GLH #4 1 dk, buharlaşma 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı	OMNI GLH #4 1 dk, buharlaşma 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı	OMNI GLH #4 1 dk, buharlaşma, 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı	OMNI GLH #4 1 dk, buharlaşma, 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı	IKA VDI-12 #5 2 dk, buharlaşma, 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı	22 kHz Titanyum indenter sonikasyon 13W 60 sn
Mikropartiküllerin açıklaması	Küresel MP 2-5 µm pürüzsüz	Küresel MP 1-3 µm pürüzsüz	Küresel MP 3-5&20 µm pürüzsüz	Küresel MP 2-4 µm pürüzsüz	Kalıntılarla birlikte küresel MP 1-10 µm	Küresel aglomera MP 30-100 µm

Bağlanma (MP'ler ile bağlanma)	%82	%87	%46	%85	%93	%89
--------------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Tokoferil süksinat (MW 530, bir COOH eşdeğeri 265 Dalton) ve glatiramer asetatın (MW 4,700-11,000, bir NH₂ eşdeğeri ~693 Dalton) bir eşmolar kompleksinin (tuz) formülasyonu, buzla soğutulularak, 60 saniye boyunca (6x10 sn) bir ultrasonik indenter yardımıyla daha önce

5 çözünmüş eşmolar miktarda tokoferil süksinat ile glatiramerin bir sulu çözeltisini metilen klorür içinde süspansiyon haline getirerek hazırlanmıştır. Organik çözücünün ve suyun buharlaştırılmasından sonra, bu şekilde oluşturulan suda çözünmeyen ürün toplanmış, arıtılmış su ve kuru etanol ile yıkanmış ve daha fazla saflaştırılmadan diğer araştırmalarda kullanılmıştır.

10 Tablo 5. Glatiramer asetatın (GA) sürekli salımı için PLGA mikropartikülleri (formülasyon MPG-12 - 15)

	MPG-12	MPG-13	MPG-14	MPG-15
İç su fazı				
GA, mg	31,8	31,8	31,5	31,7
GA kuru baz, mg	26,4	26,4	26,1	26,3
Su, µl	200	200	200	200
Yağ fazında polimer				
PLGA RG 502H, mg	200	250	300	165
Yağ fazı				
Tokoferil süksinat, mg				9
Metilen klorür	2,6 g	2,7 g	2,7 g	2,6 g
Dış su fazı				
%0,5 PVA çözelti	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml
NaCl	0,25 g	0,25 g	0,25 g	0,25 g

Hazırlık süreci açıklaması (işlemci, hız ayarı, buharlaşma süresi)	IKA VDI-12 #5 (1 dk), buharlaşma, 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı	IKA VDI-12 #5 (1 dk), buharlaşma, 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı	IKA VDI-12 #5 (1 dk), buharlaşma, 4 sa, RT, manyetik karıştırıcı	IKA VDI-12 #6 2 sn, #5 40 sn, buharlaşma, RT, manyetik karıştırıcı
Mikropartiküllerin açıklaması	kalıntılarla birlikte küresel partiküller 10-15 µm	kalıntılarla birlikte küresel partiküller 10-18 µm	kalıntılarla birlikte küresel partiküller 10-15 µm	kalıntılarla birlikte küresel partiküller 6-10 µm; agregalar
Bağlanma (MP'ler ile bağlanma)	%85,4	%94,9	%96,4	%70,9
Püskürme (1 saatte salım)	%18,9	%8,5	%9,5	%13,6
4. gün ve 11. gün arasında salınan GA miktarı	%25,6	%21,0	%32,7	%19,6

Liyofilizasyon

Santrifüjleme ve yıkamadan sonra mikropartikülat formülasyonlar, ya "olduğu gibi" ya saflaştırılmış suda çökeltinin yeniden süspanse edilmesini takiben ya da bazı durumlarda, kriyoprotektan eklenerek (çökelti %5'lik bir mannitol çözeltisi içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiştir) liyofilize edilmiştir. Numuneler liyofilizatör plakası kullanılarak -37--43 °C'de 1 saat süreyle dondurulmuş ve 24-48 saat süreyle 0,050 mbar basınçta ve -20 °C'de liyofilizatör "Alfa 2-4 LSC" (Christ, Almanya) kullanılarak dondurularak kurutulmuş, son olarak 0,025 mbar'da ve +20 °C'de 10-16 saat boyunca kurutulmuştur. Her iki yeniden süspansiyon prosedüründe liyofilize ürün kolaylıkla yeniden yapılandırılabilir. Mannitol kullanımı, kriyoprotektan içermeyen formülasyonlar ile karşılaştırıldığında, kolayca yeniden yapılandırılan bir ürüne yol açmaktadır, ancak bu tür bileşimler, önemli miktarda balast

malzemesi içermekte ve aktif malzemenin gerçek konsantrasyonunu belirlemek için daha karmaşık hesaplamalar gerektirmektedir.

