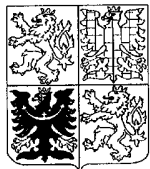


PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19) ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 20.01.1999

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 29.01.1998 20.01.1999

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1998/015394 1999/US9901180

(33) Země priority: US WO

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 13.12.2000
(Věstník č. 12/2000)

(86) PCT číslo: PCT/US99/01180

(87) PCT číslo zveřejnění: WO99/38536

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2654

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 47/48

A 61 K 9/14

(71) Přihlašovatel:

POLY-MED INC., Anderson, SC, US;

(72) Původce:

Shalaby Shalaby Wahba, Anderson, SC, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Absorbovatelné mikročástice

(57) Anotace:

Toto řešení se týká systému plynulého uvolňování jednoho nebo více peptidů, jednoho nebo více proteinů nebo jejich kombinací imobilizovaných na absorbovatelné polymerní mikročástici mající s výhodou absorbovatelný polymerní potah. Mikročásticový systém tohoto řešení zahrnuje peptid (peptidy) a/nebo protein (proteiny), které mají alespoň jednu aminoskupinu a/nebo alespoň jednu karboxylovou skupinu na molekulu a pevnou absorbovatelnou polyesterovou mikročástici mající povrchovou nebo podpovrchovou karboxylovou skupinu nebo aminoskupiny v dostatečném množství, aby vázaly peptid (peptidy) a/nebo protein (proteiny) tak, že imobilizovaný peptid (peptidy) a/nebo protein (proteiny) tvoří 0,1 až 30 % z celkové hmotnosti mikročásticového systému. Mikročásticové systémy s imobilizovaným peptidem (peptidy) a/nebo proteinem (proteiny) jsou s výhodou dále jednotlivě nebo ve skupinách zapouzdřeny absorbovatelným polymerem, aby bylo dále kontrolováno uvolňování imobilizovaného peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů). K ještě další kontrole uvolňování imobilizovaného peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů) mohou být zapouzdřené mikročástice zahrnuty do přípravku s absorbovatelnou kapalinou tvořící gel, která se přeměňuje na poddajný gel nebo polotuhou látku při styku s vodou v biologickém prostředí.

CZ 2000 - 2654 A3

Absorbovatelné mikročástice

Oblast techniky

Tento vynález se týká systému plynulého uvolňování jednoho nebo více peptidů, jednoho nebo více proteinů nebo jejich kombinace, které jsou imobilizované na absorbovatelné polymerní mikročástici mající s výhodou absorbovatelný polymerní potah. Mikročásticový systém tohoto vynálezu zahrnuje peptid (peptidy) a/nebo protein (proteiny), které mají alespoň jednu aminoskupinu a/nebo alespoň jednu karboxylovou skupinu na molekulu a pevnou absorbovatelnou polyesterovou mikročástici mající povrchové nebo podpovrchové karboxylové skupiny nebo aminoskupiny v dostatečném množství, aby vázaly peptid (peptidy) a/nebo protein (proteiny) tak, že imobilizovaný (é) peptid (peptidy) a/nebo protein (proteiny) představují 0,1 až 30 % z celkové hmotnosti mikročásticového systému. Mikročásticové systémy s imobilizovaným (i) peptidem (peptidy) a/nebo proteinem (proteiny) jsou s výhodou dále jednotlivě nebo ve skupinách zapouzdřeny absorbovatelným polymerem, aby bylo dále kontrolováno uvolňování imobilizovaného (ých) peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů). K ještě další kontrole uvolňování imobilizovaného (ých) peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů) mohou být zapouzdřené mikročástice zahrnuty do přípravku s absorbovatelnou kapalinou tvořící gel, která se přeměňuje na poddajný gel nebo polotuhou látku při styku s vodou v biologickém prostředí.

Dosavadní stav techniky

Pro kontrolované uvolňování farmaceutických přípravků *in vivo* byly vyvinuty, testovány a využity mnohé systémy podávání léků. Například

polyestery jako je poly(D,L-mléčná kyselina), poly(glykolová kyselina), poly(ϵ -kaprolakton) a různé jiné kopolymery byly použity pro uvolňování biologicky aktivních molekul jako je progesteron, přičemž tyto byly ve formě mikrokapslí, filmů nebo tyčinek (M. Chasin a R. Langer, editoři, Biodegradabilní polymery jako systémy podávání léku (Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, Dekker, NY, 1990). Po implantaci polymerního/terapeutického činidlového přípravku, například podkožně nebo nitrosvalově, se terapeutické činidlo uvolňuje po určitou časovou periodu. Tyto biokompatibilní, biodegradabilní polymerní systémy jsou vymyšleny tak, aby umožňovaly zachycenému terapeutickému činidlu difundovat z polymerní matrice. Po uvolnění terapeutického činidla se polymer odbourává *in vivo*, čímž je zamezeno chirurgickému odstraňování implantátu. Ačkoliv faktory, které přispívají k odbourání polymeru nejsou dobře známy, předpokládá se, že toto odbourávání polyesterů může být regulováno přístupností esterových vazeb neenzymatické autokatalytické hydrolýze polymerních složek.

Několik publikací EPO a US patentů se věnovalo problémům návrhu polymerní matrice a její role v regulaci rychlosti a rozsahu uvolňování terapeutických činidel *in vivo*.

Například Deluca (publikace EPO 0 467 389 A2) popisuje fyzikální interakci mezi hydrofóbním biodegradabilním polymerem a proteinem nebo polypeptidem. Vzniklý přípravek byla směs terapeutického činidla a hydrofóbního polymeru, která po zavedení do jedince zabezpečovala difuzní uvolňování činidla z matrice.

Hutchinson (US patent č. 4 767 628) kontroloval uvolňování terapeutického činidla pomocí homogenního rozptýlení v polymerním nosiči. Uvádí se, že tento přípravek poskytuje kontrolované, plynulé uvolňování jako výsledku dvou dějů: za prvé na difuzi závislém vyplavování léčiva z povrchu

přípravku a za druhé na uvolňování vodními kanálky indukovanými rozpadem polymeru.

Další *in situ* tvorba biodegradabilních implantátů a způsoby jejich vzniku jsou popsány v US patentu č. 5 278 201 (Patent '201) a US patentu č. 5 077 049 (Patent '049), Dunn et al. Patenty Dunn et al popisují způsoby podpory obnovy periodontální tkáně v periodontální kapse a zpomalení migrace epitelálních buněk podél povrchu kořene zubu. Patent 5 077 049 popisuje způsoby, které spočívají v umístění *in situ* vzniklé biodegradabilní bariéry na povrch zubu. Bariéra je mikroporézní a obsahuje póry o definované velikosti a může obsahovat biologicky aktivní činidla. Vzniku bariéry je dosaženo vnesením kapalného roztoku biodegradabilního polymeru jako je poly(D,L-laktid-co-glykolid), který je ve vodě koagulativní, termoplastický ve s vodou mísitelném, netoxickém organickém rozpouštědle jako je N-methylpyrrolidon (t.j. aby se získala typická koncentrace polymeru 50 %), do periodontální kapsy. Organické rozpouštědlo se rozptýlí v periodontálních tekutinách a biodegradabilní, ve vodě koagulativní polymer vytvoří pevný, biodegradabilní implantát *in situ*. Odstraněním rozpouštědla se vytvoří póry uvnitř pevného biodegradabilního implantátu, které podporují vrůstání buněk. Patent '859 podobně popisuje způsoby pro stejné indikace, které zahrnují tvorbu biodegradabilní bariéry z kapalně směsi biodegradabilního, odléčitelného, teplem tvrditelného prepolymeru, léčivého činidla a ve vodě rozpustného materiálu jako je sůl, cukr a ve vodě rozpustného polymeru. Odléčitelný, teplem tvrditelný prepolymer je popsán jako akrylesterem ukončený absorbovatelný polymer.

V literatuře je navíc popsáno množství systémů pro kontrolované podávání biologicky aktivních sloučenin do různých míst. Například US patent č. 5 011 692, Fujioka et al, popisuje plynule pulzně uvolňující farmaceutický prostředek, který se skládá z vrstev polymerního materiálu obsahujícího léčivo.

Vrstvy polymerního materiálu obsahují léčivo pouze v malém množství nebo léčivo neobsahují. Celý povrch se zvětšuje ve směru kolmém k rovině vrstvy a je pokryt polymerním materiálem, který je nerozpustný ve vodě. Tyto způsoby pulsům podobného uvolňování farmaceutických dávek jsou vhodné pro umístění pod kůži.

US patent č. 5 366 756, Chesterfield et al, popisuje způsob přípravy porézních, bioabsorbovatelných, chirurgických implantačních materiálů. Způsob zahrnuje získání množství částic bioabsorbovatelného implantačního materiálu a pokrytí částic bioabsorbovatelného implantačního materiálu alespoň jedním růstovým faktorem. Implantát může také obsahovat antimikrobiální činidla.

US patent č. 5 385 738, Yamhira et al, popisuje injekční systém plynulého uvolňování zahrnující suspendování prášku skládajícího se z aktivní složky a farmaceuticky přijatelného biodegradabilního nosiče (např. proteinů, polysacharidů a syntetických vysokomolekulárních sloučenin, s výhodou kolagenu, atelokolagenu, želatiny a jejich směsi) ve viskózním rozpouštědle (např. rostlinných olejích, polyethylenglykolu, propylenglykolu, silikonovém oleji a triglyceridů mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem) pro injekci. Aktivní složka ve farmaceutickém přípravku je do biodegradabilního nosiče začleněna v následujícím stavu: i) aktivní složka je chemicky vázána na matici nosiče, ii) aktivní složka je vázána k matici nosiče mezimolekulárním působením nebo iii) aktivní složka je fyzikálně obklopena maticí nosiče.

Navíc takové systémy, které byly v literatuře popsány v minulé době, například Dunn et al (US patent č. 4 938 763) popisují *in situ* tvorbu biodegradabilních, mikroporézních, pevných implantátů v živém těle pomocí koagulace roztoku polymeru v organickém rozpouštědle jako je N-methyl-2-pyrrolidin. Avšak použití rozpouštědel, v to zahrnující nízkomolekulární organická rozpouštědla, urychluje migraci roztoku od místa aplikace, čímž

způsobuje poškození živé tkáně, v to zahrnujíc dehydrataci buněk a odumírání. Úbytek hmotnosti rozpouštědla může vést ke smršťování sraženiny a oddělení od okolní tkáně.

