

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **1999-3963**
(22) Přihlášeno: **18.05.1998**
(30) Právo přednosti: **16.05.1997 US 1997/857973**
15.08.1997 US 1997/912902
(40) Zveřejněno: **12.04.2000**
(Věstník č. 4/2000)
(47) Uděleno: **03.04.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **14.05.2008**
(Věstník č. 20/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/US1998/010013**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/051348**

(11) Číslo dokumentu:

299 180

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/00	(2006 01)
A61K 47/02	(2006 01)
A61P 3/04	(2006 01)
A61P 29/00	(2006 01)
A61P 3/06	(2006 01)
A61P 9/10	(2006 01)
A61P 3/10	(2006 01)
A61P 1/16	(2006 01)
A61P 39/00	(2006 01)
A61K 36/03	(2006 01)
A61K 47/30	(2006 01)
C01G 9/00	(2006 01)
C07C 69/00	(2006 01)
A61K 31/365	(2006 01)
A61K 31/21	(2006 01)
A61K 31/734	(2006 01)
A61K 31/715	(2006 01)
A61K 31/738	(2006 01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 4241099; KR 960006730; EP 0506191; GB 2324725; JP 3188149; JP 1005460; WO 9603116.

(73) Majitel patentu:

AMGEN INC., Thousand Oaks, CA, US

(72) Původce:

Goldenberg Merrill Seymour, Thousand Oaks, CA, US

Beekman Alice C., Thousand Oaks, CA, US

Gu Jian Hua, Thousand Oaks, CA, US

(74) Zástupce:

Dr. Karel Čermák, Národní 32, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Gelotvorná farmaceutická kompozice s
prodlouženým uvolňováním a zpožděnou
tvorbou gelu**

(57) Anotace:

Gelotvorná farmaceutická kompozice s prodlouženým uvolňováním a zpožděnou tvorbou gelu, která obsahuje a) alginát; b) biologicky aktivní činidlo; a c) alespoň jeden vázaný polyvalentní ion kovu, ve farmaceuticky vhodném nosiči nebo ředidle. Použití této kompozice pro výrobu léčiva pro léčení nadměrné hmotnosti, diabetes, vysoké hladiny krevních lipidů, arteriální sklerózy, arteriálních plátů, pro snížení nebo prevenci tvorby žlučových kamenů, nedostatečnosti hmoty beztukové tkáně, pro léčení nedostatečné senzitivity na inzulin, mrtvice, deficiencie hematopoetických buněk, infekce, neutropenie a zánětu.

CZ 299180 B6

Gelotvorná farmaceutická kompozice s prodlouženým uvolňováním a zpožděnou tvorbou gelu

5 Oblast techniky

Vynález se týká gelotvorné farmaceutické kompozice s prodlouženým uvolňováním a zpožděnou tvorbou gelu a léčiv, která ji obsahují.

10

Dosavadní stav techniky

S pokroky v genetickém a buněčném inženýrství vede dostupnost rekombinantních proteinů k pokrokům v jejich použití medikamentů v terapeutických aplikacích. Mnoho onemocnění a stavů
15 léčených proteiny určenými k farmaceutickému použití vyžaduje k dosažení nejúčinnějšího terapeutického výsledku trvalé udržení hladin proteinů. Avšak podobně jako u většiny proteinů používaných jako léčiva, vyžaduje jejich obecně krátký poločas časté podávání. Tyto opakované injekce jsou podávány v různých intervalech, které vedou ke kolísání hladin léku a významné fyzické i finanční zátěži pacientů. Protože u mnoha onemocnění dochází k lepší odpovědi při
20 kontrolovaných hladinách léku, existuje potřeba jeho kontrolovaného uvolňování k zajištění delších časových intervalů stálého uvolňování. Takový způsob trvalého uvolňování léku by zajistil pacientovi nejen profylaktické, terapeutické nebo diagnostické účinky, ale také snížení četnosti injekcí a také celkových nákladů.

25 Současné pokusy udržet hladiny léků u člověka i zvířat mezi jednotlivými dávkami zahrnují použití biodegradabilních polymerů jako matric ke kontrolovanému uvolnění léku. Například patent Great Britain Patent 1 388 580 ukazuje použití hydrogelů pro trvalé uvolňování inzulínu. Patent US 4 789 550 ukazuje použití polylysinem potažených mikrokapslí pro transport proteinu enkapsulací živými buňkami. V pokusech s trvalým uvolňováním účinné látky byly použity také
30 anionické a kationické polymerní preparáty obklopené iontovými polymery s opačným nábojem pro enkapsulaci buněk schopných produkce biologicky účinných látek. (Patent US 4 744 933). Podobně bylo ukázáno, že několikanásobné obalení anionickými nebo kationickými přemostujícími polymery vede ke kontrolovanému uvolňování (Patenty US 4 690 682 a US 4 789 516). Navíc další pokusy ukazují na použití alginátu samotného, nebo alginátu potaženého jinými biodegradabilními polymery ke kontrolovanému uvolňování polypeptidů nebo jejich kationických
35 precipitátů (PCT WO 96/00081, PCT WO 95/29664 a PCT WO 96/03116).

Tyto pokusy však vedly k nedostatečnému stupni trvalého uvolňování požadovaného proteino-
40 vého farmaceutika. Je obecně známo, že použití určitých biodegradabilních polymerů, například polylaktid ko-glykolidu, za podmínek in vivo vykazuje vysoké počáteční uvolnění léčiva (Johnson, O. et al., Nature Med., 2/7: 795 (1996)). Dále je obecně známo, že proteiny používané v současných formách preparátů s trvalým uvolňováním mohou být denaturovány a ztratit tak svoji bioaktivitu po expozici enkapsulujícím látkám. Takové preparáty používají organická roz-
45 pouštědla, která mohou mít zhoubné efekty na zvolený protein. Konečně použití alginátu samotného, jak je diskutováno níže, nezajišťuje požadované kontrolované uvolňování proteinu, které je nezbytné k získání efektivních terapeutických výsledků.

Algináty jsou obecně dobře známé, přirozeně se vyskytující, anionické polysacharidy tvořené
50 kyselinou 1,4-β-D-manuronovou a α-L-guluronovou (Smidsrod, O. et al. Trends in Biotechnology, 8: 71-78 (1990); Aslani, P. et al., J Microencapsulation, 13/5: 601-614 (1996)). algináty se typicky liší v zastoupení obou kyselin od 70% kyseliny manuronové a 30% kyseliny guluronové do 30% kyseliny manuronové a 70% kyseliny guluronové (Smidsrod, viz výše). Kyselina alginová je ve vodě nerozpustná, zatímco soli tvořené monovalentními ionty jako je sodík, draslík a amonium jsou ve vodě rozpustné (McDowell, R.H., „Properties of alginates“ (London, Alginate

Industries Ltd., 4. vydání 1977). Polyvalentní kationty reagují s algináty za spontánní tvorby gelů.

Algináty mají široké uplatnění, například jako potravinová aditiva, adhesiva, farmaceutické tablety, templáty pro buněčnou novotvorbu a k hojení ran. Algináty jsou také doporučovány pro techniky k separaci bílkovin. Například Gray, C.J. et al., v: *Biotechnology and Bioengineering*, 31: 607–612 (1988) zadržel inzulin v gelech tvořených zinkovým/vápníkovým alginátem a použil tuto metodu k separaci inzulinu od ostatních sérových proteinů.

Dobře bylo také popsáno použití alginátových matic jako transportních systémů, viz například patent US 4 695 463 popisující transportní systém a farmaceutické preparáty tvořené žvýkáci gumou s obsahem alginátu. Alginátové partikule byly také použity pro kontrolované uvolňování různých proteinů, jako například: receptor pro tumor necrosis faktor (TNF) v kationtových alginátových partikulích s polykationty, Wee, S. F. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 21: 730–31 (1994); transformující růstový faktor (TGF) enkapsulovaný do alginátových partikulí, Puolokkainen, P.A. et al., *Gastroenterology*, 107: 1 319–1 326 (1994); angiogenní faktory zachycené do kalcium alginátových partikulí, Downs, E.C. et al., *J. of Cellular Physiology*, 152: 422–429 (1992); albumin zachycený do chitosan–alginátových kapslí, Polk, A. et al., *J. Pharmaceutical Sciences*, 83/2: 178–185 (1994), nebo chitosan–kalcium alginátové partikule potažené polymery, Okhamafe, A.O. et al. *J. Microcapsulation*, 13/5: 497–508 (1996); hemoglobin enkapsulovaný do chitosan–kalcium alginátových partikulí, Huguet, M.L. et al., *Process Biochemistry*, 31: 745–751 (1996); a interleukin–2 enkapsulovaný do alginát–chitosanových mikrokuliček, Liu, L.S. et al., *Proceed–Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 22: 542–543 (1995).

Systémy používající partikule alginátového nebo alginát/kalciového gelu k zachycení proteinů neumožňují jejich trvalé uvolňování v důsledku rychlého uvolňování proteinu z alginátových partikulí. Liu, L. et al., *J. Control. Rel.*, 43: 65–74 (1997). K zabránění tohoto rychlého uvolňování byla vyzkoušena celá řada systémů s použitím polykationických polymerických obalů (například polylysin, chitosan) k zpomalení uvolňování proteinu alginátových partikulí. Viz například Wheatley, M.A. et al., *J. Applied Polymer Science*, 43: 2123–2135 (1991); Wee, S.F. et al. viz výše; Liu L.S. et al. viz výše; Wee, S.F. et al. *Controlled Release Society*, 22: 566–567 (1995) a Lim, et al., viz výše.