Örnek 4: PLGA mikropartiküllerinden glatiramer asetatın in vitro salımı Ekipman

5 20 ml'lik vialler

Çok noktalı manyetik karıştırıcı

İnkübatör

Pipetler

UV-Vis spektrofotometre Shimadzu 1601

10 Reaktifler ve plastik/cam eşyalar

Test maddeleri

Formülasyon MPG-02, 03, 04, 05, 05R, 06, 07, 12, 13, 14 ve 15 - 50 mg kuru liyofilize mikropartiküller.

15 Formülasyon MPG-08, 09, 10 ve 11 - %5 mannitol ile liyofilize edilmiş 50 mg kuru mikropartiküllere karşılık gelen miktar.

PBS içinde %0,05'lik sodyum azitle birlikte 20-50 µg/mL glatiramer asetat (baz olarak) çözeltisi

Sıcaklık: 37 °C

20 Glatiramer asetat (çeşitli formülasyonlar) ile yüklenmiş biyobozunur PLGA mikropartiküllerinden katılan glatiramer asetatın salınmasını değerlendirmek için aşağıdaki proses uygulanmıştır.

25 Prosesin açıklaması Her bir vial pH 7,4'te 20 ml PBS (0,01 M fosfat, %0,05 NaN₃) ilave edilmiştir. Vialler 37 °C'de yerleştirilmiş ve küçük bir miktarla karıştırılmıştır. 600 µl'lik örnekler 5 dakika 10,000 g'de santrifüj edilmiştir. 500 µl'lik üst faz, 0,1 M'lık 500 µl borat tamponu (2-kat seyreltme) ve 50 µl TNBS ilave edildikten sonra 1,5 ml'lik bir mikrotüp içine

aktarılmıştır. Elde edilen bileşim iyice karıştırılmış ve 30 dakika benç üzerinde tutulmuştur. Analiz, TNBS yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

- 500 µl taze PBS ile (NaN_3 ile yeniden süspanse edilen, çökelen partiküller, vialle geri döndürülmüştür. Her zaman noktası için %2,5'lik daha fazla salım prosesinde serbest kalan
- 5 glatiramer asetat miktarı için doğru hesaplama gerçekleştirilmiştir.

Katılan glatiramer asetatın salımı, çok noktalı bir manyetik karıştırıcı ile donatılmış 37 °C'de inkübatör kullanılarak sıkıca kapatılmış 20 ml'lik cam viallerde gerçekleştirilmiştir. Bir salım ortamı olarak pH 7,4'de fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi (PBS) kullanılmıştır.

Glatiramer asetatın salınması, 10-32 günlük bir süre boyunca test edilmiştir.

- 10 1-200 µg/ml aralığında kalibrasyon eğrisi için denklem aşağıdaki gibi hesaplanmıştır (Shimadzu UV-1601):

$$\text{OD}=0.035+0.0132 \cdot C \quad (r^2 = 0.9985)$$

- 15 Burada, OD - optik yoğunluk (420 ve 700 nm'de fark)

C - glatiramer asetat bazı konsantrasyonudur, µg/ml

- MPG01-MPG07 formülasyonlarının peptit salımının sonuçları, şekil 1'de gösterilmiştir. Katılan glatiramer asetatın en hızlı salımı (1-10 gün boyunca %40), asidik uç gruplarına (Resomer RG 502H) sahip ve hidrofobik karşı iyon içermeyen düşük moleküler ağırlıklı PLGA
- 20 polimerine dayanarak MPG-05 formülasyonundan elde edilmiştir. Karşı iyon (MPG-03) olarak nispeten az miktarda tokoferil süksinat içeren nötr polimer RG 502, daha düşük mutlak salım değerleri ile olsa da, önemli bir salım göstermiştir (2-12. günler için %-30). Daha yüksek miktarlarda karşı iyonlar içeren formülasyonlar, ilaç salımını baskılamıştır. Herhangi bir teori veya etki mekanizmasına bağlı kalmaksızın, bu, oluşan kompleksin yüksek hidrofobikliğine
- 25 atfedilebilir. Ek olarak, mikro partiküllerin DCP veya DMPG ile hazırlanması, agregaların oluşumu ve geniş bir parçacık büyüklüğü dağılımı ile ilişkili olmuştur.