US patent č. 5 612 052 popisuje mikročástice kationtových měničů, které jsou typicky vytvořené z polyesterových řetězců nesoucích karboxylové skupiny, na nichž se imobilizují zásaditá bioaktivní činidla, čímž z absorbovatelného, gel tvořícího kapalného polyesteru vzniká systém kontrolovaného uvolňování. Obsah US patentu č. 5 612 052 je zde zahrnut v odkazech. Iontové konjugování karboxylových skupin s bazickým polypeptidem bylo zaznamenáno v předchozím díle v oboru, jak je popsáno v US patentu č. 5 672 659 a US patentu č. 5 665 702. Avšak tyto komplexy jsou rozpustnými chemickými subjekty vzniklými molekulovými reakcemi jednotlivých bazických a karboxylových složek v jejich vlastních roztocích za vzniku dobře definovaných iontových konjugátů jako nového chemického subjektu s fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Tím se odlišují od předloženého vynálezu, kde vznik komplexu nastává v heterogenním systému zahrnujícím přednostně povrchovou tvorbu komplexu.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká navázané mikročástice obsahující absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem a jeden nebo více peptidů, jeden nebo více proteinů nebo jejich kombinaci, imobilizované na uvedeném absorbovatelném polymerním jádru s heterogenním řetězcem,

kde každý peptid se nezávisle vybere ze skupiny sestávající z peptidu stimulujícího produkci růstového hormonu (GHRP), hormonu stimulujícího produkci luteinizačního hormonu (LHRH), somatostatinu, bombesinu, peptidu

stimulujícího produkci gastrinu (GRP), kalcitoninu, bradykininu, galaninu, melanocyt stimulujícího hormonu (MSH), faktoru stimulujícího produkci růstového hormonu (GRF), amylinu, tachykininů, sekretinu, parathormonu (PTH), enkefalinu, endothelinu, peptidu stimulujícího produkci kalcitoninového genu (CGRP), neuromedinů, proteinu příbuznému parathormonu (PTHrP), glukagonu, neurotensinu, adrenokortikotropního hormonu (ACTH), peptidu YY (PYY), peptidu stimulujícího produkci glukagonu (GRP), vasoaktivního intestinálního peptidu (VIP), peptidu aktivujícího adenylátcyklasu hypofýzy (PACAP), motilinu, sloučeniny P, neuropeptidu Y (NPY), TSH a jejich analogů a fragmentů nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli a

kde každý protein se nezávisle vybere ze skupiny sestávající z růstového hormonu, erythropoietinu, faktoru stimulujícího kolonie granulocytů, faktoru stimulujícího kolonie granulocyt-makrofág a interferonů.

Zvýhodněnou navázanou mikročasticí podle bezprostředně předcházejícího textu, označenou jako skupina B, je ta, kde uvedený peptid, protein nebo jejich kombinace nebo jejich farmaceuticky přijatelná sůl tvoří 0,1 až 30 % z celkové hmotnosti navázané mikročastice.

Zvýhodněnou navázanou mikročasticí podle bezprostředně předcházejícího textu, označenou jako skupina C, je ta, kde uvedené absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem obsahuje glykolátové jednotky.

Zvýhodněnou navázanou mikročasticí podle bezprostředně předcházejícího textu, označenou jako skupina D, je ta, kde uvedené absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem dále obsahuje citrátové zbytky, vínanové zbytky nebo jablečnanové zbytky.

Zvýhodněnou navázanou mikročasticí podle bezprostředně předcházejícího textu, označenou jako skupina E, je ta, kde poměr glykolátových

jednotek k citrátovým zbytkům, k vínanovým zbytkům nebo k jablečnanovým zbytkům je 7:1 až 20:1.

Další zvýhodněnou navázanou mikročasticí skupiny C je ta, kde uvedené glykolátové jednotky jsou zakončeny karboxylovou skupinou.

Ještě další zvýhodněnou navázanou mikročasticí skupiny C je ta, kde uvedené glykolátové jednotky jsou zakončeny aminoskupinou.

V dalším aspektu tento vynález poskytuje zapouzdřenou mikročasticí obsahující jednu nebo více navázaných mikročastic uvnitř absorbovatelného zapouzdřovacího polymeru,

kde uvedená navázaná mikročastice obsahuje absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem a jeden nebo více peptidů, jeden nebo více proteinů nebo jejich kombinaci, imobilizované na uvedeném absorbovatelném polymerním jádře s heterogenním řetězcem,

kde každý peptid se nezávisle vybere ze skupiny sestávající z peptidu stimulujícího produkci růstového hormonu (GHRP), hormonu stimulujícího produkci luteinizačního hormonu (LHRH), somatostatinu, bombesinu, peptidu stimulujícího produkci gastrinu (GRP), kalcitoninu, bradykininu, galaninu, melanocyt stimulujícího hormonu (MSH), faktoru stimulujícího produkci růstového hormonu (GRF), amylinu, tachykininů, sekretinu, parathormonu (PTH), enkefalinu, endothelinu, peptidu stimulujícího produkci kalcitoninového genu (CGRP), neuromedinů, proteinu příbuznému parathormonu (PTHrP), glukagonu, neurotensinu, adrenokortikotropního hormonu (ACTH), peptidu YY (PYY), peptidu stimulujícího produkci glukagonu (GRP), vasoaktivního intestinálního peptidu (VIP), peptidu aktivujícího adenylátcyklasu hypofýzy (PACAP), motilinu, sloučeniny P, neuropeptidu Y (NPY), TSH a jejich analogů a fragmentů nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli,

každý protein se nezávisle vybere ze skupiny sestávající z růstového hormonu, erythropoietinu, faktoru stimulujícího kolonie granulocytů, faktoru stimulujícího kolonie granulocyt-makrofág a interferonů a

kde uvedené absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem obsahuje glykolátové jednotky.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde uvedený peptid, protein nebo jejich kombinace nebo jejich farmaceuticky přijatelná sůl tvoří 0,1 až 30 % z celkové hmotnosti navázané mikročástice a kde uvedené absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem obsahuje citrátové zbytky, vínánové zbytky nebo jablečnanové zbytky.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu, označená jako skupina F, je ta, kde poměr glykolátových jednotek k citrátovým zbytkům, k vínánovým zbytkům nebo k jablečnanovým zbytkům je 7:1 až 20:1 a uvedené glykolátové jednotky jsou zakončeny karboxylovou skupinou nebo aminoskupinou.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde uvedený absorbovatelný zapouzdřovací polymer obsahuje

- a) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- b) jednotky odvozené od D,L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- c) jednotky odvozené od D,L-laktidových jednotek nebo
- d) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a D,L-laktidových jednotek.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde poměr jednotek odvozených od L-laktidu ku jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10, poměr jednotek odvozených od L-laktidu ku jednotkám odvozeným od D,L-laktidu je 80:20 a poměr jednotek odvozených od D,L-laktidu ku jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice skupiny F je ta, kde absorbovatelný zapouzdřovací polymer tvoří 5 až 70 % z celkové hmotnosti zapouzdřené mikročástice.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde absorbovatelný zapouzdřovací polymer tvoří 20 až 60 % z celkové hmotnosti zapouzdřené mikročástice.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde absorbovatelný zapouzdřovací polymer tvoří 30 až 50 % z celkové hmotnosti zapouzdřené mikročástice.

V dalším aspektu tento vynález poskytuje farmaceutický přípravek obsahující navázané mikročástice popsané výše a farmaceuticky přijatelný nosič.

V dalším aspektu tento vynález poskytuje farmaceutický přípravek obsahující navázané mikročástice popsané výše, nevodný, absorbovatelný, gel tvořící kapalný polyester a výhodně farmaceuticky přijatelný nosič.

V dalším aspektu tento vynález poskytuje farmaceutický přípravek obsahující zapouzdřené mikročástice popsané výše a farmaceuticky přijatelný nosič.

V dalším aspektu tento vynález poskytuje farmaceutický přípravek obsahující zapouzdřené mikročástice popsané výše, nevodný, absorbovatelný, gel tvořící kapalný polyester a výhodně farmaceuticky přijatelný nosič.

Další zvýhodněná navázaná mikročástice skupiny D, která označuje skupinu G, je ta, kde absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem obsahuje citrátové zbytky a peptidem je analog LHRH.

Zvýhodněná navázaná mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde poměr glykolátových jednotek k citrátovým zbytkům absorbovatelného polymerního jádra s heterogenním řetězcem je 7:1 až 20:1 a kde analogem LHRH je p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

Další zvýhodněná navázaná mikročástice skupiny D, která označuje skupinu H, je ta, kde absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem obsahuje vínanové zbytky a peptidem je analog LHRH.

Zvýhodněná navázaná mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde poměr glykolátových jednotek k vínanovým zbytkům je 7:1 až 20:1 a analogem LHRH je p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

Ještě další zvýhodněná navázaná mikročástice skupiny D, která označuje skupinu I, je ta, kde absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem obsahuje citrátové zbytky a peptidem je analog somatostatinu.

Zvýhodněná navázaná mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde poměr glykolátových jednotek k citrátovým zbytkům je 7:1 až 20:1 a somatostatinovým analogem je H-β-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou, N-hydroxyethylpiperaziny-acetyl-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou nebo N-hydroxyethylpiperaziny-ethylsulfonyl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou.

Ještě další zvýhodněná navázaná mikročástice skupiny D, která označuje skupinu J, je ta, kde absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem obsahuje vínanové zbytky a peptidem je analog somatostatinu.

Zvýhodněná navázaná mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde poměr glykolátových jednotek k vlnanovým zbytkům je 7:1 až 20:1 a somatostatinovým analogem je H- β -D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou, N-hydroxyethylpiperazinyl-acetyl-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou nebo N-hydroxyethylpiperazinyl-ethylsulfonyl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice tohoto vynálezu je zapouzdřená mikročástice obsahující jednu nebo více navázaných mikročástic skupiny G, zapouzdřených v absorbovatelném zapouzdřovacím polymeru, který se skládá z

- jednotek odvozených od L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- jednotek odvozených od D,L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- jednotek odvozených od D,L-laktidových jednotek nebo
- jednotek odvozených od L-laktidových jednotek a D,L-laktidových jednotek.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde poměr glykolátových jednotek k citrátovým zbytkům absorbovatelného polymerního jádra je 7:1 až 20:1, analogem LHRH je p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ a kde poměr

- jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10,
- jednotek odvozených od D,L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10 a
- jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od D,L-laktidu je 80:20.

Další zvýhodněná zapouzdřená mikročástice obsahuje jednu nebo více navázaných mikročástic skupiny H, zapouzdřených v absorbovatelném zapouzdřovacím polymeru, který se skládá z

- a) jednotek odvozených od L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- b) jednotek odvozených od D,L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- c) jednotek odvozených od D,L-laktidových jednotek nebo
- d) jednotek odvozených od L-laktidových jednotek a D,L-laktidových jednotek.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde poměr glykolátových jednotek k vínanovým zbytkům absorbovatelného polymerního jádra je 7:1 až 20:1, analogem LHRH je p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ a kde poměr

- a) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10,
- b) jednotek odvozených od D,L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10 a
- c) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od D,L-laktidu je 80:20.

Další zvýhodněná zapouzdřená mikročástice obsahuje jednu nebo více navázaných mikročástic skupiny I, zapouzdřených v absorbovatelném zapouzdřovacím polymeru, který se skládá z

- a) jednotek odvozených od L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- b) jednotek odvozených od D,L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- c) jednotek odvozených od D,L-laktidových jednotek nebo
- d) jednotek odvozených od L-laktidových jednotek a D,L-laktidových jednotek.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde poměr glykolátových jednotek k citrátovým zbytkům absorbovatelného polymerního jádra je 7:1 až 20:1, somatostatinovým

analogem je H- β -D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou, N-hydroxyethylpiperazinyl-acetyl-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou nebo N-hydroxyethylpiperazinyl-ethylsulfonyl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou a kde poměr

- a) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10,
- b) jednotek odvozených od D,L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10 a
- c) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od D,L-laktidu je 80:20.

Další zvýhodněná zapouzdřená mikročástice obsahuje jednu nebo více navázaných mikročástic skupiny J a absorbovatelný zapouzdřovací polymer, který se skládá z

- a) jednotek odvozených od L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- b) jednotek odvozených od D,L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- c) jednotek odvozených od D,L-laktidových jednotek nebo
- d) jednotek odvozených od L-laktidových jednotek a D,L-laktidových jednotek.

Zvýhodněná zapouzdřená mikročástice podle bezprostředně předcházejícího textu je ta, kde poměr glykolátových jednotek k vlnanovým zbytkům absorbovatelného polymerního jádra je 7:1 až 20:1, somatostatinovým analogem je H- β -D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou, N-hydroxyethylpiperazinyl-acetyl-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou nebo N-hydroxyethylpiperazinyl-ethylsulfonyl-Phe-Cys-

Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou a kde poměr

a) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10,

b) jednotek odvozených od D,L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10 a

c) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od D,L-laktidu je 80:20.

