



FI0000990848



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

99084

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 10 1997

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

A 61K 47/30, 38/00, 9/50

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	921248
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	23.03.92
(24) Alkupäivä - Löpdag	23.03.92
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	26.09.92
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.06.97
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
25.03.91 DE 4109746 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Hoechst Aktiengesellschaft, 6230 Frankfurt/Main 80, Germany, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Lill, Norbert, Drosselweg 5, 6230 Frankfurt/Main 80, Germany, (DE)
2. Sandow, Jürgen, Am Haideplacken 22, 6240 Königstein/Taunus 3, Germany, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä kestovaikutteisten biohajoavien mikrohiukkasten valmistamiseksi, jotka sisältävät vaikuttavana aineena terapeuttisesti vaikuttavaa peptidiä ja kantajamateriaalina PLGA:ta
Förfarande för framställning av långverkande, biologiskt netbrytbara mikropartiklar, vilka som aktiv substans innehåller en terapeutiskt verksamm peptid och som bärarmaterial PLGA

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää kestovaikutteisten biohajoavien mikrohiukkasten valmistamiseksi, jotka sisältävät vaikuttavana aineena terapeuttisesti vaikuttavaa peptidiä ja kantajamateriaalina PLGA:ta. Menetelmässä peptidi suspendoidaan tai liuotetaan kantajamateriaalin liuokseen tai peptidin vesipitoinen liuos emulgoidaan kantajamateriaalin liuokseen ja suspensio, liuos tai emulsio suihkutetaan alle 60 °C:n lämpötilassa suihkuvirtauksessa, joka on yli 500 NL/h (1 NL = 22,415 litraa).

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av långverkande, bionedbrytbara mikropartiklar, vilka innehåller terapeutiskt verksamma peptider som aktiv substans och PLGA som bärarmaterial. Enligt förfarandet suspenderas eller löses peptiden i bärarmateriallösningen eller en vattenhaltig peptidlösning emulgeras i bärarmateriallösningen, varefter suspensionen, lösningen eller emulsionen sprutorkas vid en temperatur under 60 °C i en sprutströmning över 500 NL/h (1 NL = 22,415 liter).

Menetelmä kestovaikutteisten biohajoavien mikrohiukkasten valmistamiseksi, jotka sisältävät vaikuttavana aineena terapeuttisesti vaikuttavaa peptidiä ja kantajamateriaalina PLGA:ta

5

Keksintö koskee menetelmää kestovaikutteisten biohajoavien mikrohiukkasten valmistamiseksi, jotka sisältävät vaikuttavana aineena terapeuttisesti vaikuttavaa peptidiä ja kantajamateriaalina PLGA:ta.

10

Parenteraalisilla lääkeainemuodoilla on merkitystä nenän ja ihon kautta tapahtuvan annostelun ohella, joilla esiintyy usein vain vähäistä imeytymistä, ennen kaikkea sellaisille lääkeaineille, jotka hajoavat entsyymaattisesti maha-suolistoalueella, kuten esim. proteiinit ja peptidit.

15

Tiettyjen sairausten pitkäaikaishoitoon olisi toivottavaa kehittää parenteraalisia depotlääkemuotoja, jotka vapauttavat lääkeainetta jatkuvasti useamman viikon ajan. Kirjallisuudessa tähän tarkoitukseen esitetään siirränäisten ohella (vrt. esim. EP-julkaisu B-0 058 481) myös mikrokapseleita/mikropallosia.

20

Jotta välttää näiden injektiomuotojen operatiiviselta poistamiselta, käytetään biohajoavia polymeerejä. Polyamidien, polyanhydridien, poly(orto)esterien, polyasetaalien ohella käytetään ennen kaikkea polyestereitä. Enimmäkseen kuvataan maitohappo- ja glykolihiappomonomeereihin tai niiden kopolymeereihin pohjautuvia polyestereitä sopivina polymeereinä.

25

Mikrokapseleiden/mikropallosten valmistamiseksi tulevat kysymykseen erilaiset menetelmät, kuten esim. faasinerotus (EP-julkaisu B-0 052 510), liuotinuutto (EP-julkaisu B-0 145 240) tai suihkukuivaus (EP-julkaisu A-0 315 875 = ZA-patenttijulkaisu 88/8 396, CH-julkaisu 666 406, A5, vrt. Derwent Ref. No. 88-228 036/33). Suihku-
kuivauksella on se etu muihin menetelmiin nähden, että kapselointitehokkuus on siinä yleensä suurempi kuin muissa

30
35

mainituissa menetelmissä eikä kapseloinnissa tarvita muita apuaineita, jotka johtaisivat sitten mahdollisiin epäpuhtauksiin tuotteessa. Haittapuolena on se, että suihkukuivaus täytyy suorittaa korkeammissa lämpötiloissa, ts.