VDI-12 (12 mm shaft) yerine daha büyük ve daha güçlü yüksek kesmeli karıştırıcı OMNI GLH (shaft çapı 20 mm, 5000-30000 rpm) kullanılması mikropartiküllerin büyüklüğünde

(formülasyonlar 8-11) önemli bir azalmaya ve yüzey pürüzsüzlüğünde artışa yol açar. Organik çözücünün (MPG-02) miktarının artırılması, mikropartiküllere azalan pepti katılmasına neden olmuştur. Herhangi bir teori veya etki mekanizmasına bağlı kalmaksızın, bu, ara o/w/o çift emülsiyon damlacık boyutundaki artışına atfedilebilir. Benzer şekilde, polisorbitatın iyonik olmayan yüzey aktif madde olarak kullanılması da ilaç yüklemesini olumsuz yönde etkilemiştir (%2 Tween-80 ile MPG-10). Hidrofobik karşı iyonların (tokoferil süksinat, dimiristoilfosfatidilgliserol DMPG, disetilfosfat DCP) eklenmesi, karşı iyon içermeyen (MPG-05, MPG-05R) formülasyonlara kıyasla, polimerik mikropartiküllerden peptit salımını önemli ölçüde geciktirmiştir. Herhangi bir teori veya etki mekanizmasına bağlı kalmaksızın, hidroforbik karşı iyonların eklenmesi, zayıf özelliklere sahip mikropartiküllere yol açabilir (MPG-06).

Kullanılan polimerin kimyasal yapısı, salım özellikleri üzerinde PLGA'nın molekül ağırlığından daha büyük bir etki göstermiştir. RG 502H ve RG 502 (yaklaşık 17,000 Dalton) rezomerleri, çok benzer difüzyon katsayılarına sahiptir, fakat polimerik matrisden içerilen peptidin salımını belirleyen ana faktör, glatiramer asetatın pozitif yüklü Lys kısımlarının ve PLGA polimerindeki karboksilik uç grupların çok noktalı bir iyonik etkileşimidir. Nötr Resomer® RG 502, bir karşı iyonun (MPG-02, 03) varlığında bile düşük bir bağlanma kapasitesi gösterirken, daha yüksek moleküler ağırlığa sahip nötr Resomer® RG 503 daha iyi bir bağlanma, ancak çok yavaş salım sergilemiştir (MPG-10, 11).

Ayrı olarak hazırlanan özdeş formülasyonlardan (MPG-05 ve MPG-05R) tekrarlanan salım deneyleri, makul ölçüde benzer davranış ve bu tür küçük ölçekli gruplar için iyi bir tekrarlanabilirlik göstermiştir. Resomer® RG 502H ile glatiramer asetat formülasyonları, benzer bir püskürme etkisi (~ %30), iyi bir başlangıç peptit bağlanması ve hızlı ilaç salımı sergilemiştir (Şekil 2).

Tokoferil süksinatın eşmolar kompleksi (tuz) formülasyonu, yüksek bağlanma bir bağlanma göstermiştir ve sudaki çözünürlüğü son derece düşük olmuştur (~ 5 µ/ml). Herhangi bir teori veya etki mekanizmasına bağlı kalmaksızın, buna diasit (tokoferil süksinat) ile polimerin poliamin molekülünün iyonik bir çapraz bağlanması neden olabilir. Polimerin bu tuzdan PBS içinde salınması aşırı derecede yavaş olmuştur. Polimerik mikropartiküller için, tokoferil süksinat, PLGA matrisine dahil edildiğinde, bu diasidin sadece bir kısmı polimer ile etkileşime girebilir ve tam salım baskılaması için daha yüksek miktarda tokoferil süksinat gereklidir.

Böylece salım oranı, glatiramer ve PLGA arasındaki orana göre düzenlenebilir. Daha düşük bir dereceye kadar olmakla birlikte, kullanılan organik çözücü miktarı da önemli olabilir.

Resomer® RG 502H'ye dayanan, ilaç ve polimer arasında farklı oranlara sahip 12-15 arası formülasyonlar, oranın, başlangıç püskürme etkisinin, bağlanma seviyesinin ve salım oranının kontrol edilmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. PLGA ve peptidin miktarının ayarlanmasının yanı sıra tokoferil süksinat gibi bir hidrofobik karşı iyon ilavesi, yüksek bağlanma, düşük ilk püskürme ve makul salım oranlarına sahip mikropartiküllü formülasyonların (MPG-12 - 15) hazırlanmasına izin verir (Şekil 3).