V dalším aspektu tento vynález poskytuje způsob výroby zapouzdřené mikročástice popsané výše, který zahrnuje krok zapouzdření navázané mikročástice absorbovatelným zapouzdřovacím polymerem.

Zvýhodněný způsob podle bezprostředně předcházejícího textu je ten, kde disperze uvedených navázaných mikročástic v roztoku obsahujícím uvedený absorbovatelný zapouzdřovací polymer a rozpouštědlo se kápnou do předchlazeného média, kde uvedeným médiem není rozpouštědlo uvedeného absorbovatelného zapouzdřovacího polymeru.

Zvýhodněný způsob podle bezprostředně předcházejícího textu je ten, kde roztok absorbovatelného zapouzdřovacího polymeru sestává z 5 až 30 % absorbovatelného zapouzdřovacího polymeru, předchlazeným médiem je alkohol se dvěma nebo více uhlíkovými atomy a teplota média je v rozmezí od laboratorní teploty do -80 °C.

Zvýhodněný způsob podle bezprostředně předcházejícího textu je ten, kde teplota předchlazeného média je -60 až -80 °C a médiem je isopropylalkohol.

V ještě dalším aspektu tento vynález poskytuje způsob výroby zapouzdřené mikročástice popsané výše, který zahrnuje krok zapouzdření navázané mikročástice absorbovatelným zapouzdřovacím polymerem pomocí emulzní techniky.

Termín absorbovatelný, jak se zde užívá, znamená ve vodě nerozpustný materiál, jako je polymer, který v biologickém prostředí podléhá rozpojení řetězce na ve vodě rozpustné vedlejší produkty.

Termín mikročástice, jak se zde užívá, se vztahuje na mikročástice absorbovatelného polyesteru, které jsou s výhodou v podstatě v kulovité formě.

Termín navázaná částice, jak se zde užívá, se vztahuje k mikročástici, která má jeden nebo více peptidů a/nebo jeden nebo více proteinů iontově imobilizovaných na mikročástici.

Termín zapouzdrěná mikročástice, jak se zde užívá, se vztahuje k navázané mikročástici, která má polymerní pokrytí, kde polymerní pokrytí není nezbytně zcela okluzní.

Termín polymerní jádro, jak se zde užívá, je jiným způsobem odkazování na mikročástice.

Termín zapouzdrňovací polymer, jak se zde užívá, se vztahuje k polymeru, který se používá k zapouzdrění navázané mikročástice.

Termín kapalný polyester tvořící gel, jak se zde užívá, se vztahuje k materiálům, které absorbují rozpouštědla jako je voda, podléhají fázové přeměně a získávají trojrozměrnou síťovou strukturu schopnou reverzibilní změny tvaru.

Aminokyseliny se v běžném provedení označují pomocí standardních třípísmenkových zkratk známých v oboru, například Ala = alanin.

Mikročástice podle předloženého vynálezu je krystalická a je vyrobena z absorbovatelného polyesteru jako je polyglykolid, který má jednu nebo více karboxylových skupin na jednotlivých řetězcích, čehož výsledkem je dostatečná koncentrace karboxylových skupin na povrchu mikročástice a bezprostředně pod povrchem mikročástice, pro komplexaci a iontovou imobilizaci peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů), které mají jednu nebo více bazických

skupin. Nebo karboxylové skupiny polyglykolidu mohou být amidovány, například diaminem, s výhodou primárním nebo sekundárním aminem nebo jejich směsí, kde amin vytvoří komplex, který iontově imobilizuje peptid (peptidy) a/nebo protein (proteiny), které mají jednu nebo více kyselé skupin. Přestože povrch mikročastic není nezbytně homogenní, termín podpovrchový se vztahuje k šterbinám a podobně, které se nalézají na povrchu mikročastic. Navázané mikročastice tvoří prostředek kontrolovaného uvolňování peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů) v pacientovi. Pro další kontrolu uvolňování imobilizovaného peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů) mohou být navázané mikročastice jednotlivě nebo ve skupinách zapouzdřeny v absorbovatelném polymerním potahu. Navázané mikročastice uvolňují v pacientovi peptid (peptidy) a/nebo protein (proteiny) po dobu dvou dnů až tři měsíců, s výhodou jeden týden až tři měsíce. Zapouzdřené mikročastice uvolňují v pacientovi peptid (peptidy) a/nebo protein (proteiny) po dobu tří dnů až šesti měsíců, s výhodou dva týdny až pět měsíců.

Typické příklady peptidu, který může být imobilizován na mikročastici, zahrnují, ale nejsou limitovány na peptid stimulující produkci růstového hormonu (GHRP), hormon stimulující produkci luteinizačního hormonu (LHRH), somatostatin, bombesin, peptid stimulující produkci gastrinu (GRP), kalcitonin, bradykinin, galanin, melanocyt stimulující hormon (MSH), faktor stimulující produkci růstového hormonu (GRF), amylin, tachykininy, sekretin, parathormon (PTH), enkefalin, endothelin, peptid stimulující produkci kalcitoninového genu (CGRP), neuromediny, protein příbuzný parathormonu (PTHrP), glukagon, neurotensin, adrenokortikotropní hormon (ACTH), peptid YY (PYY), peptid stimulující produkci glukagonu (GRP), vasoaktivní intestinální peptid (VIP), peptid aktivující adenylátcyklasu hypofýzy (PACAP), motilin, sloučeninu P, neuropeptid Y (NPY), TSH a jejich analogy a fragmenty.

Příklady proteinů, které mohou být imobilizovány na mikročástici, jsou růstový hormon, erythropoietin, faktor stimulující kolonie granulocytů, faktor stimulující kolonie granulocyt-makrofág a interferony.

Mikročástice může být vyrobena z polymeru na bázi laktidu nebo pevného, semikrystalického polylaktonu jako je polyglykolid, který může být vytvořen metathesní polymerizací s otvíráním kruhu kyselinovou skupinu nesoucími hydroxylickými iniciátory jako je glykolová kyselina, mléčná kyselina, jablečná kyselina, vinná kyselina a citronová kyselina. Mikročástice předloženého vynálezu může být syntetizována podle následujícího postupu. V reakční nádobě se smísí monomer odvozený od laktidu a/nebo lakton jako je glykolid a kyselý iniciátor jako je vinná kyselina, jablečná kyselina nebo citronová kyselina. Reakční nádoba se zahřeje na 35 až 45 °C, s výhodou 40 °C a umístí pod snížený tlak na dobu 20 až 60 minut, s výhodou 30 minut. Teplota reakční nádoby se zvýší na 105 až 115 °C, s výhodou 110 °C. Když je dosaženo této teploty, nádoba se umístí do atmosféry bezkyslíkatého dusíku a směs se míchá. Když směs roztaje, přidá se katalytické množství organokovového katalyzátoru, který je vhodný k metathesní polymerizaci otevřením kruhu, jako je 2-ethylhexanoat cínatý v aprotním rozpouštědle jako je toluen. K odstranění toluenu se poté znovu aplikuje snížený tlak po dobu 30 až 90 vteřin, aniž by významně ubylo monomeru. Teplota směsi se na 5 až 10 minut zvýší na 115 až 125 °C, s výhodou 120 °C, před tím, než se dále zvýší na 145 až 150 °C. Za konstantního mechanického míchání byla směs ponechána při této teplotě po 3 až 5 hodin, s výhodou 4 hodiny.

Výsledný polymer se nejprve rozmělní rozemletím při použití nožového mlýnku. Polymer se poté rozmělní v zařízení Aljet Micronizer pomocí stlačeného suchého proudu dusíku. Střední velikost průměru částic se analyzuje

přístrojem Malvern Mastersizer/E pomocí objemového distribučního modelu a silikonového oleje 200/5 cS jako disperzního činidla.

Polymer se přečistí a jeho sodná sůl se vytvoří dispergováním rozmělněného polymeru v acetonu a jeho umístěním do ultrazvukové lázně, s výhodou na 30 minut.

Během této doby byla disperze pomocí homogenizátoru také homogenizována při 8000 až 24 000 otáčkách za minutu, s výhodou 9500 otáčkách za minutu. Po tomto kroku působení ultrazvukem/homogenizací se disperze s výhodou po 30 minut odstředovala v centrifuze při 3000 až 7000 otáčkách za minutu, s výhodou 5000 otáčkách za minutu. Supernatant se odstraní, koláče z centrifugy se znovu suspendují v čerstvém acetonu a krok působení ultrazvukem/homogenizace se opakuje. Když je druhé odstředění ukončeno, supernatant se odstraní a koláče z centrifugy se znovu suspendují v deionizované vodě. Poté se provede konečný krok působení ultrazvukem/homogenizace, aby se odstranil veškerý zbývající aceton a disperze se ještě jednou odstředuje 30 minut při 5000 otáčkách za minutu.

Koláče z centrifugy se znovu suspendují v čerstvé deionizované vodě a sleduje se hodnota pH disperze. Za míchání se přidají dostatečné objemy slabé zásady jako 0,2 M roztoku uhličitanu sodného, aby se pH zvýšilo na hodnotu 8 až 9. Disperze se poté ponechají míchat 30 minut před tím, než se odfiltrují za sníženého tlaku přes filtrační papír. Filtrační koláče se promyjí další deionizovanou vodou, zmrazí a lyofilizují.

Čištění se sleduje pomocí diferenční skenovací kalorimetrií (DSC) při rychlosti zahřívání 5 až 15 °C/min, s výhodou 10 °C/min.

Mikročástice aniontového měniče se získá odebráním mikročástic kationtového měniče a jejich inkubováním v horkém zředěném roztoku (~ 80 °C) diaminu, přičemž je zvýhodněné, že aminy mohou být jak primární amin, tak

sekundární amin nebo směs primárního a sekundárního aminu známé koncentrace v dioxanu nebo THF, pod inertním plynem jako je argon. Koncentrace diaminu v dioxanu nebo THF se určí acidimetrií. Když je reakce prakticky ukončena, amidované mikročástice se oddělí filtrací, promyjí dioxanem nebo THF a vysuší za sníženého tlaku.

Peptid (peptidy) a/nebo protein (proteiny) mohou být na mikročástici imobilizovány následujícím způsobem. Sodná sůl mikročástice se disperguje v roztocích obsahujících volnou bázi peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů) rozpuštěných ve vodě. Disperze se 2 hodiny inkubují za míchání při laboratorní teplotě, než se odfiltrují navázané mikročástice. Filtrační koláče se promyjí další deionizovanou vodou, zmrazí a lyofilizují. Vzorky se poté analyzují na dusík elementární analýzou pro určení množství imobilizovaného peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů).

Velikost mikročástice hraje roli v množství peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů), které může mikročástice tohoto vynálezu imobilizovat. Čím menší je velikost mikročástice, tím větší povrchovou plochu má hmotnost mikročástic, a tak může imobilizovat více peptidu a/nebo proteinu na hmotnost mikročástic. Snížení velikosti mikročástic na mikronové nebo submikronové rozměry může být dosaženo způsobem popsáným výše. Průměr mikročástic se může pohybovat ve velikosti 0,5 až 100 μm , s výhodou 1 až 15 μm a výhodněji 3 až 10 μm .