5 yleensä paljon yli kulloistenkkin liuottimien kiehumispisteen. Mikäli maito- ja glykolihiapon (PLGA) kopolymeerien suspensiot, emulsiot tai liuokset saatetaan tavanomaisiin suihkukuivausolosuhteisiin, niin tällöin ei saada mikrohiukkasia, vaan lankamaisia muodostelmia, jotka eivät so-
10 vellu injektoitavaan depotmuotoon (EP-julkaisu A-0 315 875). CH-julkaisussa 666 406 A5 kuvatut, 59 °C:ssa suihkukuivauksen avulla saadut mikrokapselit eivät sisällä biologisesti hajoavana kantajamateriaalina PLGA:ta vaan D,L-oligolaktoyyli-N-(L)-fenyylialaniinia.

15 Nyt on yllättävästi havaittu että PLGA-polymeriliuoksia ja vastaavia vesipitoisia suspensioita ja emulsioita voidaan suihkuttaa mikrohiukkasiksi, kun suihkutustilämpötila on alle 60 °C ja suihkuvirtaus on yli 500 NL/h. Verrattuna mikrohiukkasiin, joita valmistetaan muiden mai-
20 nittujen menetelmien mukaisesti, näille mikrohiukkasille on ominaista lisäksi vielä pieni jäännösluottimen pitoisuus (orgaaninen liuotin, vesi), joka on alle 1 %. Viimeksi mainitulla on suurta merkitystä erityisesti injektoitavuudelle, sillä siinä asetetaan suuret vaatimukset
25 lääkeaineen puhtaudelle.

Keksintö koskee siten mikrohiukkasten valmistamista, jotka sisältävät peptidiä vaikuttavana aineena ja poly(laktidikoglykolidia) (PLGA) kantajamateriaalina, joille mikrohiukkasille on tunnusomaista, että niitä saadaan
30 suihkukuivaamalla alle 60 °C:n lämpötilassa suihkuvirtauksessa, joka on yli 500 NL/h (1 NL = 22,415 litraa).

Mikrohiukkasilla ymmärretään edellä sekä jäljempänä myös mikrokapseleita ja mikropallosia, eli siis sekä sellaisia osasia, joissa vaikuttava aine on suljettu polymeeri-
35 rin sisään täydellisesti tai osittain, että myös sellaisia

osasia, joissa vaikuttava aine on jakautunut PLGA-matriisiin.

Peptideillä tarkoitetaan luonnon ja synteettisiä peptidejä sekä niiden fysiologisesti hyväksyttäviä suoloja.

Keksintö koskee myös menetelmää mikrohiukkasten valmistamiseksi, jotka sisältävät vaikuttavana aineena peptidiä ja kantajamateriaalina PLGA:ta, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että peptidi suspendoidaan tai liuotetaan kantajamateriaalin liuokseen tai peptidin vesipitoinen liuos emulgoidaan kantajamateriaalin liuokseen ja suspensio, liuos tai emulsio suihkutetaan alle 60 °C:n lämpötilassa suihkuvirtauksessa, joka on yli 500 NL/h.

Keksinnön mukaisesti valmistetut mikrohiukkaset sisältävät edullisesti vesiliukoisia peptidejä. Peptidien molekyylipaino on edullisesti yli 800. Erityisen sopivia peptidejä ovat LHRH-agonistit ja -antagonistit kuten esim. busereliini, HOE 013 (Ac-D-Nal-p-Cl-D-Phe-D-Trp-Ser-Tyr-D-Ser (α -L-Rha)-Leu-Arg-Pro-Azagly-NH₂, vrt. EP-julkaisu A-0 263 521), nafareliini, triptoreliini, leuproreliini ja gosereliini. Muun tyyppiset peptidit ovat samoin sopivia, kuten esim. TRH, vasopressiini, kalsitoniini, insuliini tai HOE 427 (=epiratidi, [4-metioniinidioksidi, 8-D-lysiini, 9-fenyyliamiini]- α -MSH-(4-9)-(8-amino-oktyyli)amiditriasetatti, vrt. EP-julkaisu A-0-179 332).