Polykationty, jako je například polylysin, jsou pozitivně nabitě polyelektrolyty, které interagují s negativně nabitými molekulami alginátu, čímž vytvářejí polyelektrolytové komplexy zabráňující difúzi na povrchu partikulí. Mezi problémy spojenými s použitím polykationtů patří: 1) tyto preparáty mohou být kvůli polykationtům cytotoxické (Huguet, M. L. et al., viz výše; Zimmermann, Ulrich, *Electrophoresis*, 13: 269 (1992); Bergmann, P. et al., *Clinical Science*, 67:35 (1984); 2) polykationty jsou náchylné k oxidaci; 3) partikule potažené polykationty jsou špatně odbourávány a hromadí se v těle; 4) tyto preparáty jsou připravovány pracovními postupy, které zahrnují vícenásobné potažení polykationtem polylysinem (Padol, et al., *Proceed Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 2: 216 (1986); a 5) iontové interakce mezi proteinem a polykationtem může vést ke ztrátě proteinové aktivity nebo způsobit jeho nestabilitu.

Spolu s výše uvedenými systémy existují také transportní systémy, které vytvářejí po injekční aplikaci gel, nebo jsou organické či thixotropní povahy. Vytvořená depa gelu po injekční aplikaci preparátu mohou udržovat uvolňování zachycených léků. Mezi takové metody patří teplotou indukovaná tvorba gelu polooxamerů (například Pluronic[®], patent US 2 741 573). Tyto preparáty jsou při nízké teplotě tekuté, ale při teplotě zvýšené, jako je například teplota těla, vytvářejí gel. U těchto systémů je problémem kontrola uvolňování v důsledku rozdílů v okolní teplotě a teplotách v různých anatomických částech těla, zejména při použití subkutánního injekčního podání.

Podobně jako u gelových systémů organické povahy nejsou tyto systémy vhodné pro křehké proteinové léky, které se destabilizují v přítomnosti organických rozpouštědel nebo za nefyzio-

gických podmínek. K prodloužení aktivity penicilinu byly použity také thixotropní gely tvořené aluminium stearátem v olejích. Buckwalter et al, J. Am. Pharm. Assoc., 137: 472 (1948); Thompson, R.E., American Journal Clinical Nutrition, 7: 311 (1959); Thompson, Robert E., Sustained Release of Parenteral Drugs, Bulletin of Parenteral Science and Tech., 35, 106 (1981).
 5 Proteiny mají tendenci k destabilizaci v přítomnosti těchto typů systémů obsahujících olej.

Transportní systémy s trvalým uvolňováním léků zahrnující kontrolované zpoždění tvorby gelu v těle nejsou v oboru obecně známy. Tyto typy zpožděných gelových systémů jsou však známy v kontextu rostlinných tkáňových kultur, imobilizace buněk, tvorby mikrokuliček, uvolňování
 10 insekticidů a v potravinářském průmyslu. Algináty byly například použity s nerozpustnými komplexy kalcia a δ -glukonolaktonu jako donoru protonu pro uvolnění kalciových iontů do roztoku pro vytvoření gelu. Viz Draget et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., 31: 79–83 (1989). Podobné systémy byly použity i pro tvorbu alginátových partikul pomocí emulzifikace/vnitřní tvorby gelu. Alginátové mikrokuličky byly připraveny za použití alginátu rozptýleného v rostlinném
 15 oleji a při tvorbě gelu inicializovaném snížením pH, aby došlo k uvolnění kalcia z nerozpustného komplexu. Viz Poncelet, D. et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., 43: 644–650 (1995). Alginátové systémy byly také použity k imobilizaci buněk. Burke, C. ukázal v Methods of Enzymology, 135: 175–189 (1987), že di-kalcium fosfát a δ -glukonolakton mohou být použity spolu s alginátem ke zpoždění gelifikace buněk. Patent US 4 053 627 ukazuje použití disků z alginátového gelu za
 20 účelem kontroly uvolňování insekticidu ve vodném prostředí. Tyto výše zmíněné možnosti použití nejsou určeny pro tvorbu depot gelu v těle za účelem trvalého uvolňování biologicky aktivních látek, obzvláště proteinů.

Z tohoto důvodu existuje potřeba vývoje gelových farmaceutických preparátů se zpožděným uvolňováním aktivní látky pro klinické aplikace. Takového postupu by se mohlo využít pro celou
 25 řadu rekombinantních i přirozených proteinů, které by mohly být konstantně a dlouhodobě uvolňovány z gelových preparátů se zpožděným uvolňováním a tím zajistit efektivnější klinické výsledky.

Předkládaný vynález zajišťuje tyto výhody. Gelové farmaceutické preparáty se zpožděným uvolňováním aktivní látky, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, zajišťují ochranu
 30 proteinů, snižují jejich degradaci a zpomalují rozpouštění se zvýšením stability a účinnosti proteinu. Farmaceutické preparáty předkládaného vynálezu představují také jednoduchý, rychlý a ne příliš drahý prostředek kontrolovaného uvolňování rekombinantního proteinu vedoucí k efektivním profylaktickým, terapeutickým nebo diagnostickým výsledkům.

Podstata vynálezu

Prvním aspektem předmětu vynálezu je gelotvorná farmaceutická kompozice s prodlouženým uvolňováním a zpožděnou tvorbou gelu, která obsahuje
 40

- a) alginát;
 - b) biologicky aktivní činidlo; a
 - c) alespoň jeden vázaný polyvalentní ion kovu,
- ve farmaceuticky vhodném nosiči nebo ředidle.

Výhodné subaspekty zahrnují následující provedení této kompozice:

- kompozice dále obsahuje d) alespoň jeden donor protonu schopný poskytnout hydrolýzou, jako důsledek špatné rozpustnosti nebo pomalého rozpouštění kyseliny, jejímž působením se uvolňuje vázaný polyvalentní ion kovu;
- 50 – donor protonu je zvolený z pufru, esteru, špatně rozpustné kyseliny, pomalu se rozpouštějící kyseliny nebo laktonu;
- donorem protonu je glukonolakton;

- polyvalentní ion kovu je směsí vázaného a nevázaného polyvalentního iontu kovu;
- kompozice dále obsahuje excipient nebo excipienty pro stabilizaci biologicky účinného činidla nebo alginátu;
- vázaný polyvalentní ion kovu je ve formě soli vybrané z fosfátů, tartrátů, sulfátů, karbonátů, hydroxidů nebo solí s anionty mastných kyselin;
- ion kovu je vybraný z manganu, stroncia, železa, hořčíku, vápníku, barya, mědi, hliníku nebo zinku;
- iontem kovu je vápník;
- alginát obsahuje alespoň 30 % guluronové kyseliny;
- podíl alginátu je alespoň 0,05 hmotnostního procenta;
- biologicky aktivní činidlo obsahuje protein;
- protein je vybraný z hematopoetických faktorů, kolonie stimulujících faktorů, faktorů účinkujících proti obezitě, růstových faktorů a protizánětlivých faktorů;
- protein je vybraný z leptinu, faktorů stimulujících kolonie granulocytů (G-CSF), růstových faktorů stimulujících kolonie (CSF), neurotrofických faktorů odvozených z mozkové tkáně (BDNF), neurotrofických faktorů odvozených z glií (GDNF), neurotrofického faktoru 3 (NT3), faktorů stimulujících kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), antagonistů receptoru interleukinu 1 (IL-1ra), interleukinu 2 (IL-2), vazebných proteinů pro faktor nekrózy nádorů (TNF-bp), růstových faktorů odvozených z megakaryocytů (MGDF), osteoprotegerinu (OPG), interferonů, erythropoetinu, keratinocytového růstového faktoru (KGF), inzulínu a jejich analogů nebo derivátů;
- biologicky aktivním činidlem je komplexované biologicky aktivní činidlo;
- komplexovaným biologicky aktivním činidlem je vysrážený protein;
- vysráženým proteinem je leptin vysrážený zinkem;
- kompozice je umístěná v injekční stříkačce.

Dalším aspektem předmětu vynálezu je kompozice definovaná výše pro použití jako léčivo, zejména pro léčení nadměrné hmotnosti, diabetes, vysoké hladiny krevních lipidů, arteriální sklerózy, arteriálních plátů, snížení nebo prevenci tvorby žlučových kamenů, nedostatečnosti hmoty beztukové tkáně, nedostatečné senzitivity na inzulín a mrtvice; deficiencie hematopoetických buněk, infekce a neutropenie; jakož i zánětu.

Podrobnější popis vynálezu

Předkládaný vynález se týká preparátů s trvalým uvolňováním účinné látky za použití alginátových gelů zpozdžujících její uvolňování. Gely s trvalým a zpozděným uvolňováním účinné látky zahrnují zejména thixotropní alginátové gely s biologicky účinnou látkou. Tento typ gelu zajišťuje výhodu účinné a vysoké koncentrace biologicky aktivní látky v alginátovém gelu se zpozděným uvolňováním, což umožňuje její trvalé uvolňování při dostatečné ochraně proteinu, snížené degradaci, zvýšené stabilitě a účinnosti aktivní látky. Navíc načasování tvorby gelu zajišťuje vyšší kontrolu jeho vlastností a podávání.