Absorbovatelný zapouzdřovací polymer může být krystalický nebo nekrystalický kopolymer laktidu a glykolidu, amorfni kopolymer L-laktidu a D,L-laktidu, kopolymer kaprolaktonu a glykolidu nebo kopolymer trimethylenkarbonatu a glykolidu, který je rozpustný v běžných organických rozpouštědlech jako je chloroform, methylenchlorid, aceton, acetonitril, ethylacetat a ethylformiát. Rozpouštědla, která nerozpouštějí takový

absorbovatelný zapouzdřovací polymer, zahrnují vodu, nízkovroucí alkoholy a uhlovodíky. Absorbovatelný zapouzdřovací polymery mohou být syntetizovány katalýzou polymerizace laktonů za otvírání kruhu nebo polymerizací cyklických monomerů jako je ϵ -kaprolakton, p-dioxanon, trimethylenkarbonat, 1,5-dioxepan-2-on nebo 1,4-dioxepan-2-on za přítomnosti řetězovacího iniciátoru jako je hydroxypolykarboxylová kyselina. Ještě další způsob zahrnuje reakci organické polykarboxylové kyseliny s předem připraveným polyesterem, což je popsáno v US patentu č. 5 612 052, jehož obsah je zde zahrnut v odkazech.

Zapouzdření navázané mikročástice lze dosáhnout fázovou separací emulze. Alternativní zapouzdřovací způsob vyžaduje použití ultrazvukového rozprašovače, kde se disperze navázaných mikročástic v roztoku absorbovatelného zapouzdřovacího polymeru vnese ve formě mikrokapiček do ochlazeného prostředí, v němž se nerozpouští. Navázané mikročástice se zapouzdří absorbovatelným zapouzdřovacím kopolymerem laktidu a glykolidu pomocí tradičního mikroopouzďření nebo potahovacích technik pevných částic jako je emulzní odpařovací způsob, který popsali H. Demian a S.W. Shalaby pro zapouzdřování mikročástic síranu barnatého, jak je popsáno v US patentové přihlášce USSN 08/467 361, jejíž obsah je zde zahrnut v odkazech nebo koagulací pevných mikročástic zapouzdřených v roztoku polymeru a dopravených ultrazvukovým rozprašovačem (zmlžovačem) do kapalného prostředí, které není rozpouštědlem zapouzdřovacího polymeru, ale kde toto kapalně prostředí je schopné extrakce rozpouštědla roztoku zapouzdřovacího polymeru kolem zapouzdřených pevných mikročástic. V závislosti na koncentraci roztoku polymeru pro zapouzdření mikročástic se může různit počet původních navázaných mikročástic v zapouzdřených mikročásticích, a to od 1 do několika set, se středním průměrem zapouzdřené mikročástice 0,5 až 100 μm .

Následující způsob se vztahuje ke zmlžovací výrobě zapouzdřených kationtových měničů s navázaným peptidem a/nebo proteinem (dále s navázaným peptidem). Konkrétní zapouzdřovací kopolymer se rozpustí v rozpouštědle jako je buď acetonitril, ethylacetát nebo ethylformiát, na koncentraci 10 až 30 hmotn. %. Pro dispergování kationtového měniče s navázaným peptidem se použije dostatečné množství tohoto roztoku tak, že hmotnostní poměr kationtového měniče s navázaným peptidem k zapouzdřovacímu kopolymeru je 30:70 až 80:20. Dispergování je dosaženo vysokorychlostní homogenizací. Disperze je přiváděna průtokovou rychlostí 1 až 10 ml/min do ultrazvukové rozprašovací trysky při různé frekvenci - tato frekvence se může měnit od 12 do 35 kHz - vyšší frekvence umožňuje vyšší průtokové rychlosti při zachování charakteristik částice. Disperze je poté zmlžena do sběrné nádoby s 1 až 10 násobným nadbytkem isopropanolu nebo ethanolu (ve srovnání s objemem použitého rozpouštědla zapouzdřovacího kopolymeru) obsahujícího dostatek pelětek suchého ledu (obvykle 0,5 až 1 kg na litr isopropanolu) tak, že teplota kaše zůstane během zmlžování mezi -70 až -80 °C. Tato kaše se v závislosti na jejím objemu míchá při 300 až 700 otáčkách za minutu. V případě acetonitrilu jako rozpouštědla zmlžené kapičky okamžitě při styku s kaší zmrznou. Když je zmlžování ukončeno, veškerá disperze se před filtrací za sníženého tlaku ponechá samovolně roztát na teplotu mezi 10 °C a laboratorní teplotou. Filtrační koláče se promyjí deionizovanou vodou, aby se odstranil nadbytek rozpouštědla, které polymer nerozpouští. Získané částice mají v případě převážně D,L-laktidového zapouzdřovacího kopolymeru vzhled hladkých mikrokuliček, jestliže je zapouzdřovací polymer odvozen převážně od L-laktidu, vypadají slabě zvrásněné.

Vazebná kapacita mikročasticového iontoměníče může být určena následujícím způsobem. Například pro mikročastici vyměňující kationty se

dostupné karboxylové skupiny v předem určené hmotnosti mikročastic neutralizují pomocí studeného zředěného vodného roztoku uhličitanu sodného o známé normalitě. Zneutralizované mikročastice se filtrací oddělí a důkladně promyjí studenou deionizovanou vodou a poté vysuší na vzduchu. Pevné mikročastice se poté inkubují ve zředěném roztoku hydrochloridu pilokarpinu o známé koncentraci tak, aby vznikl malý nadbytek zásaditého léčiva nad tím, které je předpokládáno z údajů vazebné kapacity. Koncentrace zbývajících hydrochloridu pilokarpinu ve vodném prostředí se sleduje po takovou časovou periodu, dokud může být zaznamenávána významná změna v odběru zásady mikročasticí. Procento imobilizované zásady na mikročasticích se stanoví z údajů o vyčerpávání a poté se ověří elementární analýzou na dusík.

Vazebná kapacita aniontového měniče (amidovaných mikročastic) se stanoví 1) elementární analýzou na dusík a 2) pomocí HPLC z obsahu navázání naproxenu měřením obsahu naproxenu vychyteného ze zředěného roztoku. Výsledky druhého způsobu se potvrdí úvolněním imobilizovaného naproxenu zředěným roztokem hydroxidu sodného o známé koncentraci.

Navázané mikročastice nebo zapouzdřené mikročastice tohoto vynálezu mohou být podávány pacientovi pomocí způsobů podávání, které jsou dobře známy těm, kteří mají běžné zkušenosti v oboru, jako je parenterální podávání, perorální podávání nebo místní podávání. S výhodou se podává jako prášek nebo suspenze pomocí nosní cesty nebo jako inhalační činidlo plicním systémem. Když se podává parenterálně, je zvýhodněné, když se podává jako disperze v isotonickém vodném prostředí nebo nevodném, absorbovatelném, kapalném polyesteru tvořícím gel, jak je popsáno v US patentu č. 5 612 052, jehož obsah je zde zahrnut v odkazech. Přípravky obsahující navázané mikročastice a/nebo zapouzdřené mikročastice předloženého vynálezu mohou také obsahovat množství volitelných složek. Tyto složky zahrnují, ale nejsou limitovány na

tenzidy, činidla určující viskozitu, léčivá činidla, modulátory růstu buněk, barviva, komplexační činidla, antioxidanty, jiné polymery jako je karboxymethylcelulosa, gumy jako je guarová guma, vosky/oleje jako je ricínový olej, glycerol, dibutylftalát a di(2-ethylhexyl)ftalát, stejně jako mnohé další. Jsou-li použity, tvoří tyto volitelné složky 0,1 až 20 %, s výhodou 0,5 až 5 % z celého přípravku.

Efektivní dávkování navázaných mikročástic nebo zapouzdřených mikročástic, které jsou podávány pacientovi, může být určeno ošetřujícím lékařem nebo veterinářem a bude záviset na předpokládaných správných dávkováních peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů) a množství peptidu (peptidů) a/nebo proteinu (proteinů) imobilizovaných na mikročásticích. Toto dávkování je buď známo nebo může být určeno osobou, která má v oboru běžné zkušenosti.

Výroba látek, které tvoří gely, je popsána v US patentu č. 5 612 052, jehož obsah je zde zahrnut v odkazech. Konkrétní příklady látek, které tvoří gely, jsou uvedeny níže.

Výroba blokových kopolymerů (80 : 20 hmotn. %), které tvoří trimethylenkarbonat/glykolid (60 : 40 hmotn. %) a polyethylenglykol-400 (GF-1): Plamenem vysušený pryžový kotlík vybavený mechanickým mícháním a vstupem pro dusík se naplnil polyethylenglykolem-400 (0,299 mol, 119,5 g), 2-ethylhexanoatem cínatým (0,2 M v toluenu), 4,700 ml, 0,946 mmol), glykolidem (1,78 mol, 206,5 g) a trimethylenkarbonatem (2,65 mol, 270 g). Reaktor byl několikrát probublán argonem a poté byl obsah zahřát k tavení a poté zahříván a míchán při 150 °C po 12 hodin. Na konce reakce se teplota při udržování tekutosti snížila a nadbytek monomeru se za sníženého tlaku odstranil. Výsledné složení polymeru bylo analyzováno infračervenou spektroskopií a pomocí NMR a molekulová hmotnost byla analyzována gelovou permeační chromatografií.

Výroba blokového kopolymery (15 : 85 hmot. %), který tvoří trimethylenkarbonat/glykolid (60 : 40 hmot. %) a polyethylenglykol-400 (GF-2): Uvedený kopolymer byl syntetizován podle postupu popsaneho pro GF-1, ale při použití polyethylenglykolu-400 (1,063 mol, 425 g), 2-ethylhexanoatu cínateho (0,2 M v toluenu, 1,760 ml, 0,35 mmol), glykolidu (0,279 mol, 32,4 g) a trimethylenkarbonatu (0,418 mol, 42,6 g) a za míchání 9 hodin.

Výroba blokového kopolymery (80 : 20 hmot. %), který tvoří trimethylenkarbonat/glykolid (90 : 10 hmot. %) a polyethylenglykol-1500 (GF-3): Uvedený kopolymer byl syntetizován podle postupu popsaneho pro GF-1, ale při použití polyethylenglykolu-1500 (0,267 mol, 400 g), 2-ethylhexanoatu cínateho (0,2 M v toluenu, 1,200 ml, 0,247 mmol), glykolidu (0,097 mol, 11,2 g) a trimethylenkarbonatu (0,87 mol, 88,7 g) a za míchání 13 hodin.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Výroba, rozmělnění a přečištění polymerů poly(glykolové kyseliny) iniciovaných citronovou kyselinou (PGCA) pro použití jako kationtových měničů (CE)

Příklad 1a)

7 : 1 PGCA

Skleněný reaktor o obsahu 500 ml byl naplněn 242,63 g glykolidu (Purac Biochem, Arkelsedijk, Holandsko) a 57,37 g citronové kyseliny (Aldrich, Gillingham, Dorset, Velká Británie). Citronová kyselina byla dále sušena silikagelem (Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, Velká Británie) v

zařízení Abderhalden (Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Reaktor byl ponořen do olejové lázně při 40 °C a udržován po 30 minut za sníženého tlaku (4 Pa (0,04 mbar)). Lázeň byla poté snížena a její teplota zvýšena na 110 °C. Když bylo dosaženo této teploty, reaktor byl umístěn do atmosféry dusíku neobsahujícího kyslík a znovu ponořen do lázně. Obsah byl míchán při 100 otáčkách za minutu pomocí míchačky Heidolph (Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Německo). Když obsah reaktoru roztál, přidalo se 1,09 ml roztoku 0,1 M 2-ethylhexanoatu cínatého (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) v toluenu (Riedel de-Haen, Seelze, Německo) (ve stechiometrickém poměru 50 ppm). Poté byl znovu použit po 30 sekund snížený tlak s pastí s kapalným dusíkem k odstranění toluenu, bez významného úbytku monomeru. Teplota olejové lázně byla poté na 5 minut zvýšena na 120 °C, před jejím dalším zvýšením na 150 °C. Při této teplotě se reaktor udržoval 4 hodiny, za konstantního mechanického míchání 100 otáček za minutu. Tak byl získán tento titulní polymer.