Biologisesti hajoava kantajamateriaali on PLGA. Vaikutusaineen vapautumiseen mikrohiukkasista ei vaikuta vain vaikutusaineen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, vaan myös polymeerin tai polymeeriseosten ominaisuudet kuten molekyylipaino, moolinen koostumus, maitohappo- ja glykolihappoyksiköiden järjestys polymeerissä. Kantajamateriaali voi koostua esimerkiksi PLGA:n 50:50 ja PLGA:n 40:60 seoksesta. Mitä korkeampi molekyylipaino tai sisäinen viskositeetti on, sitä kauemmin vaikuttavan aineen vapautuminen kestää. Sisäinen viskositeetti (20 °C, kloro-

formi, 0,1 %) on edullisesti 0,1 - 0,8 dl/g. Laktidin moolisuhde glykolidiksiöihin nähden on esimerkiksi 85:15 - 40:60, edullisesti käytetään poly(d,l-laktidikoglykolidia) 50:50, jonka viskositeetti on 0,1 - 0,7 dl/g, erityisesti 0,1 - 0,5 dl/g.

Polymerin kulloisistakin ominaisuuksista riippuen keksinnön mukaisen menetelmän mukaisesti valmistetut mikrohiukkaset vapauttavat vaikutusaineen aikajaksona, joka on edullisesti 2 viikosta 3 kuukauteen. Vaikuttavan aineen määrällä on samoin, joskin toissijainen, vaikutus vaikuttavan aineen vapautumisen keston. Keksinnön mukaisella menetelmällä saadaan edullisesti mikrohiukkasia, joissa peptidin määrä on alle 20 %, edullisesti alle 12 %.

Hiukkaskoko, joka samoin vaikuttaa vapautumiseen, on keksinnön mukaisen menetelmän mukaisesti valmistetuilla mikrohiukkasilla pienempi kuin 200 µm, edullisesti pienempi kuin 100 µm. Erityisesti hiukkaskoko on pienempi kuin 50 µm.

Mikrohiukkasten valmistus tapahtuu suihkuttamalla polymeeriliuoksessa olevan vaikuttavan aineen liuosta, emulsiota tai suspensiota. Liuottimena voidaan käyttää esimerkiksi kloroformia, metyleenikloridia, DMF:ää, asetonia, etikkahappoetyyliesteriä, jääetikkaa ja vettä tai niiden seoksia. Edullisesti käytetään metyleenikloridia, jääetikkaa ja vettä.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä peptidi liuotetaan edullisesti veteen ja saatetaan PLGA:n liuokseen esimerkiksi metyleenikloridissa. Tällöin muodostuva emulsio edullisesti suihkutetaan. Suihkutus voi tapahtua myös esimerkiksi metanolin lisäämisen jälkeen, jolloin syntyy liuos.

Suihkutuslämpötila on edullisesti 50 - 30 °C, erityisesti 40 - 30 °C. Suihkutusnopeus ei saa olla liian alhainen, sillä muutoin voi tapahtua langanmuodostusta. Suihkutusnopeus on edullisesti noin 800 NL/h, sillä suu-

remmassa suihkutussopeudessa kuivumisominaisuudet ovat paremmat.

5 Suihkutusväliaineen, kuten ilman tai typen paineen tulisi olla 3 - 8 baaria käytettäessä laboratoriosuihkutuskalaitetta (esimerkiksi Büchi Mini Spray Dryer 190). Suihkutuskalaitteen pumpunteho tulee sovitaa tilanteeseen sopivaksi (3 - 20 ml/min). Vastaavalla aspiraattorin säädöllä esimerkiksi asteikkolukemaan 18 taataan, että kaikki suihkutussväliaineessa oleva ilma tai tyyppi poistuu.

10 PLGA-polymeri tulisi liuottaa mahdollisimman vähäiseen määrään liuotinta, jolloin polymerit, joissa laktidin osuus on suuri, vaativat suuremman määrän liuotinta. Periaatteessa polymerin konsentraatio suihkutettavassa liuoksessa, emulsiossa, suspensiossa tulee valita siten, 15 että suihkutuss valituissa olosuhteissa on mahdollista. Edullisesti PLGA:n konsentraatio metyleenikloridissa on alle 15 paino-% metyleenikloridista laskettuna.

Keksintöä kuvataan seuraavien esimerkkien avulla.

Esimerkeissä PLGA:lle annettu viskositeetti on 20 0,1-prosenttisen kloroformiliuoksen sisäinen viskositeetti 20 °C:ssa, jolloin viskositeetti on mitattu tavanomaisten menetelmien mukaisesti.