Jeden z aspektů předkládaného vynálezu tudíž zahrnuje gelový preparát s trvalým a zpozděným uvolňováním účinné látky, který je tvořený hydrofilním polymerem, biologicky aktivní látkou a alespoň jedním vázaným polyvalentním iontem kovu. Stupeň tvorby gelu je kontrolován hladinou volného kalcia, tj. nevázaným polyvalentním iontem kovu. Biologicky aktivní látka může být ve formě komplexu. Tvorba molekul ve formě komplexů a látky týkající se tvorby komplexu jsou dobře známy všem znalým oborů. Výše zmíněné preparáty mohou navíc obsahovat polyvalentní

iont kovu, který je směsí vázaných a nevázaných polyvalentních iontů kovů. V důsledku časové kontroly uvolňování těchto gelů se zpožděným uvolňováním mohou být tyto gely umístěny do těla, kde po injekční aplikaci vytvářejí gel. Navíc v důsledku thixotropní povahy preparátu v gelové formě mohou být tyto směsi injekčně aplikovány i ve formě gelu, například působením tlaku ze stříkačky, kde po podání vytváří preparát v těle opět gel.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu je zajištění gelového preparátu s trvalým a zpožděným uvolňováním účinné látky tvořeného hydrofilním polymerem, biologicky aktivní látkou, alespoň jedním vázaným polyvalentním iontem kovu a dále alespoň jedním donorem protonu schopným uvolnit vázaný polyvalentní iont kovu. Uvolnění protonu z jeho donoru uvolňuje kation z vázaného polyvalentního iontu kovu.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu je zajištění metod přípravy gelových preparátů s trvalým a zpožděným uvolňováním účinné látky, které jsou předmětem předkládaného vynálezu. Jedna metoda se skládá z kroků smíšení biologicky aktivní látky a hydrofilního polymeru s rozpouštědlem za vzniku první směsi. Ta je pak smíšena alespoň s jedním vázaným polyvalentním iontem kovu za vzniku druhé směsi. Alternativní metoda se skládá z kroků smíšení biologicky aktivní látky a hydrofilního polymeru s rozpouštědlem za vzniku první směsi. Ta je pak smíšena alespoň s jedním vázaným polyvalentním iontem kovu za vzniku druhé směsi, která je pak smíšena s alespoň jedním donorem protonu schopným uvolnit vázaný polyvalentní iont kovu. Vázaný polyvalentní iont kovu a donor protonu mohou být také přidány k první směsi společně, nebo může být donor protonu přidán k první směsi před přidáním vázaného polyvalentního iontu kovu. Navíc je také zahrnut krok izolace gelového preparátu s trvalým a zpožděným uvolňováním účinné látky.

Užívaným termínem vázaný polyvalentní iont kovu je myšlen polyvalentní iont kovu ve formě soli nebo chelátu, nebo ve formě iontového komplexu. Vázaným polyvalentním iontem kovu může být směs vázaných a nevázaných polyvalentních iontů kovů, z které může být, jak je uvedeno výše, uvolněn vázaný polyvalentní iont kovu. Zde užívaný termín donor protonu schopný uvolnit vázaný polyvalentní iont kovu se týká silných kyselin, slabých kyselin, nebo materiálů schopného tvorby kyseliny, například laktony nebo estery (vodnou hydrolyzou), nebo špatně rozpustná kyselina či pomalu se rozpouštějící kyselina, jako je například kyselina adipová.

Zde užívaný termín rozpouštědlo se týká vodných i nevodných rozpouštědel schopných disperze či rozpuštění biologicky aktivních látek, hydrofilních polymerů, polyvalentních iontů kovů, donorů protonu, nebo látek tvořících komplexy. Taková rozpouštědla jsou dobře známá každému znalému oboru. Způsob tvorby první i druhé směsi může být proveden metodami známými každému znalému oboru. Jedná se o následující metody, ačkoli nejen o tyto: nalévání a třepání, přidávání po kapkách, disperze, sprejování nebo míšení pomocí sprejových trysek, vzduchových trysek, atomizace a použití elektrického pole. Termínem disperze pro účely předkládaného vynálezu se rozumí kapalná, pevná nebo plynná disperze. Užívaným termínem izolace se rozumí izolace gelového preparátu s trvalým a zpožděným uvolňováním účinné látky, který je předmětem předkládaného vynálezu. Tyto izolační a purifikační postupy jsou dobře známy v oboru.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu je zajištění přípravy gelových preparátů s trvalým a zpožděným uvolňováním účinné látky za pomoci výše uvedených metod. Další metody zahrnují výše zmíněné gelové preparáty s trvalým a zpožděným uvolňováním účinné látky s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo adjuvantní látkou. Navíc může být gelový preparát se zpožděným uvolňováním účinné látky obsažen v injekční stříkačce.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu je zajištění metod léčby a indikací pro použití gelových preparátů s trvalým a zpožděným uvolňováním účinné látky, obsahujících požadované biologicky aktivní látky.

Detailní popis vynálezu

Složení

Hydrofilní polymery zahrnující algináty a jejich deriváty mohou být získány z různých komerčních, přirozených či syntetických zdrojů dobře známých v oboru. Zde užívaný termín hydrofilní polymer se týká ve vodě rozpustných polymerů nebo polymerů s afinitou k vodě. Hydrofilní polymery jsou dobře známy každému znalému oboru a zahrnují, ačkoli nejsou limitovány na: polyanionty, včetně anionických polysacharidů, jako jsou například, alginát, gelan, karboxymetylamylóza, soli kyseliny polyakrylové, soli kyseliny polymetakrylové, etylen maleic anhydrid kopolymer (poloviční ester), karboxymethylcelulóza, dextransulfát, heparin, karboxymetyldextran, karboxycelulóza, 2,3-dikarboxycelulóza, trikarboxycelulóza, karboxy arabská guma, karboxy karagenan, karboxy pektin, karboxy tragakantová guma, karboxy xantanová guma, pentosan polysulfát, karboxy škrob, karboxymetyl chitin/chitisan, curdlan, inozitol hexasulfát, β -cyklo-dextrin sulfát, hyaluronová kyselina, chondroitin-6-sulfát, dermatan sulfát, heparin sulfát, carboxymetyl škrob, karagenan, polygalakturonát, karboxy guarová guma, polyfosfát, polyaldehydo-karbonová kyselina, poly-1-hydroxy-1-sulfonát-propen-2, kopolystyren kyseliny maleinové, agaróza, mezoglykan, sulfopropylované polyvinyl alkoholy, celulóza sulfát, protamin sulfát, fosfoguarová guma, polyglutamová kyselina, polyaspartátová kyselina, polyamino kyseliny, jejich deriváty nebo kombinace. Každý znalý oboru ocení i další rozličné hydrofilní polymery, které jsou v rozsahu předkládaného vynálezu.

Podobně mohou být i vázané polyvalentní ionty kovů získány z rozličných komerčních, přirozených nebo syntetických zdrojů, které jsou dobře známy v oboru. Vázané nebo sekvestrované polyvalentní ionty kovů v rozsahu předkládaného vynálezu zahrnují, ale nejsou limitovány na: mangan, stroncium, železo, hořčík, kalcium, barium, měď, hliník, nebo zinek. Ionty kovů mohou být získány z rozpustných solí látek tvořících komplexy, acetátů, fosfátů, laktátů, tartarátů, citrátů, sulfátů, chloridů, karbonátů, hydroxidů, nebo aniontů mastných kyselin, jako jsou například oleáty. Každý znalý oboru ocení další rozličné vázané polyvalentní ionty kovů/-komplexy, které jsou v rozsahu předkládaného vynálezu. Vázané polyvalentní ionty kovů mohou zahrnovat směs vázaných a nevázaných polyvalentních iontů kovů.

Zde užívané donory protonů se týkají materiálu, který může tvořit kyseliny. Donory protonů jsou schopné uvolnit vázaný nebo sekvestrovaný polyvalentní iont kovu. Donory protonů jsou dobře známy v oboru a zahrnují, ale nejsou limitovány pouze na: laktony, jako jsou například glukonolaktony, estery, pufrů a jiné pomalu se rozpouštějící kyseliny. Zde používané pomalu se rozpouštějící kyseliny se týkají kyselin, jako jsou pevné kyseliny s nízkou rozpustností v rozpouštědlech. Pomalu se rozpouštějící kyseliny navíc zahrnují zařízení nebo potažené materiály, které pomalu uvolňují kyseliny. Dobře známé kyseliny v rozsahu oboru zahrnují kyselinu octovou, adipovou, citrónovou, fumarovou, glukonovou, mléčnou, jablečnou, fosforečnou a vinnou. Každý znalý oboru ocení rozličné donory protonů, které jsou v rozsahu předkládaného vynálezu.

Zde užívaný termín pufr nebo pufrovací roztok se týká použití anorganických nebo organických kyselin nebo zásad, či jejich kombinací, k přípravě roztoku pufru tak, jak je známo v oboru. Ty také zahrnují amfoterní materiály nebo aminokyseliny. Anorganické kyseliny v rozsahu předkládaného vynálezu zahrnují hydrogen halid (například kyselina chlorovodíková), kyselinu fosforečnou, dusičnou nebo sírovou. Další anorganické kyseliny jsou dobře známy každému znalému v oboru a jejich použití je zde předpokládáno. Organické kyseliny v rozsahu předkládaného vynálezu zahrnují alifatické karboxylové kyseliny a aromatické kyseliny, jako jsou například kyselina mravenčí, karbonová, octová, propionová, máselná, valerová, kapronová, akrylová, malonová, jantarová, glutarová, adipová, maleinová, fumarová, glycin nebo kyselina fenol-sulfonová. Další anorganické kyseliny jsou dobře známy každému znalému v oboru. Organické zásady zahrnují TRIS[®], pyridin, PIPES[®] a HEPES[®]. Aminokyselinové pufrů zahrnují glycinový pufr a pufr s glycinem/kyselinou fosforečnou.