Örnek 5: Ölçek artırma

10 Glatiramer asetat mikropartikülat formülasyonlarının liyofilize örnekleri

MPG-14 SU-1 - MPG-014'ün formülasyonu, daha düşük bir hızda daha büyük bir reaksiyon kabı ve daha büyük bir homojenleştirici (OMNI GLH) kullanılarak üretilmiştir.

Toplam - 13 vial; her bir vial, vial başına ~ 18,2 mg toplam glatiramer asetat içeriği ile birlikte yaklaşık 235 mg liyofilize formülasyon içerir, bu da liyofilize formülasyonun ~ 75 µg/mg'ına eşittir.

MPG-15 SU-1 - MPG-015'in formülasyonu, daha düşük bir hızda daha büyük bir reaksiyon kabı ve daha büyük bir homojenleştirici (OMNI GLH) kullanılarak üretilmiştir.

Toplam - 10 vial; her bir vial, vial başına ~ 14,9 mg toplam glatiramer asetat içeriği ile birlikte yaklaşık 145 mg liyofilize formülasyon içerir, bu da liyofilize formülasyonun ~ 100 µg/mg'ına eşittir.

MPG-14 SU-2 - MPG-014'ün formülasyonu, aynı reaksiyon kabı, aynı homojenleştirici (VDI 12) ve aynı parametreler kullanılarak üretilmiş, proses birkaç kez tekrarlanmıştır. Bileşim, ilk püskürmeyi azaltmak için iyice yıkanmıştır.

Toplam - 12 vial; her bir vial, vial başına ~ 6,3 mg toplam glatiramer asetat içeriği ile birlikte yaklaşık 88 mg liyofilize formülasyon içerir, bu da liyofilize formülasyonun ~ 72 µg/mg'ına eşittir.

MPG-15 SU-2 - MPG-015'in formülasyonu, aynı reaksiyon kabı, aynı homojenleştirici (VDI 12) ve aynı parametreler kullanılarak üretilmiş, proses birkaç kez tekrarlanmıştır. Bileşim, ilk püskürmeyi azaltmak için iyice yıkanmıştır.

Toplam - 12 vial; her bir vial, vial başına ~ 5,6 mg toplam glatiramer asetat içeriği ile birlikte yaklaşık 55 mg liyofilize formülasyon içerir, bu da liyofilize formülasyonun ~ 100 µg/mg'ına eşittir.

Tüm liyofilize numuneler, bir buzdolabında +4 °C'de saklanmış ve kullanımdan önce yeniden oluşturulmuştur.

Formülasyon ve seyreltici (glikoz çözeltisi) arasındaki oran en az 1:5, tercihen 1:10 ve daha yüksek olmuştur. Yeniden oluşturulan numunenin uygulanmasından önce şiddetli bir çalkalama gerçekleştirilmiştir. Bu formülasyonların salım profilleri Şekil 4 ve 5'te gösterilmiştir.

Böylece, glatiramer asetatın suda yüksek çözünürlüğe sahip peptidinin biyobozunur polimerik mikropartiküllere katılması gösterilmiştir. Mikropartiküller, polimerin iyi bağlanmasını, makul ilaç yüklemesini ve farklı bileşimlerin ve preparasyon işlemlerinin kullanılmasıyla düzenlenebilen azaltılmış ilk salım püskürmesini sergilemiştir. Resomer® 502H'den yapılmış ve glatiramer asetat ile yüklenmiş PLGA mikropartikülleri, katılan peptidin, 37 °C'de karıştırılan bir sulu ortamda (fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi, pH 7,4) 10-15 gün boyunca günde %3-5 salım oranı ile in vitro salımını sağlar.

20 **Örnek 6: Deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) modeli**

Deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE), miyelin bazik proteini enjekte edilerek laboratuvar hayvanlarında indüklenebilen bir enflamatuar otoimmün demiyelinizan hastalıktır. Bu hastalık, klinik ve deneysel otoimmün hastalıkları incelemek için standart laboratuvar modeli haline gelmiştir. Aslında, çok sayıda makale (ör., Abramsky vd., J Neuroimmunol (1982) 21 and Bolton vd., J Neurol Sci. (1982) 56 147) hayvanlarda kronik tekrarlayan EAE'nin insanlardaki multipl skleroza benzerliklerinin, özellikle multipl skleroz gibi otoimmün demiyelinizan hastalıkların araştırılması için EAE'nin değerini gösterdiğine dikkat çeker. Bu haliyle, EAE test modeli, mevcut buluşun formülasyonlarının, multipl skleroza karşı aktivitesini belirlemek için kullanılmaktadır. Bu test aşağıdaki prosedüre göre yapılır.