Suihkutusparametri a) aspiraattori ja b) pumpunteho säädetään kaikissa esimerkeissä asteikkolukemaan 18 (aspiraattorille) ja vastaavasti asteikkolukemaan 6 (pumpunteholle). 25

Esimerkki 1

Suihkutusväliaine - jääetikka

a) 0,064 g busereliiniasetaattia liuotetaan 30 2,0 g:aan vettä. Vesiliuos sekoitetaan liuoksen kanssa, jossa on 1,936 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g) ja 40 g jääetikkaa, ja suihkutetaan laboratoriosuihkukuivaimessa.

Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

1. tulolämpötila 50 °C
- 35 2. suihkutussopeus 800 NL/h

Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyisenä jauheena. Saanto: 1,2 g = 60 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 3 %

Jäännösluottimen pitoisuus: jääetikka 0,8 %

- 5 b) Samalla tavalla valmistetaan mikrohiukkasia käyttämällä 0,192 g busereliiniasetaattia ja 1,808 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g). Saanto: 1,2 g = 60 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 9 %

- 10 Jäännösluottimen pitoisuus: jääetikka 0,8 %

20 mg:lle mikrohiukkasia määritettiin in vitro -vapauttamismäärät seuraavasti:

- 20 mg mikrohiukkasia saatetaan 2,0 ml:aan fosfaattipuskuriliuosta, jonka pH on 7,4, ja eluoidaan 24 tunnin ajan +37 °C:ssa. Kun eluaatti on erotettu mikrohiukkasis-
15 ta, testataan eluaatti HPLC-menetelmän avulla busereliinipitoisuuden suhteen. Jäljelle jääneet mikrohiukkaset liuotetaan uudestaan 2,0 ml:aan fosfaattipuskuria ja eluoidaan jälleen 24 tunnin ajan 37 °C:ssa. Tätä prosessia jatketaan analogisesti 56 päivää.

- 20 Eluaateista määritetyt busereliiniasetaattimäärät on koottu yhteen seuraavaan taulukkoon:

		Vaikuttavan aineen	Vaikuttavan aineen
		pitoisuus	pitoisuus
		3 %	9 %
25	2. päivä	5,8 µg	23,2 µg
	9. päivä	<0,7 µg	57,7 µg
30	16. päivä	13,4 µg	51,9 µg
	23. päivä	20,3 µg	16,7 µg
	30. päivä	13,2 µg	8,4 µg
	37. päivä	4,1 µg	3,4 µg
	44. päivä	2,5 µg	1,5 µg
35	51. päivä	0,7 µg	0,7 µg
	56. päivä	0,7 µg	0,7 µg

Esimerkki 2**Suihkutusväliaine - kloroformi**

a) 0,108 g busereliiniasetaattia liuotetaan
2,0 g:aan vettä. Vesiliuos emulgoidaan roottori-staattori-
5 homogeenomislaitteen avulla liuokseen, jossa on 1,892 g
PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g) ja 92 g kloroformia, ja
suihkutetaan laboratoriosuihkukuivaimessa.

Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

1. tulolämpötila 30 °C
- 10 2. suihkutusnopeus 800 NL/h

Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumisky-
kyisenä jauheena. Saanto: 0,9 g = 45 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 5 %

b) Samalla tavalla valmistetaan mikrohiukkasia
15 käyttämällä 0,152 g busereliiniasetaattia ja 1,848 g
PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g). Saanto: 1 g = 50 % teoreet-
tisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 7 %

20 20 mg:lle mikrohiukkasia määritettiin in vitro
-vapauttamismäärät kuten esimerkissä 1 35 päivän aikana.

Eluaateista määritetyt busereliiniasetaattimäärät
on koottu yhteen seuraavaan taulukkoon:

25	Vaikuttavan aineen		Vaikuttavan aineen	
	pitoisuus		pitoisuus	
	5 %		7 %	
30	2. päivä	44,7 µg	56,2 µg	
	9. päivä	7,3 µg	10,1 µg	
	16. päivä	30,3 µg	37,8 µg	
	23. päivä	30,0 µg	38,6 µg	
	30. päivä	10,9 µg	13,6 µg	
	35. päivä	11,5 µg	14,5 µg	

Esimerkki 3**Suihkutusväliaine - metyleenikloridi/vesi/metanoli**

a) 0,128 g busereliiniasetaattia liuotetaan
 2,0 g:aan vettä. Vesiliuos sekoitetaan liuoksen kanssa,
 5 jossa on 1,872 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g) ja 46 g
 metyleenikloridia. Seokseen lisätään 9 g metanolia. Syn-
 tyy kirkas liuos, joka suihkutetaan laboratoriosuihkukui-
 vaimessa.

Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

- 10 1. tulolämpötila 30 °C
 2. suihkutusnopeus 800 NL/h

Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumisky-
 kyisenä jauheena. Saanto: 1,2 g = 60 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 6 %

15 Jäännösliuottimen pitoisuus:

vesi 0,9 %
 metyleenikloridi 0,06 %
 metanoli <0,01 %

20 20 mg:lle mikrohiukkasia määritettiin in vitro
 -vapauttamismäärät kuten esimerkissä 1 28 päivän aikana.

Eluaateista määritetyt busereliiniasetaattimäärät
 on koottu yhteen seuraavaan taulukkoon:

Vaikuttavan aineen pitoisuus

25	6 %
2. päivä	93,7 µg
9. päivä	5,1 µg
16. päivä	7,4 µg
30 23. päivä	12,1 µg
28. päivä	12,1 µg

Esimerkki 4**Suihkutusväliaine - metyleenikloridi/vesi/metanoli**

35 a) 0,084 g busereliiniasetaattia liuotetaan
 4,0 g:aan vettä. Vesiliuos sekoitetaan liuoksen kanssa,

jossa on 1,916 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,42 dl/g) ja 65 ml metyleenikloridia. Seokseen lisätään 25 g metanolia. Syn-
tyy kirkas liuos, joka suihkutetaan laboratoriosuihkukui-
vaimessa.

5 Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

1. tulolämpötila 30 °C

2. suihkutusnopeus 800 NL/h

Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumisky-
kyisenä jauheena. Saanto: 0,8 g = 40 % teoreettisesta.

10 Vaikuttavan aineen pitoisuus: 4 %

b) Samalla tavalla valmistetaan mikrohiukkasia
käyttämällä 0,168 g busereliiniasetaattia ja 1,832 g
PLGA:ta 50:50 (IV = 0,42 dl/g). Saanto: 0,8 g = 40 % teo-
reettisesta.

15 Vaikuttavan aineen pitoisuus: 8 %

20 mg:lle mikrohiukkasia määritettiin in vitro
-vapauttamismäärät seuraavasti:

20 mg mikrohiukkasia liuotetaan 2,0 ml:aan fosfaattipus-
kuriliuosta, jonka pH on 7,4, ja eluoidaan 24 tunnin ajan
20 +37 °C:ssa. Kun eluaatti on erotettu mikrohiukkasista,
testataan eluaatti radioimmunologisen määritysmenetelmän
(RIA) avulla busereliinipitoisuuden suhteen. Jäljelle jää-
neet mikrohiukkaset liuotetaan uudestaan 2,0 ml:aan fos-
faattipuskuria ja eluoidaan jälleen 24 tunnin ajan
25 37 °C:ssa. Tätä prosessia jatketaan analogisesti 63 päivän
ajan.

Eluaateista määritetyt busereliiniasetaattimäärät
on koottu yhteen seuraavaan taulukkoon:

		Vaikuttavan aineen pitoisuus 4 %	Vaikuttavan aineen pitoisuus 8 %
5	2. päivä	129,3 µg	280,1 µg
	9. päivä	1,7 µg	4,7 µg
	16. päivä	1,9 µg	5,7 µg
	23. päivä	6,3 µg	3,0 µg
	30. päivä	6,4 µg	8,1 µg
10	37. päivä	3,1 µg	5,6 µg
	44. päivä	1,6 µg	3,9 µg
	51. päivä	3,1 µg	2,4 µg
	58. päivä	0,7 µg	1,4 µg
	63. päivä	0,7 µg	1,4 µg

15

Esimerkki 5

Suihkutusväliaine - kloroformi/vesi/dimetyyliformamidi

a) 0,13 g busereliiniasetaattia liuotetaan

20 2,0 g:aan vettä. Vesiliuos emulgoidaan roottori-staattorihomogenoimislaitteen avulla liuokseen, jossa on 1,87 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g), 41,4 g kloroformia ja 4,6 g dimetyyliformamidia, ja suihkutetaan laboratoriosuihkukuvaimessa.

25 Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

1. tulolämpötila 30 °C

2. suihkutusnopeus 800 NL/h

Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyisenä jauheena. Saanto: 1,2 g = 60 % teoreettisesta.

30 Vaikuttavan aineen pitoisuus: 6 %

20 mg:lle mikrohiukkasia määritettiin in vitro -vapauttamismäärät kuten esimerkissä 4 63 päivän aikana.