Příklad 1b

10 : 1 PGCA

Titulní polymer byl získán podle postupu příkladu 1a), ale použitím 257,40 g glykolidu, 42,60 g citronové kyseliny a 1,10 ml roztoku 0,1 M 2-ethylhexanoatu cínatého v toluenu (stechiometrický poměr 50 ppm).

Příklad 1c

15 : 1 PGCA - 15 : 1 PGCA

Plamenem vysušený pryžový kotlík vybavený mechanickým mícháním a vstupem pro argon se naplnil glykolidem (2,586 mol, 300 g), bezvodou citronovou kyselinou (0,172 mol, 33 g), 2-ethylhexanoatem cínatým (0,2 M v toluenu, 0,862 ml, 0,172 mmol). Polymerizační reaktor a jeho obsah byl několikrát probublán suchým argonem. Po roztátí polymerizační náplně byly reaktanty zahřívány a míchány při 160 °C, dokud se polymer nezačal vylučovat z

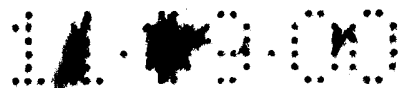
taveniny. Krátce po částečném vyloučení bylo ukončeno míchání a v reakci se pokračovalo při 160 °C po 2 hodiny. Na konci polymerizace byla teplota snížena na 120 °C a nadbytek monomeru byl odstraněn za sníženého tlaku. Složení izolovaného polymeru bylo ověřeno pomocí infračervené spektroskopie a NMR spektroskopie.

Rozmělnění

Každý z polymerů příkladů 1a), 1b) a 1c) byl nejdříve rozemlet nožovým mlýnkem (IKA, Staufen, Německo). Poté byly rozmělněny v zařízení Aljet Micronizer (Fluid Energy Aljet, Plumsteadville, Pennsylvania, USA) pomocí stlačeného proudu suchého dusíku. Polymer z příkladu 1a) měl střední velikost průměru částic 24,84 μm , a to podle analýzy v zařízení Malvern Mastersizer/E (Malvern, Worcs., Velká Británie) pomocí objemového distribučního modelu a silikonového oleje 200/5 cS (Dow Corning, Seneffe, Belgie) jako dispergačního činidla. Po rozmělnění měly polymery z příkladů 1b) a 1c) v uvedeném pořadí střední velikosti průměru částic 4,69 μm a 6,31 μm .

Přečištění/Tvorba sodné soli

Dávky 50 g polymerů z příkladů 1a), 1b) a 1c) byly dispergovány ve 2 l acetonu (Riedel de-Haen, Seelze, Německo) a na 30 minut umístěny do ultrazvukového zařízení (Branson Ultrasonics BV, Soest, Holandsko). Během této doby byla disperze také homogenizována při 9500 otáčkách za minutu pomocí homogenizátoru Ultra-turrax T25 (IKA, Staufen, Německo). Po tomto kroku působení ultrazvukem/homogenizace byla disperze odstředěna při 5000 otáčkách za minutu v odstředivce Sorvall (Sorvall, Wilmington, Delaware, USA). Supernatant byl odstraněn a koláče z centrifugy byly znovu suspendovány v čerstvém acetonu a byl opakován krok působení ultrazvukem/homogenizace. Když bylo druhé odstředování ukončeno, odstranil se supernatant a koláče byly znovu suspendovány v deionizované vodě. Poté se provedl konečný krok



působení ultrazvukem/homogenizace, aby se odstranil veškerý zbývající aceton a disperze byla opět odstředována 30 minut při 5000 otáčkách za minutu.

Koláče z centrifugy byly znovu suspendovány v čerstvé deionizované vodě a bylo sledováno pH disperze. Ve všech případech se přidaly dostatečné objemy roztoku 0,2 M uhličitanu sodného (za míchání), aby se pH zvýšilo na hodnotu 8 až 9. Disperze byly ponechány 30 minut za míchání před tím, než byly za sníženého tlaku přefiltrovány přes filtrační papír Whatman č. 1 (průměr 24 cm) (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, Kent, Velká Británie). Filtrační koláče byly promyty další deionizovanou vodou, zmrazeny a lyofilizovány v lyofilizačním zařízení Edwards SuperModulyo Lyophilizer (Edwards, Crawley, West Sussex, Velká Británie).

Přečištění bylo sledováno diferenční skenovací kalorimetrií (DSC) pomocí TA DSC912S (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA) s rychlostí zahřívání 10 °C/min. Získané DSC termogramy nevykazovaly v žádném případě žádný endotermický pík monomerního glykolidu, ale vykazovaly endotermní signály při 176 °C, 178 °C a 180 °C, a to v uvedeném pořadí pro příklady 1a), 1b) a 1c).

Příklad 2

Výroba mikročasticového kationtového měniče kopolymeru glykolidu a jablečné kyseliny, PGMA

Titulní mikročástice byla syntetizována podle způsobu popsaného v příkladu 1c), ale při použití glykolidu (2,586 mol, 300 g), bezvodé jablečné kyseliny (0,172 mol, 23 g) a 2-ethylhexanoatu cínatého (0,2 M v toluenu, 0,862

ml, 0,172 mmol). Pro určení teploty tání polymeru byla použita diferenční skenovací kalorimetrie ($T_{\text{tání}} = 206\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Pevný polymer byl rozmělněn pomocí mlýnku Wiley, aby se získal střední průměr částice 125 μm . Dalšího snížení velikosti částice na průměr 5 až 10 μm bylo dosaženo pomocí tryskového mletí se stlačeným suchým dusíkem. Výsledné mikročástice byly promyty acetonem, aby se odstranily stopy monomeru a nízkomolekulárních oligomerů. Produkt se poté do jeho použití sušil za sníženého tlaku při 40 $^{\circ}\text{C}$. Střední průměr suché mikročástice byl stanoven pomocí analyzátoru velikosti částic.

Příklad 3

Výroba, rozmělnění a přečištění polymeru poly(glykolové kyseliny) iniciovaného vinnou kyselinou (PGTA) pro použití jako kationtového měniče (CE)

Příklad 3a)

10 : 1 PGTA

Skleněný reaktor o obsahu 500 ml byl naplněn 264,65 g glykolidu (Purac Biochem, Arkelsedijk, Holandsko) a 34,22 g L-vinné kyseliny (Riedel de-Haen, Seelze, Německo). Vinná kyselina se dále sušila nad silikagelem (Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, Velká Británie) v zařízení Abderhalden (Aldrich, St. Louis, MO). Reaktor byl ponořen do olejové lázně při 40 $^{\circ}\text{C}$ a udržován po 30 minut za sníženého tlaku (4 Pa (0,04 mbar)). Lázeň byla poté snížena a její teplota zvýšena na 110 $^{\circ}\text{C}$. Když bylo dosaženo této teploty, reaktor byl umístěn do atmosféry dusíku neobsahujícího kyslík a znovu ponořen do lázně. Obsah byl míchán při 100 otáčkách za minutu pomocí míchačky

Heidolph (Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Německo). Když obsah reaktoru roztál, přidalo se 1,14 ml roztoku 0,1 M 2-ethylhexanoatu cínatého (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) v toluenu (Riedel de-Haen, Seelze, Německo) (ve stechiometrickém poměru 50 ppm). Poté byl znovu použit po 30 sekund snížený tlak s pastí s kapalným dusíkem k odstranění toluenu, bez významného úbytku monomeru. Teplota olejové lázně byla poté na 5 minut zvýšena na 120 °C, před jejím dalším zvýšením na 150 °C. Při této teplotě se reaktor udržoval 4 hodiny, za konstantního mechanického míchání 100 otáček za minutu. Tak byl získán tento titulní polymer.

Rozmělnění

Polymer příklad 3a) byl nejprve rozemlet pomocí nožového mlýnku (IKA, Staufen, Německo). Poté byl rozmělněn v zařízení Aljet Micronizer (Fluid Energy Aljet, Plumsteadville, Pennsylvania, USA) pomocí stlačeného proudu suchého dusíku. Polymer měl střední průměr částice 12,42 µm, a to podle analýzy v zařízení Malvern Mastersizer/E (Malvern, Worcs., Velká Británie) pomocí objemového distribučního modelu a silikonového oleje 200/5 cS (Dow Corning, Seneffe, Belgie) jako dispergačního činidla.

Přečištění/Tvorba sodné soli

Dávka 50 g polymeru z příkladu 3a) byla dispergována ve 2 l acetonu (Riedel de-Haen) a na 30 minut umístěna do ultrazvukového zařízení (Branson Ultrasonics BV, Soest, Holandsko). Během této doby byla disperze také homogenizována při 9500 otáčkách za minutu pomocí homogenizátoru Ultraturrax T25 (IKA, Staufen, Německo). Po tomto kroku působení ultrazvukem/homogenizace byla disperze odstředována 30 minut při 5000 otáčkách za minutu v odstředivce Sorvall (Sorvall, Wilmington, Delaware, USA). Supernatant byl odstraněn a koláče z centrifugy byly znovu suspendovány v čerstvém acetonu a byl opakován krok působení ultrazvukem/homogenizace.

Když bylo druhé odstředování ukončeno, odstranil se supernatant a koláče byly znovu suspendovány v deionizované vodě. Poté se provedl konečný krok působení ultrazvukem/homogenizace, aby se odstranil veškerý zbývající aceton a disperze byla opět odstředována 30 minut při 5000 otáčkách za minutu.

Koláče z centrifugy byly znovu suspendovány v čerstvé deionizované vodě a bylo sledováno pH disperze. Přidal se dostatečný objem 0,2 M roztoku uhličitanu sodného, aby se pH zvýšilo na hodnotu 8 až 9. Disperze byla ponechána 30 minut za míchání před tím, než byla za sníženého tlaku přefiltrována přes filtrační papír Whatman č. 1 (průměr 24 cm) (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, Kent, Velká Británie). Filtrační koláč byl promyt další deionizovanou vodou, zmrazen a lyofilizován v lyofilizačním zařízení Edwards SuperModulyo Lyophilizer (Edwards, Crawley, West Sussex, Velká Británie).

Přečištění bylo sledováno DSC pomocí TA DSC912S (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA) s rychlostí zahřívání 10 °C/min. Získaný DSC termogram nevykazoval žádný endotermický pík monomerního glykolidu, ale vykazoval endotermní signál při 181 °C.

Příklad 3b)

15 : 1 PGTA

Titulní polymer byl syntetizován podle postupu popsaného pro příklad 1c), ale s použitím glykolidu (2,586 mol, 300 g), bezvodé vinné kyseliny (0,172 mol, 26,8 g) a 2-ethylhexanoatu cínatého (0,2 M v toluenu, 0,862 ml, 0,0172 mmol). Pro určení teploty tání polymeru ($T_{\text{tání}} = 204 \text{ °C}$) byla použita diferenční skenovací kalorimetrie.

Pevný polymer byl rozemlet pomocí mlýnku Wiley, aby se získal střední průměr částice 125 µm. Dalšího snížení velikosti částice na průměr 5 až 10 µm bylo dosaženo pomocí tryskového mletí se stlačeným suchým dusíkem.

Výsledné mikročástice byly promyty acetonem, aby se odstranily stopová

množství monomeru a nízkomolekulárních oligomerů. Produkt se poté do jeho použití sušil za sníženého tlaku při 40 °C. Střední průměr suché mikročástice byl stanoven pomocí analyzátoru velikosti částic.