Dişi Lewis sıçanlarına, 12,5 µg miyelin bazik proteini (MBP) (gine domuzu spinal korddan hazırlanmıştır) tam Freund adjuvanı içinde ayak pedlerine enjekte edilir. Mevcut buluşun formülasyonu, test hayvanlarına haftada bir/iki haftada bir/ayda bir kez çeşitli dozlarda enjeksiyon yoluyla verilir. Diğer belirlenmiş test hayvanlarına bir kontrol formülasyonu verilir.

- 5 Hayvanlar daha sonra tartılır ve EAE semptomları için günlük olarak 0'dan 3'e kadar olan bir ölçeğe göre skorlanır (0 = değişiklik yok; 1 = sarkık kuyruk; 2 = arka bacak sakatlığı ve 3 = arka bacak felci/can çekişme). Hayvanlar 3 skoruna ulaşırsa feda edilir.

Örnek 7: EAE modelini kullanarak in vivo çalışmalar

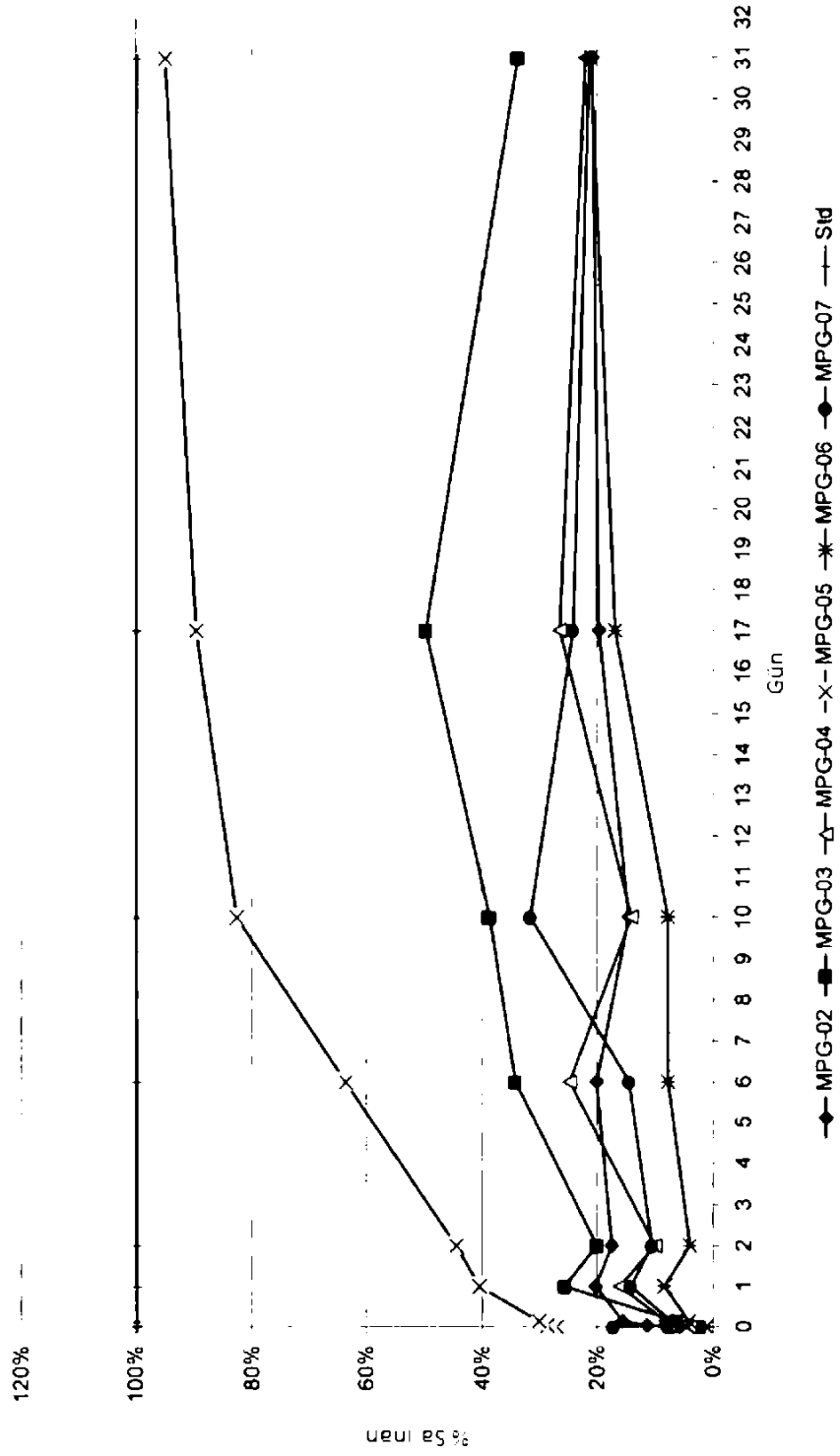
- 10 Mevcut buluşun formülasyonlarının MS'nin fare modelinde etkisini belirlemek için deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) gerçekleştirilir. 25-Hidroksivitamin D₃-1α-hidroksilaz nakavt fareleri (1α -OH KO), EAE immünizasyonundan iki ila üç hafta önce %0,87 kalsiyum ve 1 ng 1,25-(OH)₂D₃ (Vit D) içeren bir saflaştırılmış diyetle tutulur. EAE, altı ila on hafta sonra farelere 200 µg immünodominant peptidin miyelin oligodendrosit glikoproteinine (MOG₃₅₋₅₅) subkütan olarak immünizasyonu ile uyarılır.