Eluaateista määritetyt busereliiniasetaattimäärät on koottu yhteen seuraavaan taulukkoon:

Vaikuttavan aineen pitoisuus**6 %**

5	2. päivä	32,1 µg
	9. päivä	16,8 µg
	16. päivä	49,1 µg
	23. päivä	39,1 µg
	30. päivä	17,5 µg
10	37. päivä	5,7 µg
	44. päivä	2,5 µg
	51. päivä	2,5 µg
	58. päivä	1,4 µg
	63. päivä	1,4 µg

15 Esimerkki 6**Suihkutusväliaine - metyleenikloridi**

a) 0,085 g busereliiniasetaattia liuotetaan

2,0 g:aan vettä. Vesiliuos emulgoidaan roottori-staattori-homogenoimislaitteen avulla liuokseen, jossa on 1,915 g
 20 PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g) ja 46 g metyleenikloridia, ja suihkutetaan laboratoriosuihkukuivaimessa.

Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

1. tulolämpötila 30 °C

2. suihkutusnopeus 800 NL/h

25 Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyisenä jauheena. Saanto: 0,6 g = 30 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 4 %

b) Samalla tavalla valmistetaan mikrohiukkasia käyttämällä 0,128 g busereliiniasetaattia ja 1,872 g
 30 PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g). Saanto: 0,7 g = 35 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 6 %

c) sekä käyttämällä 0,170 g busereliiniasetaattia ja 1,872 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g). Saanto: 0,4 g =
 35 20 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 8 %

20 mg:lle mikrohiukkasia määritettiin in vitro
-vapauttamismäärät kuten esimerkissä 4 63 päivän aikana.

5 Eluaateista määritetyt busereliiniasetaattimäärät
on koottu yhteen seuraavaan taulukkoon:

		Vaikuttavan ai- neen pitoisuus 4 %	Vaikuttavan ai- neen pitoisuus 6 %	Vaikuttavan ai- neen pitoisuus 8 %
10				
	2. päivä	39,4 µg	49,8 µg	88,0 µg
	9. päivä	1,1 µg	2,7 µg	4,7 µg
	16. päivä	5,9 µg	34,3 µg	21,7 µg
	23. päivä	17,1 µg	51,5 µg	28,0 µg
15	30. päivä	4,2 µg	18,4 µg	3,2 µg
	37. päivä	1,5 µg	5,8 µg	2,2 µg
	44. päivä	1,7 µg	2,5 µg	2,8 µg
	51. päivä	0,4 µg	0,8 µg	2,4 µg
	58. päivä	0,3 µg	0,7 µg	2,5 µg
20	63. päivä	0,3 µg	0,3 µg	2,5 µg

Esimerkki 7

Suihkutusväliaine - metyleenikloridi/vesi

25 0,032 g busereliiniasetaattia liuotetaan 1,0 g:aan
vettä. Vesiliuos emulgoidaan roottori-staattori-homogenoi-
mislaitteen avulla liuokseen, jossa on 0,968 g PLGA:ta
85:15 ja 23 g metyleenikloridia, ja suihkutetaan laborato-
riosuihkukuivaimessa.

Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

- 30 1. tulolämpötila 40 °C
2. suihkutusnopeus 800 NL/h

Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyi-
senä jauheena. Saanto: 0,7 g = 70 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 3 %

Esimerkki 8**Suihkutusväliaine - metyleenikloridi/vesi**

0,064 g busereliiniasetaattia liuotetaan 2,0 g:aan vettä. Vesiliuos emulgoidaan roottori-staattori-homogenoimis-
 5 laitteiden avulla liuokseen, jossa on 1,936 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,7 dl/g) ja 92 g metyleenikloridia, ja suihkutetaan laboratoriosuihkukuivaimessa.

Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

1. tulolämpötila 40 °C
- 10 2. suihkutusnopeus 800 NL/h

Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyisenä jauheena. Saanto: 0,9 g = 45 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 3 %

Vaikuttavan aineen vapautumisen määrittäminen on analo-
 15 ginen esimerkin 1 kanssa.

Vaikuttavan aineen pitoisuus

3 %

20	2. päivä	48,1 µg
	23. päivä	3,9 µg
	37. päivä	7,1 µg
	44. päivä	3,9 µg
	51. päivä	1,0 µg

25

Esimerkki 9**Suihkutusväliaine - metyleenikloridi/vesi**

0,106 g busereliiniasetaattia liuotetaan 1,0 g:aan vettä. Vesiliuos emulgoidaan roottori-staattori-homogenoimis-
 30 laitteiden avulla liuokseen, jossa on 0,894 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,1 dl/g) ja 23 g metyleenikloridia, ja suihkutetaan laboratoriosuihkukuivaimessa.

Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

1. tulolämpötila 40 °C
- 35 2. suihkutusnopeus 800 NL/h

Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyisenä jauheena. Saanto: 0,3 g = 30 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 10 %

5 Vaikuttavan aineen vapautumisen määrittäminen on analoginen esimerkin 1 kanssa.

Vaikuttavan aineen pitoisuus

10 %

10	2. päivä	32,7 µg
	9. päivä	19,6 µg
	16. päivä	20,6 µg
	23. päivä	15,4 µg
	28. päivä	15,4 µg

15

Esimerkki 10

Suihkutusväliaine - metyleenikloridi/vesi

0,13 g busereliiniasetaattia liuotetaan 2,0 g:aan vettä. Vesiliuos emulgoidaan roottori-staattori-homogenoimislaitteen avulla liuokseen, jossa on 1,87 g PLGA:ta 75:25 (IV = 0,5 dl/g) ja 46 g metyleenikloridia, ja suihkutetaan laboratoriosuihkukuivaimessa.

20 Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

1. tulolämpötila 30 °C
- 25 2. suihkutusnopeus 800 NL/h

Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyisenä jauheena. Saanto: 1,2 g = 60 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 6 %

Esimerkki 11

30 Suihkutusväliaine - metyleenikloridi/vesi

0,128 g busereliiniasetaattia liuotetaan 2,0 g:aan vettä. Vesiliuos emulgoidaan roottori-staattori-homogenoimislaitteen avulla liuokseen, jossa on 1,872 g PLGA:ta 75:25 (IV = 0,8 dl/g) ja 138 g metyleenikloridia, ja suihkutetaan laboratoriosuihkukuivaimessa.

35

Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

1. tulolämpötila 30 °C

2. suihkutusnopeus 800 NL/h

5 Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyisenä jauheena. Saanto: 0,9 g = 45 % teoreettisesta.
Vaikuttavan aineen pitoisuus: 6 %

Esimerkki 12

Suihkutusväliaine - metyleenikloridi/vesi

10 0,13 g busereliiniasetaattia liuotetaan 2,0 g:aan vettä. Vesiliuos emulgoidaan roottori-staattori-homogenoimislaitteen avulla liuokseen, jossa on 1,87 g PLGA:ta 47:53 (IV = 0,3 dl/g) ja 46 g metyleenikloridia, ja suihkutetaan laboratoriosuihkukuivaimessa.

Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

15 1. tulolämpötila 30 °C

2. suihkutusnopeus 800 NL/h

Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyisenä jauheena. Saanto: 1,3 g = 65 % teoreettisesta.
Vaikuttavan aineen pitoisuus: 6 %

20 **Esimerkki 13**

Suihkutusväliaine - metyleenikloridi

25 0,13 g busereliiniasetaattia suspendoidaan roottori-staattori-homogenoimislaitteen avulla liuokseen, jossa on 1,87 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g) ja 46 g metyleenikloridia. Suspensio suihkutetaan laboratoriosuihkukuivaimessa.

Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

1. tulolämpötila 40 °C

2. suihkutusnopeus 800 NL/h

30 Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyisenä jauheena. Saanto: 0,5 g = 25 % teoreettisesta.
Vaikuttavan aineen pitoisuus: 6 %

Esimerkki 14

Suihkutusväliaine - metyleenikloridi/vesi

35 a) 0,2 g reagenssia Hoe 427 liuotetaan 1,0 g:aan vettä. Vesiliuos emulgoidaan roottori-staattori-homogenoi-

mislaitteen avulla liuokseen, jossa on 3,8 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g) ja 92 g metyleenikloridia, ja suihkutetaan laboratoriosuihkukuivaimessa.

Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

- 5 1. tulolämpötila 40 °C
 2. suihkutusnopeus 800 NL/h

Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyisenä jauheena. Saanto: 1,9 g = 48 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 5 %

- 10 b) Samalla tavalla valmistetaan mikrohiukkasia käyttämällä 0,6 g reagenssia Hoe 427 ja 3,4 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g). Saanto: 2,8 g = 70 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 15 %

- 15 c) sekä käyttämällä 0,4 g reagenssia Hoe 427 ja 3,6 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g). Saanto: 2 g = 50 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 10 %

Esimerkki 15

- 20 **Suihkutusväliaine - metyleenikloridi/vesi**

0,08 g reagenssia Hoe 013 liuotetaan 1,0 g:aan vettä. Vesiliuos emulgoidaan roottori-staattori-homogenoimislaitteen avulla liuokseen, jossa on 0,92 g PLGA:ta 50:50 (IV = 0,4 dl/g) ja 23 g metyleenikloridia, ja suihkutetaan laboratoriosuihkukuivaimessa.