Příklad 4

Výroba mikročásticového aniontového měniče (AE-1) na bázi polyglykolidu

Výroby aniontového měniče se dosáhne ve dvou krocích. Nejprve se vyrobí nízkomolekulární polyglykolid pomocí podobného postupu jako v příkladě 1c), ale při použití následující polymerizační vsádky: glykolid (1 mol, 116 g), 1,3-propandiol jako iniciátor (30 mmol, 2,22 g) a 2-ethylhexanoat cínatý (0,03 mmol). Poté se provede zmenšení velikosti částic a přečištění polymeru, jak je také popsáno v příkladu 1c). V druhém kroku se prakticky neiontové mikročástice inkubují pod argonem v horkém zředěném roztoku (~ 80 °C) diaminu, například hexandiaminu známé koncentrace v dioxanu. Koncentrace diaminu v dioxanu se stanoví acidimetrií. Když je reakce prakticky ukončena, amidované mikročástice se oddělí filtrací, promyjí dioxanem a vysuší za sníženého tlaku. Vazebná kapacita aniontového měniče (amidovaných částic) se stanoví 1) elementární analýzou na dusík a 2) pomocí HPLC z obsahu navázání naproxenu měřením obsahu naproxenu vychytaného ze zředěného roztoku. Výsledky druhého způsobu se potvrdí uvolněním imobilizovaného naproxenu zředěným roztokem hydroxidu sodného o známé koncentraci.

Příklad 5

Výroba kopolymerů poly(laktid-co-glykolid) iniciovaných propandiolem (PLGPD) pro užití jako zapouzdřovacích materiálů

Příklad 5a)

75 : 25 P(L)LGPD

Skleněný reaktor o obsahu 500 ml byl naplněn 235,01 g L-laktidu (Purac Biochem, Arkelsedijk, Holandsko), 63,09 g glykolidu (Purac Biochem, Arkelsedijk, Holandsko) a 1,90 g propandiolu (Riedel de-Haen, Seelze, Německo) a poté se přidalo 3,96 ml 0,1 M roztoku 2-ethylhexanoatu (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) v toluenu (Riedel de-Haen, Seelze, Německo) (stechiometrický poměr 200ppm). Po jednohodinovém sušení za sníženého tlaku, aby se odstranil toluen, se reaktor umístil do atmosféry dusíku neobsahujícího kyslík a ponořil se do olejové lázně přehřáté na 160 °C. Obsah reaktoru byl míchán při 100 otáčkách za minutu pomocí míchačky Heidolph (Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Německo). Když obsah reaktoru roztál, teplota se zvýšila na 180 °C a byla na této úrovni udržována 3 hodiny. Získal se amorfni kopolymer. Pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) s čerpadlem Waters 510 Pump, diferenčním refraktometrem Waters 410 (Waters, Milford, Massachusetts, USA) s detekcí rozptýleného světla detektorem Wyatt Minidawn Light Scattering Detector (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California, USA) bylo zjištěno, že kopolymer má molekulovou hmotnost (MW) 12 500 g/mol.

Příklad 5b

90 : 10 P(L)LGPD

Titulní výrobek byl syntetizován podle postupu příkladu 5a), ale použitím 274,31 g L-laktidu, 24,55 g glykolidu, 1,14 g propandiolu a 3,89 ml 0,1 M roztoku 2-ethylhexanoatu v toluenu (stechiometrický poměr 200 ppm). Byl získán krystalický kopolymer. Pomocí GPC bylo zjištěno, že kopolymer má molekulovou hmotnost 20 780 g/mol.

Příklad 5c)

90 : 10 P(D,L)LGPD

Titulní produkt byl získán podle postupu příkladu 5a), ale použitím 274,31 g D,L-laktidu, 24,55 g glykolidu, 1,14 g propandiolu a 3,86 ml 0,1 M roztoku 2-ethylhexanoatu v toluenu (stechiometrický poměr 200 ppm). Byl získán amorfni kopolymer. Pomocí GPC bylo zjištěno, že kopolymer má molekulovou hmotnost 20 650 g/mol.

Příklad 5d)

Kopolymer poly(L-laktid-co-D,L-laktid) iniciovaný propandiolem (PLGPD) pro užití jako potahovací materiál, 80 : 20 P(L)L(D,L)LPD

Titulní výrobek byl získán podle postupu příkladu 5a), ale použitím 239,09 g L-laktidu, 59,77 g D,L-laktidu (Purac Biochem, Arkelsedijk, Holandsko a 1,14 g propandiolu a bylo přidáno 3,96 ml 0,1 M roztoku 2-ethylhexanoatu v toluenu (stechiometrický poměr 200 ppm). Byl získán amorfni kopolymer. Pomocí GPC bylo zjištěno, že kopolymer má molekulovou hmotnost (MW) 22 320 g/mol. Podle DSC vykazoval skelný přechod při 48 °C.

Přečištění

Polymery z příkladů 5a), 5b) a 5c) byly všechny promyty zmlžením 30 hmotn. % roztoku v acetonitrilu (Labscan, Dublin, Irsko) při 8 ml/min do deionizované vody ochlazené na 2 °C v 6 l opláštěvaném reaktoru připojenému na cirkulační lázeň a za míchání při 350 otáčkách za minutu míchačkou Heidolph (Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Německo). Roztoky byly naplněny do tryskového zařízení Vibra-Cell VC 50 Atomization (Bioblock, Illkirch, Francie) pomocí pumpy Masterflex (Cole Parmer Instrument Co., Niles, Illinois, USA) a zmlžení bylo dosaženo použitím ultrazvukové frekvence 12 kHz. Získané disperze byly zfiltrány přes filtrační papíry Whatman č. 1 (průměr 24 cm) (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, Kent, Velká Británie) a filtrační

koláče byly promyty deionizovanou vodou, zmrazeny a lyofilizovány v lyofilizačním zařízení Edwards SuperModulyo Lyophilizer (Edwards, Crawley, West Sussex, Velká Británie).

Čistota byla potvrzena pomocí DSC s TA DSC912S (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA) s rychlostí zahřívání 10 °C/min, která ukazovala v uvedeném pořadí skelné přechody (T_g) při 44 °C, 49 °C, 45 °C a 48 °C pro polymery z příkladů 5a), 5b), 5c) a 5d).

Příklad 6

Výroba kationtového měniče s navázaným peptidem

Příklad 6a)

Navazování peptidu A (p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, analogu LHRH)

Čtyři gramy každé ze sodných solí příkladů 1a), 1b), 1c) a 2a) byly dispergovány v roztocích obsahujících 1,33 g volné báze peptidu A (Kinerton Ltd., Dublin, Irsko) rozpuštěného v 70 ml deionizované vody. Disperze byly inkubovány za míchání při laboratorní teplotě po 2 hodiny před tím, než byly zfiltrány přes filtrační papír Whatman č. 1 (Whatman Intl., Maidstone, Kent, Velká Británie) o průměru 9 cm. Filtrační koláče byly promyty další deionizovanou vodou, zmrazeny a lyofilizovány v zařízení Edwards SuperModulyo (Edwards, Crawley, West Sussex, Velká Británie). Poté byly vzorky analyzovány elementární analýzou na dusík pro stanovení množství navázaného peptidu A. Byly získány následující výsledky.

Příklad	CE Příklad -#	CE Polymer	Hmotn. % navázaného peptidu A
6a) 1)	1a)	7 : 1 PGCA	24,52 %

6a) 2)	1b)	10 : 1 PGCA	12,60 %
6a) 3)	1c)	15 : 1 PGCA	19,29 %
6a) 4)	3a)	10 : 1 PGTA	17,60 %

Příklad 6b)

Navazování peptidu B ($\text{H}-\beta\text{-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH}_2$, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou, analog somatostatinu)

Podle postupu příkladu 6b) a použitím 4 g každé ze sodných solí příkladů 1a), 1b), 1c) a 2a) a 1,33 g volné báze peptidu B (Kinerton Ltd., Dublin, Irsko) byly získány navázané mikročástice příkladů 1a), 1b) a 1c) byly získány navázané mikročástice příkladů 1a), 1b) a 1c) s na nich imobilizovaným peptidem B. Pro stanovení množství navázaného peptidu B byly vzorky analyzovány elementární analýzou na obsah dusíku. Získané výsledky jsou uvedeny níže.

Příklad	CE Příklad -#	CE Polymer	Hmotn. % navázaného peptidu B
6b) 1)	1a)	7 : 1 PGCA	25,20 %
6b) 2)	1b)	10 : 1 PGCA	13,10 %
6b) 3)	1c)	15 : 1 PGCA	19,64 %
6b) 4)	3a)	10 : 1 PGTA	14,23 %

Příklad 7

Zmlžovací výroba zapouzdřených kationtových měničů s navázaným polypeptidem

Kationtové měniče s navázaným polypeptidem byly dispergovány v acetonitrilových (Labscan, Dublin, Irsko) roztocích zapouzdřovacích kopolymerů, jak je uvedeno níže. Dispergování bylo dosaženo

homogenizováním 5 minut pomocí zařízení Ultra-turrax T25 (IKA, Staufen Německo) při 9500 otáčkách za minutu. Koncentrace zapouzdřovacích roztoků kopolymer/acetonitril byla v rozmezí 12,5 až 25 hmotn. % a hmotnostní poměr zapouzdřovacího kopolymeru ke kationtovému měniči s navázaným polypeptidem byl 1 : 1 až 1,3 : 1.

Po dispergování bylo disperzí naplněno atomizační tryskové zařízení Vibra-Cell VC50 (Bioblock, Illkirch, Francie) se zvukovou frekvencí 16 kHz pomocí keramické pístové pumpy (FMI, Oyster Bay, New York, USA) při průtokové rychlosti 2 ml/min. Po dosažení trysky byla disperze zmlžena do isopropylalkoholu (IPA) (Labscan, Dublin, Irsko) ochlazenému přidáním peletů suchého ledu (A.I.G., Dublin, Irsko) na -80 °C. IPA působil jako sběrné rozpouštědlo, v němž se disperze nerozpouští a byl míchán míchačkou Heidolph (Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Německo) při 300 otáčkách za minutu. Když bylo ukončeno zmlžování, veškerá disperze byla ponechána ohřát na teplotu 10 °C až laboratorní teplotu. Zapouzdřené mikročástice byly poté znovu získány filtrací za sníženého tlaku přes filtrační papír Whatman č. 1 (Whatman Intl. Ltd, Maidstone, Kent, Velká Británie). Filtrační koláč byl promyt deionizovanou vodou, zmrazen a lyofilizován v lyofilizačním zařízení Edwards SuperModulyo (Edwards, Crawley, West Sussex, Velká Británie). Velikost výsledných zapouzdřených mikročástic byla analyzována použitím zařízení Malvern Mastersizer/E (Malvern, Worcs., Velká Británie) a s 1% Tween 20 ve vodě jako dispergačním činidlem. Pro stanovení obsahu peptidu byly zapouzdřené mikročástice také analyzovány na obsah dusíku elementární analýzou.