- 15 Peptit standart 9-florenil-metoksi-karbonil kimyası kullanılarak sentezlenir. Peptit, ısı ile inaktif hale getirilmiş 4 mg/ml Mycobacterium tuberculosis H837a içeren Freund'un tam adjuvanı (CFA; Sigma) içinde çözünür.

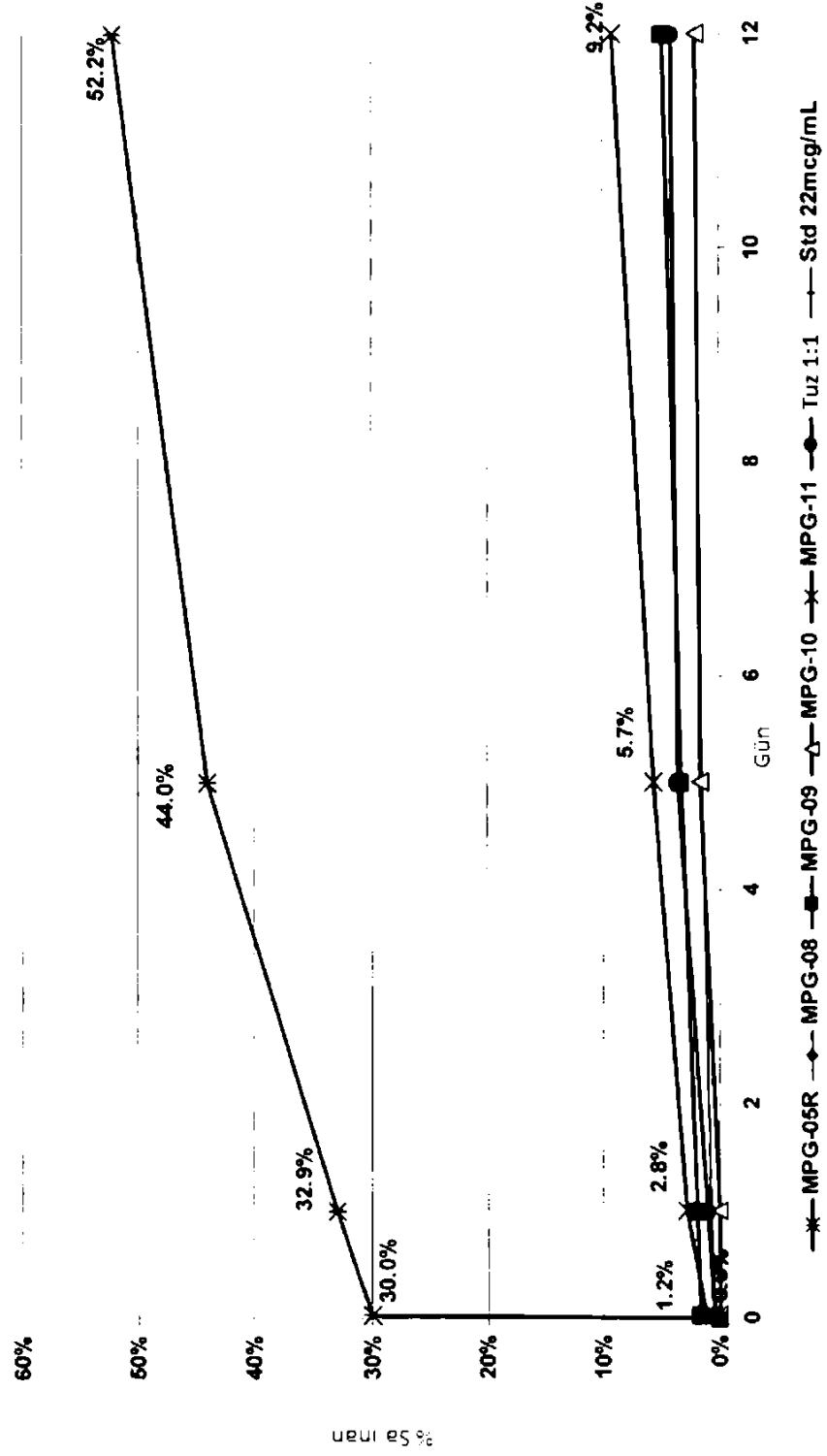
- 20 Fareler, aşağıdaki skora sistemini kullanarak EAE'nin klinik belirtileri için günlük olarak incelenir: 0, işaret yok; 1, gevşek kuyruk; 2, arka ayak zayıflığı; 3, arka ayak felci; 4, ön ayak felci; 5, can çekişme ya da ölüm.