Zde užívaný termín biologicky aktivní látky se týká rekombinantních nebo přirozeně se vyskytujících proteinů, humánního i živočišného původu, které jsou užitečné v profylaktických, terapeutických nebo diagnostických aplikacích. Tento termín se dále týká nebílkovinných látek, jako například malých molekul, oligonukleotidů a anorganických i organických látek. Biologicky aktivní látka může být přirozené, syntetické, semisyntetické povahy, nebo se může jednat o jejich deriváty. Biologicky aktivní látky, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, mohou být schopny precipitace. Je předpokládáno široké množství biologicky aktivních látek. Ty zahrnují, ale nejsou však limitovány pouze na: hormony, cytokiny, hematopoetické faktory, růstové faktory, faktory působící proti obezitě, trofické faktory, proti zánětlivé faktory a enzymy (viz také patent US 4 695 463, kde jsou uvedeny další příklady užitečných biologicky aktivních látek). Každý znalý oboru bude schopen snadno přizpůsobit požadovanou biologicky aktivní látku preparátům, které jsou předmětem předkládaného vynálezu.

Tyto proteiny zahrnují, ale nejsou limitovány pouze na: interferony (viz patenty US 5 372 808, US 5 541 293, US 4 897 471 a US 4 695 623, které jsou tímto začleněny jako reference včetně vyobrazení), interleukiny (viz patent US 5 075 222, který je tímto začleněn jako reference včetně vyobrazení), erythropoetiny (viz patenty US 4 703 008, US 5 441 868, US 5 618 698, US 5 547 080, které jsou tímto začleněny jako reference včetně vyobrazení), kolonie granulocytů stimulující faktory (G-CSF) (viz patenty US 4 810 643, US 4 999 291, US 5 582 823, a PCT publikace WO 94/171185, které jsou tímto začleněny jako reference včetně vyobrazení), faktor kmenových buněk (PCT publikace WO 91/05795, 92/17505 a 95/17206, které jsou tímto začleněny jako reference včetně vyobrazení) a OB protein (viz PCT publikace WO 96/40912, 96/05309, 97/00128, 97/01010 a 97/06816, které jsou tímto začleněny jako reference včetně vyobrazení). Biologicky aktivní látky mohou navíc také zahrnovat, ačkoli nejsou pouze limitovány na: produkty mající účinky proti obezitě, inzulin, gastrin, prolaktin, adrenokortikotropní hormon (ACTH), thyroideální stimulující hormon (TSH), luteinizační hormon (LH), folikuly stimulující hormon (FSH), lidský choriový gonadotropin (HCG), motilin, interferony (alfa, beta, gama), interleukiny (IL-1 až IL-12), tumor necrosis faktor (TNF), vazebný protein pro tumor necrosis faktor (TNF-bp), z mozkové tkáně odvozený neurotrofický faktor (BDNF), z glií odvozený neurotrofický faktor (GDNF), neurotrofický faktor 3 (NT3), fibroblastové růstové faktory (FGF), neurotrofický růstový faktor (NGF), kostní růstové faktory, jako jsou například osteoprotegerin (OPG), inzulinu podobné růstové faktory (IGF), kolonie makrofágů stimulující růstový faktor (M-CSF), kolonie granulocytů a makrofágů stimulující faktor (GM-CSF), z megakaryocytů odvozený růstový faktor (MGDF), keratynocytový růstový faktor (KGF), trombopoetin, z destiček odvozený růstový faktor (PGDF), kolonie stimulující růstové faktory (CSF), kostní morfogenetický protein (BMP), superoxiddismutáza (SOD), aktivátor tkáňového plazminogenu (TPA), urokináza, streptokináza a kalikrein. Zde užívaný termín proteiny zahrnuje peptidy, polypeptidy, konzervativní molekuly, analoga, deriváty nebo jejich kombinace.

Deriváty biologicky aktivních látek mohou zahrnovat sloučeniny s připojenými jednou nebo více chemickými skupinami k molekule bílkoviny. Bylo prokázáno, že chemická modifikace biologicky aktivních látek za určitých okolností, jako jsou například zvýšení stability a doby v cirkulaci daného terapeutického proteinu, či snížení imunogenity, nepřináší další výhody. Každý znalý oboru bude schopen zvolit požadovanou chemickou modifikaci na podkladě požadovaného dávkování, doby cirkulace, rezistence vůči proteolýze, terapeutického použití a dalších faktorů. Žádoucí jsou deriváty jako například polyetylen glykol a Fc fúzní proteiny.

Komplexy

Biologicky aktivní látka může být ve formě komplexu. Ty zahrnují precipitované formy, strukturované formy a asociace s jinými molekulami. Tyto komplexní formy účinné látky mohou snižovat stupeň difúze této látky z gelu a tudíž udržovat její uvolňování. Tyto komplexní formy zahrnují, ačkoli nejsou limitovány pouze na: biologicky aktivní látky v komplexu s protilátkami, substráty, receptory, lipidy, polymery a precipitující látkami.

Biologicky aktivní látky, analoga, nebo deriváty mohou být například podávány v komplexu s vazebnou složkou. Taková vazebná složka ve spojení s výše uvedenými prospěšnými vlastnostmi může vést k prodloužení cirkulační doby účinné látky, analoga nebo derivátu, nebo ke zvýšení aktivity biologicky účinné látky. Těmito složkami mohou být proteiny (nebo peptidy), deriváty, analoga, nebo kombinace nebiokovinných látek.

Pro ilustraci, vazebný protein pro OB protein je receptor pro OB protein, nebo jeho část, jakou je například jeho rozpustná část. Další vazebné proteiny mohou být nalezeny zkoumáním OB proteinu nebo zvoleného proteinu v séru, nebo mohou být zjištěny empiricky zkoumáním přítomnosti vazebných vlastností. Tyto vazebné vlastnosti nebudou typicky interferovat se schopností OB proteinu nebo analoga či derivátu vázat se na endogenní receptor pro OB protein a/nebo ovlivňovat signální transdukcii. Kromě OB proteinu je možno použít vazebné komplexy také u jiných terapeutických proteinů, které jsou předmětem předkládaného vynálezu. Všichni znalí oboru budou schopni zjistit příslušné vazebné proteiny pro použití s předkládaným vynálezem.

Podobně mohou být získány také precipitační látky používané k precipitaci biologicky aktivní látky, a to z různých komerčních, přirozených nebo syntetických zdrojů, které jsou dobře známy v oboru. Precipitující látky zahrnují, ačkoli nejsou limitovány pouze na: polyvalentní ionty kovů nebo jejich soli, jako jsou acetáty, citráty, chloridy, karbonáty, hydroxidy, oxaláty, tartaráty, nebo jejich hydroxidy, kyseliny, nebo ve vodě rozpustné polymery. Ionty kovů zahrnují zejména, ačkoli nejsou limitovány pouze na: ionty hliníku, baria, vápníku, železa, manganu, hořčíku, stroncia a zinku. Ionť kovů je nejlépe zinek nebo jeho soli, jako například acetát chloridové soli. Mohou být také použity ve vodě rozpustné malé molekuly a soli, jako jsou například amonium sulfát, aceton, etanol a glycerol.

Podobně jako pro ve vodě rozpustné polymery zahrnují výše uvedené molekuly, ačkoli nejsou limitovány pouze na: polyetylen glykol, etylen glykol/propylen glykol kopolymery, hydroxymethylcelulózu, dextran, polyvinyl alkohol, polyvinyl pyrrolidon, poly 1,3 dioxolan, poly- 1,3,6-trioxan, etylen/maleic anhydrid kopolymery, polyaminokyseliny, dextran, poly (n-vinyl pyrrolidon), polyetylen glykol, propylen glykol homopolymery, polypropylen oxid/etylen oxid kopolymery, polyoxyetylované polyoly, polyvinyl alkohol sukcinát, glycerin, etylen oxidy, propylen oxidy, poloxamery, alkoxylované kopolymery, ve vodě rozpustné polyanionty, jejich deriváty či kombinace. Ve vodě rozpustný polymer může mít jakoukoli molekulovou váhu a může být větvený i nevětvený. Preferovaná molekulová váha polyetylen glykolu je kupříkladu okolo 700 kDa a zhruba 100 kDa pro usnadnění manipulace a účinnosti precipitace.

Mohou být použity i jiné velikosti a typy precipitujících látek v závislosti na požadovaném terapeutickém profilu (např. trvání požadovaného trvalého uvolňování, účinky, pokud jsou, na biologickou aktivitu, jednoduchost manipulace, stupeň či chybění antigenních vlastností a další známé účinky požadované precipitující látky vůči terapeutickému proteinu nebo analogu). Každý znalý oboru ocení další precipitující látky, které jsou v rozsahu předkládaného vynálezu.

Navíc preparáty předkládaného vynálezu mohou také zahrnovat extra excipientní látky nezbytné pro stabilizaci biologicky aktivní látky a/nebo hydrofilní polymer. Tyto excipientní látky mohou být obsaženy v pufru a mohou zahrnovat konzervační látky, ačkoli nejsou limitovány pouze na ně.