Níže uvedená tabulka reprezentuje různé provedené zapouzdřovací experimenty

Př. #	CE s navázaným peptidem, Př - #	Zapouzdřovací kopolymer Př-#	Hmotn. koncentrace zapouzdřovacího	Zapouzdřovací kopolymer : CE s naváza-	Střední průměr částice	Hmotn. % navázání peptidu
-------	---------------------------------	------------------------------	------------------------------------	--	------------------------	---------------------------

			kopolyme -ru v acetonitri- lu	ným peptidem		
7a)	6a) 2)	5a)	24,31 %	1 : 1	122,14 μm	5,38 % peptidu A
7b)	6a) 2)	5b)	22,41 %	1 : 1	120,15 μm	6,38 % peptidu A
7c)	6a) 3)	5b)	12,5 %	1 : 1	79,30 μm	7,76 % peptidu A
7d)	6a) 3)	5c)	12,5 %	1 : 1	77,85 μm	8,93 % peptidu A
7e)	6a) 4)	5c)	14,95 %	1 : 1	136,74 μm	8,75 % peptidu A
7f)	6a) 1)	5c)	14,92 %	1,27 : 1	80,59 μm	10,31 % peptidu A
7g)	6b) 2)	5a)	25,37 %	1 : 1	140,58 μm	2,63 % peptidu B
7h)	6b) 2)	5b)	20 %	1,15 : 1	96,77 μm	5,98 % peptidu B
7i)	6b) 3)	5b)	12,5 %	1 : 1	102,56 μm	7,69 % peptidu B
7j)	6b) 3)	5c)	12,5 %	1 : 1	83,72 μm	7,90 % peptidu B
7k)	6b) 4)	5c)	14,95 %	1 : 1	135,14 μm	6,69 % peptidu B
7l)	6b) 1)	5c)	14,92 %	1,26 : 1	123,18 μm	10,11 % peptidu B

Všechny vzorky byly před testováním *in vivo* a/nebo *in vitro* přesáty přes 180 μm síto (Bioblock, Illkirch, Francie).

Navázaná mikročástice nebo zapouzdřená mikročástice může být následujícím způsobem testována *in vitro* pro zhodnocení rychlosti uvolňování navázaného peptidu nebo navázaného proteinu. Alikvotní část navázaných mikročástic nebo zapouzdřených mikročástic o hmotnosti 50 mg se umístí do systému s kontinuální průtokovou celou, kde protéká na pH 7,2 pufovaný a 37 °C teplý fosfátový roztok přes veškerou hmotnost navázaných mikročástic nebo zapouzdřených mikročástic, a to rychlostí 45 ml/hodinu. Vzorky pufru obsahující uvolněné léčivo se sbírají při 4 °C a analyzují na koncentrace peptidu nebo proteinu v 1 nebo 2 denních intervalech. Profil uvolňování každého druhu mikročástic se určuje v periodě 2 týdnů.

Navázaná mikročástice nebo zapouzdřená mikročástice může být následujícím způsobem testována *in vivo* pro zhodnocení rychlosti uvolňování navázaného peptidu nebo navázaného proteinu. Intramuskulární injekcí do stehna se podají vzorky samci krys Wistar (Bioresources, Trinity College, Dublin, Irsko). Suspenze se skládá z 3% karboxymethylcelulosity a 1% Tween ve fyziologickém roztoku. Pro vzorky s navázaným peptidem A je účinná ekvivalentní dávka 40 $\mu\text{g/kg/den}$. Dávka pro vzorky s navázaným peptidem B je 1 mg/kg/den. Vzorky se odebírají srdeční punkcí a hodnoty peptidu v plazmě se sledují pomocí radioimunoanalýzy (RIA) specifické pro peptid A a peptid B. V případě vzorků s navázaným peptidem A (peptid A je analogem LHRH) se také používá RIA testosteronu ke sledování snížení koncentrace testosteronu. Jako alternativa k prostředí suspenze mohou být v určitých případech použita prostředí tvořící gely. Výsledky jsou uvedeny níže v tabulkách A a B.

Tabulka A

Příklady s peptidem A	Dny s peptidem A (> 150 pg/ml)	Dny s testosteronem (< 1 ng/ml)
7a)	20	21
7b)	10	10
7c)	2	11
7d)	2	11
7e)	2	13
7f)	2	16
7a) v gelu	25	44

Tabulka B

Příklady s peptidem B	Dny s peptidem B (>1000 pg/ml)
7g)	netestováno
7h)	netestováno
7i)	netestováno
7j)	15
7k)	10
7l)	10

Příklad 8

Příklad 8a)

Zmlžování pomocí acetonitrilu jako rozpouštědla a isopropanolu o laboratorní teplotě jako rozpouštědla, v němž nedochází k rozpouštění

1,06 g kationtového měniče příkladu 1c) (nenavázaného na polypeptid) bylo dispergováno v roztoku 25,24 hmotn. % zapouzdřovacího kopolymeru příkladu 5a) v acetonitrilu (Labscan, Dublin, Irsko) tak, že hmotnostní poměr

kationtového měniče k zapouzdřovacímu kopolymeru byl 1,03:1. Dispergování bylo dosaženo homogenizací 5 min při 9500 otáčkách za minutu zařízením Ultra-turrax T25 (IKA, Staufen Německo).

Po dispergování bylo disperzí naplněno atomizační tryskové zařízení Vibra-Cell VC50 (Bioblock, Illkirch, Francie) se zvukovou frekvencí 16 kHz pomocí keramické pístové pumpy (FMI, Oyster Bay, New York, USA) při průtokové rychlosti 2 ml/min. Po dosažení trysky byla disperze zmlžena při laboratorní teplotě (17 až 22 °C) do IPA (Labscan, Dublin, Irsko). IPA fungoval jako sběrné prostředí, ve kterém se disperze nerozpouští a byl míchán pomocí míchačky Heidolph (Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Německo) při 300 otáčkách za minutu. Když bylo zmlžování ukončeno, disperze se ponechala míchat dalších 60 minut při laboratorní teplotě před tím, než se zapouzdřené částice opět získaly filtrací za sníženého tlaku přes filtrační papír Whatman č. 1 (Whatman Intl. Ltd, Maidstone, Kent, Velká Británie). Filtrační koláč byl promyt deionizovanou vodou, zmrazen a lyofilizován v lyofilizačním zařízení Edwards SuperModulyo (Edwards, Crawley, West Sussex, Velká Británie). Výsledné částice byly analyzovány na velikost částice pomocí zařízení Malvern Mastersizer/E (Malvern, Worcs., Velká Británie) a s 1% Tween 20 ve vodě jako dispergačním činidlem. Výsledné částice měly střední velikost částice ($d(0,5)$) 84,75 μm .

Příklad 8b)

Zmlžování pomocí ethylacetátu jako rozpouštědla a isopropanolu o laboratorní teplotě jako rozpouštědla, v němž nedochází k rozpouštění

Zmlžování bylo provedeno v podstatě podle postupu příkladu 8a), ale použitím 0,99 g kationtového měniče příkladu 1c) (nenavázaného na polypeptid) dispergovaného v roztoku 24,88 hmotn. % zapouzdřovacího polymeru příkladu 5a) v ethylacetátu (Riedel de-Haen, Seelze, Německo) tak, že hmotnostní poměr

kationtového měniče k zapouzdřovacímu kopolymeru byl 0,96:1. Výsledné částice měly střední velikost částice ($d(0,5)$) 100,56 μm .

Příklad 8c)

Zmlžování pomocí ethylacetátu jako rozpouštědla a sondy s vyšší frekvencí

1,02 g kationtového měniče příkladu 1c) (nenavázaného na polypeptid) bylo dispergováno v 15,14 hmotn. % roztoku zapouzdřovacího kopolymeru příkladu 5a) v ethylacetátu (Riedel de-Haen) tak, že hmotnostní poměr kationtového měniče k zapouzdřovacímu kopolymeru byl 1,05:1. Dispergace bylo dosaženo homogenizací 5 min při 9500 otáčkách za minutu zařízením Ultra-turrax T25 (IKA, Staufen Německo).

Po dispergaci byl disperzí naplněn zmlžovač Martin Walter 400 GSIP (Sodeva, Le Bouget du Lac, Francie) s nastavením ultrazvukové frekvence na 34,6 kHz pomocí keramické pístové pumpy (FMI, Oyster Bay, New York, USA) s průtokovou rychlostí 5 ml/minutu. Po dosažení trysky byly disperze zmlžena do IPA (Labscan, Dublin, Irsko) ochlazeného na $-77\text{ }^{\circ}\text{C}$ přidavkem peletek suchého ledu (A.I.G., Dublin, Irsko). Tento IPA fungoval jako sběrné prostředí, ve kterém nedochází k rozpouštění a byl míchán míchačkou Heidolph (Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Německo) při 300 otáčkách za minutu. Když bylo zmlžování ukončeno, pokryté mikročástice se opět získaly filtrací za sníženého tlaku přes filtrační papír Whatman č. 1 (Whatman Intl. Ltd, Maidstone, Kent, Velká Británie). Filtrační koláč byl promyt deionizovanou vodou, zmražen a lyofilizován v lyofilizačním zařízení Edwards SuperModulyo (Edwards, Crawley, West Sussex, Velká Británie). Výsledné částice byly analyzovány na velikost částice pomocí zařízení Malvern Mastersizer/E (Malvern, Worcs., Velká Británie) a s 1% Tween 20 ve vodě jako dispergačním činidlem. Výsledné částice měly střední velikost částice ($d(0,5)$) 95,69 μm .

Příklad 9

Navazování na kationtový měnič a následné zapouzdřování peptidů C a D, které jsou analogy somatostatinu

Příklad 9a)

Navazování peptidu C

1,01 g sodné soli z příkladu 1c) dispergované v roztoku obsahujícím 0,25 g volné báze peptidu C, který má strukturu N-hydroxyethylpiperazinyl-acetyl-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou (Kinerton Ltd., Dublin, Irsko), se rozpustilo ve 40 ml deionizované vody. Disperze byla inkubována za míchání 2 hodiny před zfiltrváním přes filtrační papír Whatman č. 1 (Whatman Intl., Maidstone, Kent, Velká Británie) o průměru 9 cm. Filtrační koláč byl promyt další deionizovanou vodou, zmražen a lyofilizován v zařízení Edwards SuperModulyo (Edwards, Crawley, West Sussex, Velká Británie). Vzorek byl poté odeslán k analýze na dusík ke stanovení množství navázaného peptidu, 20 21 %.

Příklad 9b)

Navazování peptidu D

Pomocí postupu příkladu 9a), ale užitím 2,04 g sodné soli z příkladu 1c), dispergované v roztoku obsahujícím 0,51 g volné báze peptidu D, který má strukturu N-hydroxyethylpiperazinyl-ethylsulfonyl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou (Kinerton Ltd., Dublin, Irsko), rozpuštěné v 80 ml deionizované vody. Vzorek byl poté odeslán k analýze na dusík ke stanovení množství navázaného peptidu, 19,53 %.

Příklad 10

Navázané mikročástice z příkladů 9a) a 9b) byly zapouzdřeny, jak bylo popsáno v příkladu 7, přičemž byly získány následující výsledky.