- ≥ 2 skoruyla EAE'nin klinik semptomlarını geliştiren fareler, haftada bir/iki hafta bir/ayda bir kez çeşitli dozajlarda enjeksiyonla uygulanan bu buluşun formülasyonu ile tedavi edilir. Kontrol grupları, plasebo veya Gold standart glatiramer asetat rejimi ile tedavi edilir [ör. PNAS, 2005, cilt 102, no. 52, 19045-19050]. Fareler daha sonra EAE semptomları için her gün 25 tartılır ve skorlanır. İstatistiksel analiz, insidans oranı ve diğer tüm ölçümlerde eşleştirilmemiş Student t-testi üzerinde iki kuyruklu Fisher kesin olasılık testi kullanılarak gerçekleştirilir. P <0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.

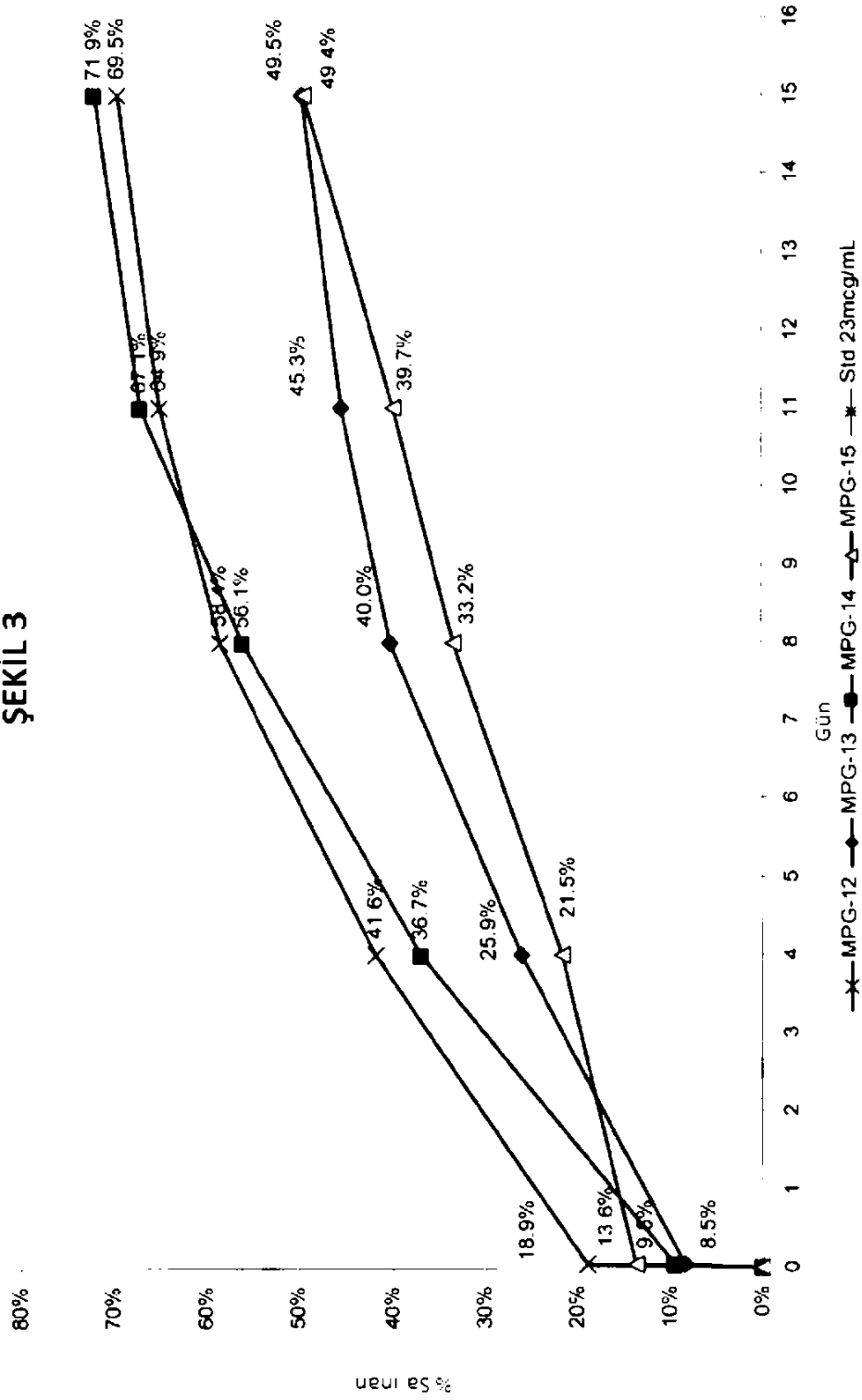
ŞEKİL 1



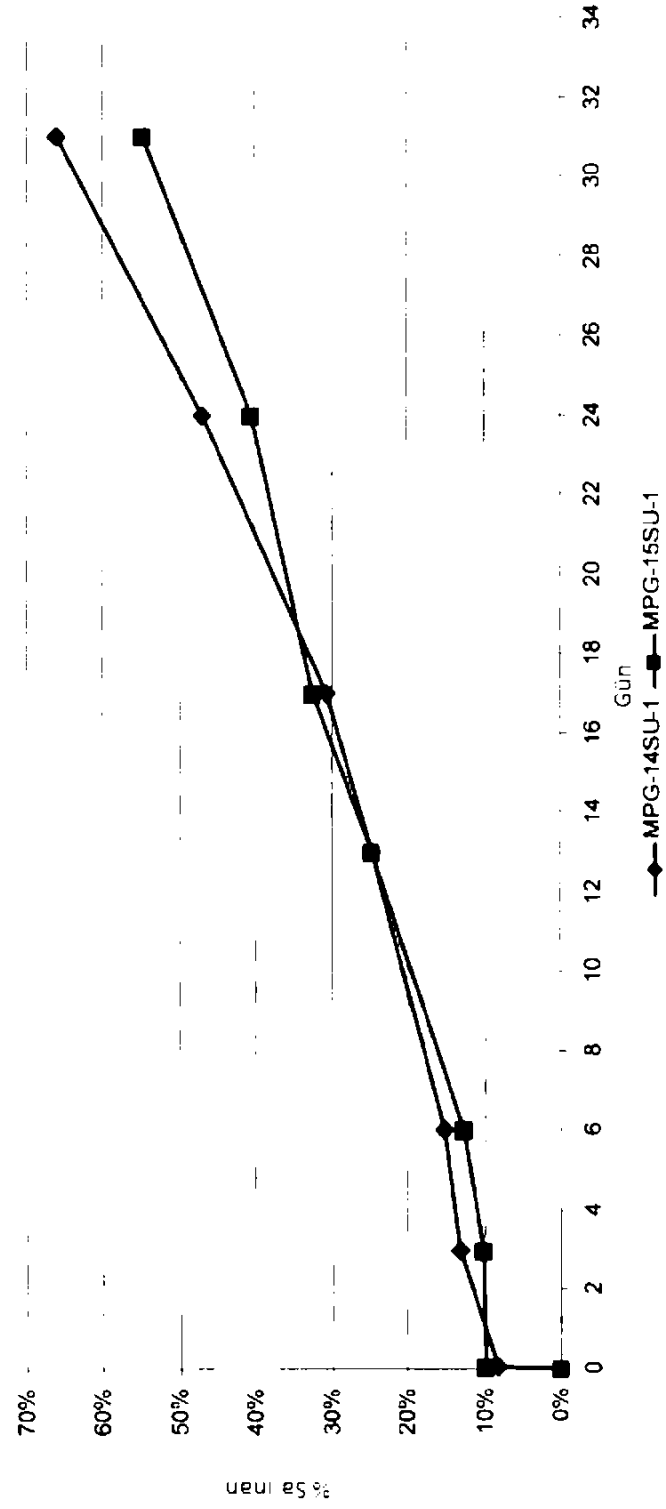
ŞEKİL 2



ŞEKİL 3



ŞEKİL 4



ŞEKİL 5