Farmaceutické preparáty

Farmaceutické preparáty s trvalým uvolňováním účinné látky, které jsou předmětem předkládaného vynálezu mohou být podávány perorálně (např. tekuté preparáty umožňující tvorbu gelu v žaludku nebo ve střevě), anebo jako preparáty, které nejsou určeny k perorální aplikaci (například preparáty intramuskulární, subkutánní, transdermální, viscerální, IV (intravenózní), IP (intraperitoneální), intraartikulární, nitroušní, ICV (intracerebroventrikulární), IP (intraperitoneální), intraarteriální, intrathekální, intrakapsulární, intraorbitální, injekční, plicní, nosní, rektální a děložně transmukosální. Předkládaný vynález zahrnuje obecně gelové farmaceutické preparáty

- s trvalým a zpožděným uvolňováním účinné látky, které obsahují účinná množství proteinu, nebo jeho derivátů, s trvalým uvolňováním preparátů, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, spolu s farmaceuticky přijatelnými diluenty, konzervačními, solubilizačními, emulzifikujícími a adjuvantními látkami, a/nebo nosiči potřebnými pro aplikaci. (viz PCT WO 97/01331, který je tímto začleněn jako reference). Optimální farmaceutický preparát určený pro požadovanou biologicky aktivní látku se určí v závislosti na způsobu podání a požadované dávce. Příklady farmaceutických preparátů jsou uvedeny v publikaci Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., 18. vydání, Easton, PA, strany 1 435–1 712 (1990)).
- 5 V důsledku thixotropní povahy gelových preparátů se zpožděným uvolňováním účinné látky, může být použito injekční stříkačky k subkutánnímu podání. Preparát může vytvořit v injekční stříkačce gel pro pozdější použití. Tvorba gelu může probíhat s určitým zpožděním. Toto časování je kontrolováno vhodnou úpravou množství látky způsobující tvorbu gelu a také donoru protonu, pokud je používán, stejně tak jako velikosti částic polyvalentního iontu kovu a teploty směsi. Takové preparáty jsou určeny pro pozdější znovu-tvorbu gelu v těle po injekční aplikaci. Zde užívaný termín thixotropní se týká viskozity směsi gelu, která se snižuje při působení tlaku, například při stlačení pístem stříkačky, kdy může směs téci, například skrz jehlu stříkačky, a poté znovu vytvořit gel v místě injekčního podání.
- 10 Koncepce zpožděné tvorby gelu může být také aplikována na náplň stříkačky, kdy je stříkačka naplněna gelovým preparátem s trvalým uvolňováním účinné látky, a v určitém čase vytváří preparát ve stříkačce gel, například již po několika minutách či až po mnoha hodinách po naplnění. Tento fakt zabraňuje problémům s náplní stříkačky materiálem, který již vytvořil gel. Tyto předplněné stříkačky mohou být skladovány pro pozdější injekční podání pacientům.
- 15 Komponenty, které mohou být potřebné pro aplikaci zahrnují diluenty nebo pufrы o různém pH a iontové síle (například Tris HCl, acetát); aditiva, jako například surfaktanty a solubilizující látky (například Tween 80, HCO-60, Polysorbate 80), lipidy, lipozómy, antioxidační látky (například kyselina askorbová, glutathion, metabisulfit sodný), dodatečné polysacharidy (například karboxymethylcelulóza, alginát sodný, hyaluronát sodný, protamin sulfát, polyetylen glykol), konzervační látky (například Thimersol, benzyl alkohol, metyl paraben, propyl paraben) a stavební substance (například laktóza, manitol); inkorporaci materiálu se specifickými preparáty tvořenými polymerními sloučeninami, jako jsou například polymery nebo kopolymery kyselin polymléčné/polyglykolové atd., nebo kombinace s lipozómy. Jako komponenta vhodná pro aplikaci může být použita také kyselina hyaluronová, což může dokonce dále podpořit setrvání aktivní látky v cirkulaci. Preparáty s trvalým uvolňováním účinné látky, které jsou předmětem předkládaného vynálezu mohou být navíc také rozptýleny v olejích (například v sezamovém, kukuřičném nebo rostlinném oleji), nebo v jejich směsi s fosfolipidy (například lecitinem), nebo s triglyceridy tvořenými mastnými kyselinami se středně dlouhým řetězcem (například Miglyol 812) k vytvoření olejové suspenze. Preparáty předkládaného vynálezu mohou být také rozptýleny v disperzních látkách, jako jsou například ve vodě rozpustné polysacharidy (například manitol, laktóza, glukóza, škroby), hyaluronová kyselina, glycin, fibrin, kolagen a anorganické soli (například chlorid sodný).
- 20 Pro aplikaci preparátů s trvalým uvolňováním účinné látky jsou zamýšlena navíc také zařízení užívaná pro transport terapeutických produktů do plicní tkáně zahrnující, ačkoli se neomezuji pouze na: nebulizátory, dávkovací inhalátory a práškové inhalátory, zařízení známá každému znalému oboru.
- 25 Komponenty užívané pro aplikaci mohou ovlivnit fyzikální vlastnosti, stabilitu, stupeň uvolňování in vivo a také stupeň odstraňování in vivo proteinů a jejich derivátů. Každý znalý obor ocení příslušné komponenty určené pro aplikaci a/nebo příslušná mechanická zařízení v závislosti na terapeutickém použití, způsobu podání, požadovaném dávkování, cirkulační době, rezistenci k proteolýze, stabilitě proteinu a dalších faktorech.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50

Metody použití

Terapeutické. Terapeutická použití závisí na použité biologickyaktivní látce. Každý znalý oboru bude snadno schopen přizpůsobit požadovanou biologicky účinnou látku předkládanému vynálezu pro zamýšlené terapeutické použití. Terapeutická použití takových látek jsou detailněji uvedena v následujících publikacích, které jsou tímto začleněny jako reference včetně vyobrazení. Terapeutická použití zahrnují, ale nejsou limitována na: použití proteinů jako jsou interferony (viz patenty US 5 372 808, US 5 541 293, US 4 897 471 a US 4 695 623, které jsou tímto začleněny jako reference včetně vyobrazení), interleukiny (viz patent US 5 075 222, který je tímto začleněn jako reference včetně vyobrazení), erytropoetiny (viz patenty US 4 703 008, US 5 441 868, US 5 618 698, US 5 547 933 a US 5 621 080, které jsou tímto začleněny jako reference včetně vyobrazení), kolonie granulocytů stimulující faktory (viz publikace WO 94/17185, které jsou tímto začleněny jako reference včetně vyobrazení), faktor kmenových buněk (PCT publikace WO 91/05795, 92/17505 a 95/17206, které jsou tímto začleněny jako reference včetně vyobrazení), a OB protein (viz PCT publikace WO 96/40912, 96/00128, 97/01010 a 97/06816, které jsou tímto začleněny jako reference včetně vyobrazení).

Terapeutické použití, které je předmětem předkládaného vynálezu navíc zahrnuje použití biologicky aktivních látek, které zahrnují, ačkoli nejsou pouze limitovány na: produkty mající účinky proti obezitě, inzulin, gastrin, prolaktin, adrenokortikotropní hormon (ACTH), thyroideální stimulující hormon (TSH), luteinizační hormon (LH), folikuly stimulující hormon (FSH), lidský choriový gonadotropin (HCG), motilin, interferony (alfa, beta, gama), interleukiny (IL-1 až ILK-12), tumor necrosis faktor (TNF), vazebný protein pro tumor necrosis faktor (TNF-bp), z mozkové tkáně odvozený neurotrofický faktor (BDNF), z glií odvozený neurotrofický faktor (GDNF), neurotrofický faktor 3 (NT3), fibroblastové růstové faktory (FGF), neurotrofický růstový faktor (NGF), kostní růstové faktory, jako jsou například osteoprotegerin (OPG), inzulinu podobné růstové faktory (IGF), kolonie makrofágů stimulující růstový faktor (M-CSF), kolonie granulocytů a makrofágů stimulující faktor (GM-CSF), z megakaryocytů odvozený růstový faktor (MGDF), keratynocytový růstový faktor (KGF), trombopoetin, z destiček odvozený růstový faktor (PGDF) kolonie stimulující růstové faktory (CSF), kostní morfogenetický protein (BMP), superoxiddismutáza (SOD), aktivátor tkáňového plazminogenu (TPA), urokináza, streptokináza a kalikrein. Zde užívaný termín proteiny zahrnuje peptidy, polypeptidy, konzervativní molekuly, analoga, deriváty nebo jejich kombinace. Předkládané preparáty mohou být také použity pro výrobu jednoho nebo více léčiv pro léčbu nebo zmírnění příznaků onemocnění, ke kterému je použití biologicky aktivní látky zamýšleno.

Kombinační léčba. Předkládané preparáty a metody mohou být použity ve spojení s jinými terapeutickými možnostmi, jako jsou například dietní opatření a cvičení. Jiné léky, jako jsou například léky používané pro léčbu diabetu (například inzulin, případně amylin), léky snižující hladinu cholesterolu a krevní tlak (jako například léky snižující hladiny krevních lipidů, nebo jiné kardiovaskulární léky), léky zvyšující aktivitu (například amfetaminy), diuretika (pro vyloučení tekutin) a léky potlačující chuť k jídlu. Podání těchto léků může být současné nebo může být in seriatim. Předkládané metody mohou být navíc použity ve spojení s chirurgickými zákroky, jako jsou například kosmetické chirurgické zákroky pozměňující celkový vzhled těla (například liposukce nebo laserové zákroky snižující tělesnou hmotu, nebo implantační chirurgické zákroky zvyšující tělesnou hmotu). Zdravotní prospěch z kardiálních srdečních zákroků, jako jsou například by-passové operace nebo jiné zákroky zmírňující závažný stav způsobený bloádou krevních cév depozity tuku, jako je například arteriální plát, může být zvýšen současným použitím předkládanými preparáty a metodami. Metody na odstranění žlučových kamenů, jako jsou například ultrazvukové a laserové metody mohou být také použity, a to buď před, během, nebo po použití předkládaných terapeutických metod. Předkládané metody mohou být navíc použity jako doplněk k chirurgickým zákrokům nebo léčbě zlomenin kostí, poškození svalů, nebo jiným terapeutickým postupům, jejichž účinek by byl zlepšen zvýšením hmoty zdravé tkáně.