- 25 Suihkutusparametrit säädetään seuraavasti:

1. tulolämpötila 30 °C
2. suihkutusnopeus 800 NL/h

- 30 Mikrohiukkaset esiintyvät valkoisena, valumiskykyisenä jauheena. Saanto: 0,5 g = 50 % teoreettisesta.

Vaikuttavan aineen pitoisuus: 6 %

Vaikuttavan aineen vapautumisen määrittäminen on analooginen esimerkin 1 kanssa.

Vaikuttavan aineen pitoisuus
6 %

5	2. päivä	13,9 µg
	9. päivä	5,9 µg
	16. päivä	3,1 µg
	23. päivä	3,7 µg
	28. päivä	2,2 µg

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kesto-vaikutteisten biohajoavien mikro-
hiukkasten valmistamiseksi, jotka sisältävät vaikuttavana
5 aineena terapeuttisesti vaikuttavaa peptidiä ja kantajama-
teriaalina PLGA:ta, t u n n e t t u siitä, että pepti-
di suspendoidaan tai liuotetaan kantajamateriaalin liuok-
seen tai peptidin vesipitoinen liuos emulgoidaan kantaja-
materiaalin liuokseen ja suspensio, liuos tai emulsio
10 suihkutetaan alle 60 °C:n lämpötilassa suihkuvirtauksessa,
joka on yli 500 NL/h.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että vaikuttavana aineena käytetään ve-
siliukoista peptidiä.

15 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että se täyttää yhden tai useampia seu-
raavista ehdoista:

- a) peptidi on LHRH-agonisti tai LHRH-antagonisti,
- b) kantajamateriaali on PLGA 50:50,
- 20 c) PLGA:n sisäinen viskositeetti on 0,1 - 0,5 dl/g
(20 °C, kloroformi, 0,1 %),
- d) liuotin on kloroformi, metyleenikloridi, jää-
etikka, metanoli, dimetyyliformamidi tai vesi tai vähin-
tään kahden tälläisen liuottimen seos ja
- 25 e) suihkutussnopeus on noin 800 NL/h.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että se täyttää yhden tai useampia seu-
raavista ehdoista:

- a) peptidi on busereliiniasetaatti tai HOE 013,
- 30 b) kantajamateriaali on PLGA 50:50,
- c) PLGA:n sisäinen viskositeetti on 0,1 - 0,5 dl/g
(20 °C, kloroformi, 0,1 %),
- d) liuotin on metyleenikloridi, jääetikka tai vesi
tai kahden tälläisen liuottimen seos ja
- 35 e) suihkutussnopeus on noin 800 NL/h.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av långverkande, biologiskt netbrytbara mikropartiklar, vilka som aktiv substans innehåller en terapeutiskt verksamm peptid och som bärarmaterial PLGA, k ä n n e t e c k n a t av, att peptiden suspenderas eller löses i en bärarmateriallösning eller en vattenhaltig peptidlösning emulgeras i bärarmateriallösningen och suspensionen, lösningen eller emulsionen sprutas vid en temperatur under 60 °C i en sprutströmning över 500 NL/h.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av, att man använder en vattenlöslig peptid som aktiv substans.

3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av, att man använder ett eller flera av följande villkor:

a) peptiden är en LHRH-agonist eller en LHRH-antagonist,

b) bärarmaterialet är PLGA 50:50,

c) inre viskositeten hos PLGA är 0,1 - 0,5 dl/g (20 °C, kloroform, 0,1 %),

d) lösningsmedlet är kloroform, metylenklorid, isättika, metanol, dimetylformamid eller vatten eller en blandning av minst två av dessa och

e) sprutströmningshastigheten är cirka 800 NL/h.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av, att man uppfyller ett eller flera av följande villkor:

a) peptiden är buserelinacetat eller HOE 013,

b) bärarmaterialet är PLGA 50:50,

c) lösningsmedlet är metylenklorid, isättika eller vatten, dimetylformamid eller vatten eller en blandning av två av dessa och

e) sprutströmningshastigheten är cirka 800 NL/h.