Př. č.	CE s navázaným peptidem	Potahovací kopolymer	Hmotn. % potahovacího kopolymeru v acetonitrilu	Potahovací kopolymer : CE s navázaným peptidem	Střední velikost částice (μm)	Hmotn. % navázaného peptidu
10a)	9a)	5c)	12,51 %	1 : 1	83,33	9,48 %
10b)	9b)	5c)	12,48 %	0,98 : 1	72,15	8,87 %
10c)	9b)	5d)	12,35 %	0,98 : 1	86,03	6,74 %

Příklad 11

Výroba přípravku tvořícího gel

Zapouzdřené mikročástice příkladu 7a) (0,3 g) byly smíchány s kapalnou látkou tvořící gel (2,0 ml směsi 50 : 50 složky A z příkladu 1 a složky C z příkladu 3, jež jsou obě popsány v US patentu č. 5 612 052, v 5ml plášti stříkačky pomocí mechanického mikromixéru při 20 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Látka tvořící gel byla předsterilizována suchým sáláním a míchání se provádělo pomocí sterilizovaného míchadla v digestoři s laminárním prouděním. Přípravek byl vytlačen z 5ml stříkačky (použitím pístu) do menší stříkačky, která se používá při podávání přípravku. Jednotnost přípravku byla kontrolována pomocí optické mikroskopie. Malé stříkačky byly uzpůsobeny pro skladování v suchém balení a udržovány do použití při 4 °C.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Navázaná mikročástice, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem a jeden nebo více peptidů, jeden nebo více proteinů nebo jejich kombinaci, imobilizované na uvedeném absorbovatelném polymerním jádře s heterogenním řetězcem,

kde každý peptid se nezávisle vybere ze skupiny sestávající z peptidu stimulujícího produkci růstového hormonu (GHRP), hormonu stimulujícího produkci luteinizačního hormonu (LHRH), somatostatinu, bombesinu, peptidu stimulujícího produkci gastrinu (GRP), kalcitoninu, bradykininu, galaninu, melanocyt stimulujícího hormonu (MSH), faktoru stimulujícího produkci růstového hormonu (GRF), amylinu, tachykininů, sekretinu, parathormonu (PTH), enkefalinu, endothelinu, peptidu stimulujícího produkci kalcitoninového genu (CGRP), neuromedinů, proteinu příbuznému parathormonu (PTHrP), glukagonu, neurotensinu, adrenokortikotropního hormonu (ACTH), peptidu YY (PYY), peptidu stimulujícího produkci glukagonu (GRP), vasoaktivního intestinálního peptidu (VIP), peptidu aktivujícího adenylátcyklasu hypofýzy (PACAP), motilinu, sloučeniny P, neuropeptidu Y (NPY), TSH a jejich analogů a fragmentů nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli a

kde každý protein se nezávisle vybere ze skupiny sestávající z růstového hormonu, erythropoietinu, faktoru stimulujícího kolonie granulocytů, faktoru stimulujícího kolonie granulocyt-makrofág a interferonů.

2. Navázaná mikročástice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený peptid, protein nebo jejich kombinace nebo jejich farmaceuticky přijatelná sůl tvoří 0,1 až 30 % z celkové hmotnosti navázané mikročástice.

3. Navázaná mikročástice podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem obsahuje glykolátové jednotky.

4. Navázaná mikročástice podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem dále obsahuje citrátové zbytky.

5. Navázaná mikročástice podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k citrátovým zbytkům je 7:1 až 20:1.

6. Navázaná mikročástice podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že absorbovatelné polymerní jádro dále obsahuje vínanové zbytky.

7. Navázaná mikročástice podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k vínanovým zbytkům je 7:1 až 20:1.

8. Navázaná mikročástice podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem dále obsahuje jablečnanové zbytky.

9. Navázaná mikročástice podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k jablečnanovým zbytkům je 7:1 až 20:1.

10. Navázaná mikročástice podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené glykolátové jednotky jsou zakončeny karboxylovou skupinou.

11. Navázaná mikročástice podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené glykolátové jednotky jsou zakončeny aminoskupinou.

12. Zapouzdřená mikročástice, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jednu nebo více navázaných mikročástic zapouzdřených v absorbovatelném zapouzdřovacím polymeru,

kde uvedenou navázanou mikročástici tvoří absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem a jeden nebo více peptidů, jeden nebo více proteinů nebo jejich kombinace, imobilizované na uvedeném absorbovatelném polymerním jádře s heterogenním řetězcem,

kde každý peptid se nezávisle vybere ze skupiny sestávající z peptidu stimulujícího produkci růstového hormonu (GHRP), hormonu stimulujícího produkci luteinizačního hormonu (LHRH), somatostatinu, bombesinu, peptidu stimulujícího produkci gastrinu (GRP), kalcitoninu, bradykininu, galaninu, melanocyt stimulujícího hormonu (MSH), faktoru stimulujícího produkci růstového hormonu (GRF), amylinu, tachykininů, sekretinu, parathormonu (PTH), enkefalinu, endothelinu, peptidu stimulujícího produkci kalcitoninového genu (CGRP), neuromedinů, proteinu příbuznému parathormonu (PTHrP), glukagonu, neurotensinu, adrenokortikotropního hormonu (ACTH), peptidu YY (PYY), peptidu stimulujícího produkci glukagonu (GRP), vasoaktivního intestinálního peptidu (VIP), peptidu aktivujícího adenylátcyklasu hypofýzy (PACAP), motilinu, sloučeniny P, neuropeptidu Y (NPY), TSH a jejich analogů a fragmentů nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli a

kde každý protein se nezávisle vybere ze skupiny sestávající z růstového hormonu, erythropoietinu, faktoru stimulujícího kolonie granulocytů, faktoru stimulujícího kolonie granulocyt-makrofág a interferonů a kde uvedené

absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem obsahuje glykolátové jednotky.

13. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený peptid, protein nebo jejich kombinace nebo jejich farmaceuticky přijatelná sůl tvoří 0,1 až 30 % z celkové hmotnosti navázané mikročástice a kde uvedené absorbovatelné polymerní jádro s heterogenním řetězcem dále obsahuje citrátové zbytky, vínanové zbytky nebo jablečnanové zbytky.

14. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k citrátovým zbytkům, vínanovým zbytkům nebo jablečnanovým zbytkům je 7:1 až 20:1 a uvedené glykolátové jednotky jsou zakončeny karboxylovou skupinou nebo aminoskupinou.

15. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený absorbovatelný zapouzdřovací polymer obsahuje

- a) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- b) jednotky odvozené od D,L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek,
- c) jednotky odvozené od D,L-laktidových jednotek nebo
- d) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a D,L-laktidových jednotek.

16. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10.

17. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od D,L-laktidu je 80:20.

18. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr jednotek odvozených od D,L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10.

19. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že absorbovatelný zapouzdřovací polymer tvoří 5 až 70 % z celkové hmotnosti zapouzdřené mikročástice.

20. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že absorbovatelný zapouzdřovací polymer tvoří 20 až 60 % z celkové hmotnosti zapouzdřené mikročástice.

21. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že absorbovatelný zapouzdřovací polymer tvoří 30 až 50 % z celkové hmotnosti zapouzdřené mikročástice.

22. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje navázané mikročástice podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelný nosič.

23. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje navázané mikročástice podle nároku 1, nevodný, absorbovatelný, kapalný polyester tvořící gel a výhodně farmaceuticky přijatelný nosič.

24. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje zapouzdřené mikročástice podle nároku 12 a farmaceuticky přijatelný nosič.

25. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje zapouzdřené mikročástice podle nároku 12, nevodný, absorbovatelný, kapalný polyester tvořící gel a výhodně farmaceuticky přijatelný nosič.

26. Navázaná mikročástice podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptidem je analog LHRH.

27. Navázaná mikročástice podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k citrátovým zbytkům absorbovatelného polymerního jádra s heterogenním řetězcem je 7:1 až 20:1 a kde analogem LHRH je p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

28. Navázaná mikročástice podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptidem je analog LHRH.

29. Navázaná mikročástice podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k vínanovým zbytkům je 7:1 až 20:1 a analogem LHRH je p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

30. Navázaná mikročástice podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptidem je analog somatostatinu.

31. Navázaná mikročástice podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k citrátovým zbytkům je 7:1 až 20:1 a analogem somatostatinu je H-β-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou, N-hydroxyethylpiperaziny-acetyl-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou nebo N-hydroxyethylpiperaziny-ethylsulfonyl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou.

32. Navázaná mikročástice podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptidem je analog somatostatinu.

33. Navázaná mikročástice podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k vlnanovým zbytkům je 7:1 až 20:1 a analogem somatostatinu je H-β-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou, N-hydroxyethylpiperaziny-acetyl-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou nebo N-hydroxyethylpiperaziny-ethylsulfonyl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou.

34. Zapouzdřená mikročástice, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jednu nebo více navázaných mikročástic podle nároku 26, zapouzdřených v absorbovatelném zapouzdřovacím polymeru, který obsahuje a) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek, b) jednotky odvozené od D,L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek, c) jednotky

odvozené od D,L-laktidových jednotek nebo d) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a D,L-laktidových jednotek.

35. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k citrátovým zbytkům absorbovatelného polymerního jádra je 7:1 až 20:1, analogem LHRH je p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ a kde poměr

a) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10,

b) jednotek odvozených od D,L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10 a

c) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od D,L-laktidu je 80:20.

36. Zapouzdřená mikročástice, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jednu nebo více navázaných mikročástic podle nároku 28, zapouzdřených v absorbovatelném zapouzdřovacím polymeru, který obsahuje a) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek, b) jednotky odvozené od D,L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek, c) jednotky odvozené od D,L-laktidových jednotek nebo d) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a D,L-laktidových jednotek.

37. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k vínanovým zbytkům absorbovatelného polymerního jádra je 7:1 až 20:1, analogem LHRH je p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ a kde poměr

- a) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10,
- b) jednotek odvozených od D,L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10 a
- c) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od D,L-laktidu je 80:20.

38. Zapouzdřená mikročástice, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jednu nebo více navázaných mikročástic podle nároku 30, zapouzdřených v absorbovatelném zapouzdřovacím polymeru, který obsahuje a) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek, b) jednotky odvozené od D,L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek, c) jednotky odvozené od D,L-laktidových jednotek nebo d) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a D,L-laktidových jednotek.

39. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 38, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k citrátovým zbytkům absorbovatelného polymerního jádra je 7:1 až 20:1, analogem somatostatinu je H- β -D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou, N-hydroxyethylpiperaziny-acetyl-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou nebo N-hydroxyethylpiperaziny-ethylsulfonyl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou a kde poměr

- a) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10,
- b) jednotek odvozených od D,L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10 a

c) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od D,L-laktidu je 80:20.

40. Zapouzdřená mikročástice, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jednu nebo více navázaných mikročástic podle nároku 32 a absorbovatelný zapouzdřovací polymer, který obsahuje

a) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek, b) jednotky odvozené od D,L-laktidových jednotek a glykolidových jednotek, c) jednotky odvozené od D,L-laktidových jednotek nebo d) jednotky odvozené od L-laktidových jednotek a D,L-laktidových jednotek.

41. Zapouzdřená mikročástice podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr glykolátových jednotek k vínanovým zbytkům absorbovatelného polymerního jádra je 7:1 až 20:1, analogem somatostatinu je H-β-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou, N-hydroxyethylpiperazinyl-acetyl-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou nebo N-hydroxyethylpiperazinyl-ethylsulfonyl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂, kde dva Cys zbytky jsou vázány disulfidovou vazbou a kde poměr

a) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10,

b) jednotek odvozených od D,L-laktidu k jednotkám odvozeným od glykolidu je 75:25 až 90:10 a

c) jednotek odvozených od L-laktidu k jednotkám odvozeným od D,L-laktidu je 80:20.

42. Způsob výroby zapouzdřené mikročástice podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok zapouzdření navázané mikročástice absorbovatelným zapouzdřovacím polymerem.

43. Způsob podle nároku 42, v y z n a č u j í c í s e t í m, že disperze uvedených navázaných mikročástic v roztoku obsahujícím uvedený absorbovatelný zapouzdřovací polymer a rozpouštědlo se nakápne do předchlazeného média, přičemž uvedené médium není rozpouštědlem uvedeného absorbovatelného zapouzdřovacího polymeru.

44. Způsob podle nároku 43, v y z n a č u j í c í s e t í m, že roztok absorbovatelného zapouzdřovacího polymeru sestává z 5 až 30 % absorbovatelného zapouzdřovacího polymeru, předchlazeným médiem je alkohol se dvěma nebo více uhlíkovými atomy a teplota média je laboratorní teplota až -80 °C.

45. Způsob podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m, že teplota předchlazeného média je -60 až -80 °C a médiem je isopropylalkohol.

46. Způsob výroby zapouzdřené mikročástice podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok zapouzdření navázané mikročástice absorbovatelným zapouzdřovacím polymerem pomocí emulzního způsobu.