Dávkování

Každý znalý oboru bude schopen určit efektivní dávkování podle pozorování požadovaného terapeutického účinku po podání účinné látky. Dávka preparátu s trvalým uvolňováním účinné látky je množství látky nezbytné k dosažení účinné koncentrace biologicky účinné látky in vivo pro daný časový úsek. Dávka a preferovaná četnost podávání preparátů s trvalým uvolňováním účinné látky závisí na typu biologicky účinné látky, požadovaném trvání uvolňování, typu onemocnění, požadované četnosti podávání, živočišném druhu a jiných faktorech. Přednostní dávkování molekuly bude takové, že dávka mezi 0,10 ug/kg/den a 100 mg/kg/den přinese požadovaný terapeutický efekt.

Efektivní dávkování může být určeno za použití diagnostických metod. Příkladem je dávkování OB proteinu, které je uváděno v předkládaném vynálezu. Nejprve by mělo být stanoveno množství endogenního OB proteinu v krvi (nebo plazmě či séru) pomocí určitého diagnostického způsobu. Takovým způsobem je například použití testu s protilátkou, jako je například sendvičový test s protilátkou. Množství endogenního OB proteinu je iniciálně kvantifikováno a je určena výchozí hodnota. Terapeutická dávka je určena jako množství endogenního a exogenního OB proteinu (což znamená proteinu, jeho analoga či derivátu detekovaného v těle, buďto vlastní produkce nebo aplikovaného), které je změřeno v průběhu terapie. Kupříkladu může být na počátku terapie potřeba vyšší relativní dávky až do dosažení terapeutického účinku, a poté je možno použít nižších dávek k udržení tohoto účinku.

Materiál a Metodika

Materiál. Alginát ve formě alginátové soli může být získán ze zdrojů, nebo může být připraven metodami dobře známými v oboru. Leptin, G-CSF a interferon jsou od společnosti Amgen Inc. Ostatní chemikálie jsou ze zdrojů dobře známých v oboru.

Příprava gelů se zpožděným uvolňováním účinné látky – Úvod. Gel se zpožděným uvolňováním účinné látky je připraven kombinací biologicky aktivní látky a anionického polymeru (například alginátu), směsí s polyvalentní kationickou solí (například CaCO_3) a donorem protonu (například okyselený pufr nebo pomalu se uvolňující nebo rozpouštějící se kyselina, jako například δ -glukonolakton), pokud je použit. Ve všech případech může být anionický polymer, protein a jakékoli precipitanty/excipienty připraveny jako jedna směs. Tvorba gelu je zahájena přidáním polyvalentní kationické soli a zdroje protonu, pokud je používán, do této směsi. Přidání protonu, polyvalentního iontu kovu ke směsi polymeru a biologicky aktivní látky může proběhnout současně, nebo separátně s přidáním nejprve donoru protonu nebo nejprve polyvalentního iontu kovu. Pro pufr indukovanou tvorbu kovu může být polyvalentní kationická sůl a zdroj protonů smíšen jako vodná suspenze předem před vznikem gelu. Po zahájení tvorby gelu jsou naplněny injekční stříkačky před vytvořením gelu (typicky 5 až 10 minut). Injekce může být aplikována před tvorbou gelu (pro in situ gelifikaci), nebo poté, co proběhne vytvoření gelu.

Protein-alginátová směs. Je připravena směs rozpouštědla a precipitantu/excipientu (například zinkové soli, pufr, atd.). V rychlém sledu je rychle smíšen roztok proteinu (například leptinu v 10 mM Tris HCl, pH 8) a sterilního alginátu (například autoklávovaný 10% roztok). V případě, že je biologicky aktivní látka připravena jako jemná suspenze (například zinek/leptinový komplex je typicky utvářen v koncentraci 10 až 15 mg/ml), je žádoucí suspenzi zakonzentrovat.

Kalciová sůl. Kalciová sůl může být připravena jako autoklávovaná suspenze jemného prášku ve vodě (například 9,1% CaCO_3 ve vodě).

Zdroj protonu. Pro pufr indukované gely může být suspenze kalciové soli zkombinována s pufr, jako je například 1M Tris HCl, pH 7,0 nebo 0,5 M PIPES, pH 6,7.

Pro pomalu se rozpouštějící, nebo pomalu se uvolňující zdroje kyselin (δ -glukonolakton) je rozpuštěno ve vodě ve zvoleném čase krátce před použitím dané množství prášku. Ke zjednodušení procesu může být také použita předem navážená směs suchého sterilního prášku zdroje kyseliny a kalciové soli.

5

Rozpouštědlo. Rozpouštědlo může být vodné, nevodné, nebo směs obou. Příkladem nevodného rozpouštědla je dimetylsulfoxid, dimetylformamid, glycerol, polyetylen glykol, Pluronic[®] atd.

10 Tvorba gelu. Tvorba gelu směsi polymer-lék může být zahájena přidáním kalciové sole. Ke kontrole rychlosti tvorby gelu mohou být použity teplota směsi, a množství a velikost částic soli. Pokud se navíc používá donor protonu může být tvorba gelu zahájena přidáním buďto 1) suspenze kalciové soli a okyseleného pufru (odděleně nebo společně), 2) suspenze kalciové soli a následně čerstvým roztokem/suspenzí pomalu se uvolňujícího se zdroje protonů nebo vice versa, nebo 3) prášku kalciové soli a zdroje protonů, buďto společně, nebo odděleně. Po přidání 15 kalciové soli mohou být ke směsi přidány další precipitanty/excipienty (například zinkové soli, pufrů atd.). Po úplném a rychlém promíchání může být směs nanášena do stříkačky ještě před vytvořením gelu.

20 Nanášení gelu. Nanášení proteinu je obecně známo. Nanášení gelu, které není známé, může být určeno následujícími metodami.

25 Metoda přímého určení proteinu v gelu (Burst metoda). Do eppendorfky je nanášeno 0,1 až 2 ml (přesně zváženo) gelu a poté rozpuštěno v 1 ml 0,1M citrátu sodného. Směs je inkubována při pokojové teplotě a jemně promíchávána až dojde k dezintegraci gelu (obvykle doba od 2 hodin až přes noc). Po centrifugaci výsledné suspenze při 8000 otáčkách za minutu po dobu 2 minut (eppendorfka 5415 C) je odečtena absorbance supernatantu při vlnové délce 280 nm. Reziduální sediment je rozpuštěn v 1 ml 7M urey a je odečtena absorbance tohoto roztoku. Z těchto absorbancí může být vypočteno množství proteinu na gram gelu.

30 Kumulativní metoda. Tato metoda je používána ve spojení se studiemi zaměřenými na uvolňování účinné látky za podmínek in vitro. Je vypočteno celkové množství uvolněného proteinu z gelu zahrnující maximální uvolnění na konci studie. Details jsou uvedeny v kapitole Studie zaměřené na uvolňování účinné látky za podmínek in vitro.

35 Studie zaměřené na uvolňování účinné látky za podmínek in vitro. Gel je vytvořen buďto v eppendorfce („odlité“ vzorky), nebo v injekční stříkačce, odkud je poté vytlačen do eppendorfky („vytlačené“ vzorky). Obecně je vytvořeno ve formě odlitku, nebo je vytlačeno okolo 0,1 až 0,2 ml gelu (množství je přesně zváženo) Uvolňování je zahájeno přidáním pufru (10 mM Tris HCl, pH 8 pro leptin, pH 7,4 pro GCSF) ke každé zkumavce s následným 40 umístěním do inkubační třepačky (New Brunswick Scientific) při teplotě 37 °C a 100 až 200 otáčkách za minutu. Ve zvolených časových intervalech je vzorek vyjmut z inkubátoru. Pokud je gel intaktní, je odebrán supernatant a zcentrifugován (eppendorfka, 8000 otáček za minutu, 2 minuty) a supernatant je stažen. Sediment je suspendován v 1 ml čerstvého Tris pufru a roztok je vrácen do původní „uvolňovací“ zkumavky. Pokud je gel z velké části poškozen, je celý obsah zkumavky zcentrifugován, supernatant je stažen a sediment resuspendován v 1 ml pufru 45 k opětovnému uvolňování. Supernatant může vyžadovat další centrifugaci (8000 až 13 000 otáček za minutu, 8 minut) k jeho vyčištění před UV detekcí. Množství uvolněného proteinu je určeno z absorbance supernatantu. Poté, co je odebrán poslední vzorek s uvolněným proteinem, je obsah proteinu v původní zkumavce určen pomocí Burst metody (viz výše). Procento uvolněného proteinu v daném čase je určeno z kumulativního uvolněného proteinu vyjádřeného jako 50 část buďto původního proteinu umístěného v gelu (výpočet podle váhy gelu a jeho složení), nebo z konečného celkového uvolněného množství proteinu (včetně proteinu uvolněného metodou s citrát-ureou).

In vivo studie.

Úbytek hmotnosti myši. Šest až osm týdnů staré samice myši, typ C57/BLC byly získány od společnosti Charles River and Taconic Inc. Všechny vážily 20 gramů. Každá skupina lišící se dávkou byla tvořena pěti myšmi. Injekce byly subkutánní.

Krysí PK studie. V této studii byly používány samci krys vážící typicky 250 až 300 gramů. Injekce byly provedeny podobným způsobem jako je popsáno u experimentů s úbytkem hmotnosti myši. Krev byla odebírána katetrem v různých časových intervalech po injekčním podání a vzorky byly analyzovány na přítomnost leptinu pomocí ELISA analýzy.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady jsou uvedeny, aby detailněji ilustrovaly vynález, ale nejsou předkládány jako limitující rozsah předkládaného vynálezu. Navíc s ohledem na výše uvedené skutečnosti či příklady uvedené níže, každý znalý oboru bude schopen provést změny nezbytné pro přípravu velkých objemů.

Příklad 1

Tento in vivo příklad ukazuje, že leptin v pufru indukovaném gelu se zpožděným uvolňováním účinné látky je aktivní a vykazuje trvalé uvolňování ve srovnání s roztokem leptinu. Tento příklad také ilustruje systém, který napomáhá tvorbě gelu po injekčním podání zvířeti. Sterilní suspenze kalcium karbonátu byla připravena z prosetého materiálu o velikosti menší než 75 mikronů. Směs tohoto materiálu s Tris pH 7 byla přidána k leptinu v alginátu (v 10 mM Tris pH 8) tak, že finální koncentrace látek byly: 2 % alginátu (sterilní, zfiltrovaný), 10 mg/ml leptinu, 7 mM Tris pH 8, 150 mM Tris pH 7 a 24 mM CaCO₃ (za předpokladu kompletního rozpuštění). Tato směs vytvářela gel během osmi až devíti minut. Pokud byl vynechán leptin, byla doba tvorby gelu mírně prodloužena (10 až 12 minut), což umožnilo nanést gel do stříkaček.

Gelový preparát se zpožděným uvolňováním účinné látky byl injekčně aplikován (stále ještě za nepřítomnosti gelu) jedné skupině myši každý v dávce 100 mg/ml 50 mg/kg (2 dny v dávce 50 mg/kg). Druhé skupině byl injekčně aplikován roztok leptinu (v Tris pufru v koncentraci 10 mg/ml) denně v koncentraci 50 mg/ml a třetí skupina obdržela roztok leptinu každý druhý den v dávce 100 mg/den. Myši byly denně váženy a změna hmotnosti byla vyjádřena jako procento původních hmotností myši.

Obden dávkovací schéma s podáváním gelu se zpožděným uvolňováním účinné látky vedlo téměř ke stejnému úbytku hmotnosti jako v případě denního injekčního podávání leptinu (8 až 9 %). Na druhou stranu roztok leptinu aplikovaný obden vedl k nižšímu úbytku hmotnosti (6 %), které bylo kratšího trvání. Tato skupina se vrátila ke své původní hmotnosti za 8 dnů, zatímco ostatní skupiny dosáhly svých původních hmotností až za 10 až 11 dnů.

Příklad 2

Tento příklad ukazuje, že produkce pufru indukovaného kalcium alginátového gelu se zpožděným uvolňováním účinné látky může prodloužit za podmínek in vitro trvalé uvolňování účinné látky ve srovnání s preparáty nevytvářející gel. Suspenze kalcium karbonátu byla připravena jako 10 mg/ml suspenze velmi jemného prášku. Směs tohoto materiálu s PIPES pufrům o pH 6,7 byla přidána k suspenzi zinek–leptin v alginátu. (v Tris pufru pH 8), která byla vytvořena z koncentrovaného roztoku leptinu (83 mg/ml v Tris pH 8 v čase, kdy byl přidán zinek). Jeden ml takové směsi byl nanesen do 10 ml nádoby. Finální koncentrace všech složek byly následující: 2%

alginát (z autoklávaného 10% roztoku Keltone LVCR), 15 mM Tris pH 8, 50 mg/ml leptinu, 1 mM CaCO_3 (za předpokladu úplného rozpuštění) a 93 mM PIPES pH 6,7. Za nepřítomnosti leptinu došlo k vytvoření gelu z této směsi za 7 minut. Po tvorbě gelu, která probíhala přes noc, byly 0,2 g části gelu zváženy a umístěny do scintilačních vialek určených pro uvolňování účinné látky, které byly dány na třepačku při 37 °C. Uvolňování účinné látky bylo srovnáváno s uvolňováním z téhož preparátu bez kalcia a PIPES (nejednalo se o kalcium alginátový gel). Po uvolňování obohaceného preparátu obsahující zinek–leptin alginát byla hodnota 75 % s postupným uvolňováním do 90 % po třech dnech. Ovšem zinek–leptin v kalcium alginátovém gelu se zpožděným uvolňováním – 35 % za 65 hodin, 60 % za jeden den poté mnohem postupnější uvolňování až na 70 % po pěti dnech.

Příklad 3

Tento příklad ukazuje, δ -glukonolaktonem indukovaný gel obsahující leptin jako jemný zinkový precipitát určuje uvolňování leptinu. Leptin (zhruba 14 mg/ml v Tris pH 8) byl přidán do roztoku PIPES o pH 6,7 a poté byl okamžitě vmíšen roztok ZnCl_2 rychle následován roztokem alginátu (autoklávaný 10% roztok), tak že finální koncentrace složek byla 1,1 mM ZnCl_2 , 2,2% alginát, 10 mM Tris (pH 8) a 22 mM PIPES (pH 6,7). Směs byla zakoncentrována centrifugací až do dosažení koncentrace leptinu 46 mg/ml. Gelová směs byla poté vytvořena promícháním v suspenzi CaCO_3 (jemný prášek) s rychlým přidáním roztoku δ -glukonolaktonu. Finální koncentrace složek byla: 2% alginát, 20 mM PIPES, 9 mM Tris, 1 mM ZnCl_2 , 16 mM (za předpokladu úplného rozpuštění) CaCO_3 a 79 mM δ -glukonolaktonu. Směs byla přenesena do injekčních stříkaček před vytvořením gelu a tvorba gelu začala ve stříkačkách po 10 minutách. Po nočním skladování (3 hodiny při pokojové teplotě a poté při 4 °C) byl gel injekčně aplikován myším. Byl monitorován úbytek hmotnosti ve srovnání s kontrolním pufrem.

Pět dnů byl leptin injekčně aplikován v dávce 50 mg/kg/den, tj. 250 mg/kg jako bolus v gelu, a výsledek byl srovnán se stejnou dávkou volného leptinu v roztoku. Volný leptin vedl pouze k mírné ztrátě hmotnosti, s maximem 4,4 až 4,8% za 2 až 3 dny, a s přibýváním hmotnosti za 5 dnů. Zinek–leptinový komplex vedl při srovnání za 2 až 4 dny k 9 % úbytku hmotnosti. Za pět dnů byl úbytek hmotnosti stále 5 % a zůstal nad výchozí hodnotou úbytku hmotnosti ještě po ukončení experimentu po 7 dnech.

Příklad 4

Tento příklad ukazuje, že pokud je koncentrace proteinu v alginát–leptin–zinkové směsi dostatečně vysoká, vytváří směs gel v nepřítomnosti kalcia, které zapříčiňuje trvalé uvolňování. Leptin (zhruba 14 mg/ml v Tris pH 8) byl přidán do roztoku pufru a poté byl okamžitě vmíšen roztok ZnCl_2 rychle následován roztokem alginátu (autoklávaný 10% roztok), tak že finální koncentrace složek byla 1,1 mM ZnCl_2 , buďto 1,1%, nebo 2,2% alginát, 10 mM Tris (pH 8) a 22 mM PIPES pH 6,7 (pokud byl přítomen). Tato směs byla zakoncentrována centrifugací až do dosažení požadované koncentrace leptinu. Preparát se zhruba 50 mg/ml obsahoval PIPES a 2,2% alginát. Preparát se zhruba 100 mg/ml neobsahoval PIPES a obsahoval 1,1% alginát.

Finální koncentrace složek byla pro 50 mg/ml kalciový gel uvedený v příkladu 3: 2% alginát, 20 mM PIPES, 9 mM Tris, 1 mM ZnCl_2 , 16 mM (za předpokladu úplného rozpuštění) CaCO_3 a 79 mM δ -glukonolaktonu. Pro 100 mg/ml kalciový gel bylo složení stejné s výjimkou finální koncentrace složek, která byla 1% alginát, byl vynechán PIPES, 13 mM CaCO_3 a 67 mM δ -glukonolakton.

Pro gely s kalcem byly směsi přeneseny do injekčních stříkaček před vytvořením gelu a tvorba gelu začala ve stříkačkách po 10 minutách. V případě gelů bez kalcia byla směs Zn–leptin–alginátu přenesena do injekčních stříkaček a byla umožněna tvorba gelu. Ukázalo se, že preparát

s 50 mg/ml bez kalcia nevytváří gel. Po nočním skladování (3 hodiny při pokojové teplotě a poté při 4 °C) byly gely injekčně aplikovány myším. Byl monitorován úbytek hmotnosti ve srovnání s kontrolním pufrem.

- 5 Pět dnů byl leptin injekčně aplikován v dávce 50 mg/kg/den, tj. 250 mg/kg jako bolus v gelu. Kalciové gely z Příkladu 3 vedly k 9% úbytku hmotnosti během 2 až 4 dnů. Za pět dnů byl úbytek hmotnosti stále 5% a zůstal nad výchozí hodnotou úbytku hmotnosti ještě po ukončení experimentu po 7 dnech. Ve srovnání, 50 mg/ml preparát bez kalcia vedl k 3% úbytku hmotnosti ve dnech 2 až 4, avšak pátý den byl úbytek hmotnosti roven nule. Preparát se 100 mg/ml bez kalcia byl však alespoň stejně aktivní jako preparát se 100 mg/ml leptinu s kalcie. Maximální úbytek hmotnosti pro gel se 100 mg/ml bez kalcia byl 9% čtvrtý den experimentu, úbytek hmotnosti pro gel se 100 mg/ml s kalcie byl 6%, také čtvrtý den experimentu. V obou případech došlo k přibývání hmotnosti 9. den experimentu.

15

Příklad 5

- Tento příklad ukazuje, že za podmínek in vitro může být trvalé uvolňování leptinu z alginátového gelu se zpožděným uvolňováním účinné látky připraveno bez prvotní tvorby leptin–zinkového jemného precipitátu. Leptin (100 mg/ml; 10 mM Tris HCl, pH 8,8; pH upraveno z 8,0 na 8,8 pomocí 1M NaOH) a 6% alginát (10 mM Tris HCl, pH 8,6) byly ochlazeny v ledové lázni. k 6% alginátu (0,18 ml) byl přidán leptin (0,5 ml) a směs byla míchána v ledové lázni po dobu 10 až 15 minut; finální pH bylo 8,6 až 8,8. K této směsi byla přidána suspenze 1M CaCO₃ (16 mcl) a výsledná suspenze byla přidána po kapkách. K této suspenzi byl za stálého míchání přidán po kapkách roztok 0,1 M ZnCl₂ (100 mcl) a poté byla přidána voda do celkového objemu 1 ml. Směs suspenze byla úplně promíchána a uchována v ledové lázni po dobu 10 až 20 minut. Poté byl do této směsi přimíchán 1,68 M δ -glukonolakton (56 mcl). 0,1 ml finální směsi (50 mg/ml leptinu, 1% alginát) byla přenesena do eppendorfy a ponechána přes noc při teplotě 4 °C.

- 30 Po této inkubaci bylo provedeno in vitro uvolnění účinné látky v 10 mM histidinu, pH 7,4. Gel v eppendorfci vykazoval pouze malé okamžité uvolňování leptinu a poměrně konstantní uvolňování s 50% uvolněním leptinu za 6 dnů.

35 Příklad 6

- Tento příklad ukazuje, že δ -glukonolaktonem indukovaný gel obsahující leptin ve formě jemného zinkového precipitátu vykazuje trvalejší uvolňování leptinu než totožná zinková suspenze v alginátu, která nevytváří gel. Gel se zinek leptinem byl připraven tak, jak je uvedeno v Příkladu 3. Suspenze zinek–leptinu v alginátu, která nevytváří gel, byla připravena stejným způsobem, kromě vynechání CaCO₃ a δ -glukonolaktonu. Myším byla injekčně aplikována dávka 250 mg/kg ve formě bolu a úbytek hmotnosti byl stanoven tak, jak je popsáno v Příkladu 3. Suspenze nevytvářející gel vedla pouze k 3% úbytku hmotnosti za 2 až 4 dny, zatímco suspenze tvořící gel vedla k 9% úbytku hmotnosti během stejného časového úseku. Hmotnost zvířat v experimentu se suspenzí nevytvářející gel se vrátila k výchozí hodnotě 5. den, zatímco v experimentu se suspenzí vytvářející gel zůstala pod výchozí hodnotou sedm dnů, kdy byl experiment ukončen.

50 Příklad 7

- Tento příklad ukazuje ve farmakokinetické/farmakodynamické studii na samcích krys kinetiku uvolňování nultého řádu a zároveň ukazuje trvalé uvolňování účinné látky se současným trvalým účinkem leptinu (tj. úbytek hmotnosti), který je transportován prostřednictvím gelového preparátu popsaného v Příkladu 3. Koncentrace leptinu byla 47 mg/ml a leptin byl gelifikován v injekční stříkačce tak, jak je popsáno v Příkladu 3. Krysám byla aplikována bolusová dávka 0 mg/kg

(kontrola), 50 mg/ml a 250 mg/kg a poté byla monitorována hladina v krvi a úbytek hmotnosti po dobu šesti dnů. Leptin–zinkový precipitát bez gelu byl také krysám injekčně aplikován v dávce 100 mg/kg.

- 5 Skupina s vysokým obsahem leptinu v gelu vykazovala stálou hladinu v krvi zhruba 2000 ng/ml v průběhu celého období, zatímco skupina s nižším obsahem leptinu měla zhruba 1/5 hladinu po dobu 4 dnů. Ve srovnání, skupina s leptinem v preparátu netvořícím gel vykazovala hladinu v krvi 2300 mg/ml, která vrcholila za 12 hodin a poté se 100 násobně snížila za stejnou dobu sledování. Hmotnost krys (vs kontroly) se ve skupině krys s vysokým obsahem leptinu stále
- 10 snižovala. Hmotnost krys ve skupině s nižším obsahem leptinu měla stejný průběh po téměř pět dnů. V tomto okamžiku došlo také ke snížení hladiny leptinu v krvi u této skupiny zvířat na dávce s nižším obsahem leptinu.

- 15 Biodostupnost leptinu jako léku byla posuzována grafickým srovnáním dávky na typu preparátu: preparátu s leptinem tvořícím gel, preparátu s leptinem netvořícím gel, a preparátu s leptinem aplikovaným intravenózně. Biodostupnost gelového preparátu s leptinem byla 80% ve srovnání s 63% biodostupností preparátu s leptinem netvořícím gel.

20 Příklad 8

- Tento příklad ukazuje za podmínek in vitro trvalé uvolňování GCSF z gelových nosičů se zpožděným uvolňováním účinné látky. Jsou uvedeny příklady pro „odlitkové“ i „protlačené“ materiály. G–CSF byl promíchán ve vodě o pH 3,4 s koncentrovaným alginátem (10%) za vzniku
- 25 mlhavé viskózní suspenze. Tato směs byla gelifikována pomocí CaCO_3 a δ -glukonolaktону v koncentracích 16 mM a 79 mM, respektive. Před tvorbou gelu byly alikvóty materiálu buďto přeneseny do zkumavek, nebo do injekčních stříkaček. Po jedné hodině při pokojové teplotě byly gely přes noc inkubovány při 4 °C. Před zahájením studie na uvolňování účinné látky byl gel ve stříkačkách protlačen do zkumavek a ponechán se ustavit po dobu 20 minut. Poté byl přidán
- 30 uvolňovací pufr. Z protlačeného gelu G–CSF uvolňován po dobu 3 dnů, tj. 11 % za jednu hodinu, 35 % za jeden den, 75 % za dva dny, a zhruba 90 % za tři dny. Z odlitkového gelu byla účinná látka uvolňována následovně: 22 % za jednu hodinu, 80 % za jeden den a 94 % za dva dny.

35 Příklad 9

- Tento příklad ukazuje za podmínek in vitro trvalé uvolňování leptinu z alginátového gelu se zpožděným uvolňováním účinné látky připraveného z kalciové soli (CaSO_4) bez přidání donoru protonu. Ke vzniku zinek–leptinové suspenze ve 2% alginátu byl použit nepufrovaný leptin při
- 40 pH 8. Finální koncentrace ZnCl_2 a leptinu byly 1 mM a 55 mg/ml, respektive. Se zinek–leptin–alginátovou suspenzí byl smíchán jemný prášek CaSO_4 takovým způsobem, že koncentrace finální směsi byla 10 mM v CaSO_4 . Alikvóty materiálu byly přeneseny do eppendorfek. Gel se vytvořil za 4 až 5 minut.

- 45 Po noční inkubaci při pokojové teplotě byla provedena studie na uvolňování účinné látky. Uvolněný protein z gelu vykazoval pouze nízké okamžité uvolňování (méně než 5 %) za 1 hodinu. Za jeden den došlo k uvolnění 11 % leptinu. Uvolňování leptinu bylo postupné, 1,1% za den, po dobu dalších sedmi dnů.

50 Příklad 10

- Tento příklad ukazuje za podmínek in vitro trvalé uvolňování leptinu z alginátového gelu se zpožděným uvolňováním účinné látky připraveného z kalciové soli v nevodném rozpouštědle bez
- 55 přidání donoru protonu. Lyofilizovaný prášek leptinu byl suspendován v 2% alginátu v suchém

dimetylsulfoxidu. K alginát-leptinové suspenzi byl přimíchán jemný prášek kalcium oleátu tak, aby finální koncentrace byla 10 mM v kalcii. Alikvóty materiálu byly přeneseny do zkumavek. Časem došlo k vytvoření gelu.

- 5 Po noční inkubaci při pokojové teplotě byla provedena studie na uvolňování účinné látky. Uvolňování proteinu z gelu bylo postupné a trvalé po dobu dalších sedmi dnů.

Příklad 11

10

Tento příklad ukazuje za podmínek in vivo trvalé uvolňování leptinu z alginátového gelu se zpožděným uvolňováním účinné látky připraveného z kalciové soli tak, jak je popsáno v Příkladu 10. Po jedné injekci myším tohoto leptin obsahujícího gelu v koncentraci 250 mg/kg byla provedena studie na stanovení úbytku hmotnosti. Úbytek hmotnosti byl měřen po dobu několika dnů.

15

Příklad 12

20 Tento příklad ukazuje za podmínek in vitro trvalé uvolňování GCSF z alginátového gelu se zpožděným uvolňováním účinné látky připraveného z kalciové soli v nevodném rozpouštědle bez přidání donoru protonu. Lyofilizovaný prášek G-CSF byl suspendován v 2% alginátu v suchém dimetylsulfoxidu. K alginát-G-CSF suspenzi byl přimíchán jemný prášek kalcium oleátu tak, aby finální koncentrace byla 10 mM v kalcii. Alikvóty materiálu byly přeneseny do zkumavek. Časem došlo k vytvoření gelu.

25

Po noční inkubaci při pokojové teplotě byla provedena studie na uvolňování účinné látky. Uvolňování proteinu z gelu bylo postupné a trvalé.

30 Příklad 13

Tento příklad ukazuje za podmínek in vitro trvalé uvolňování klasického interferonu, jak je popsán v patentu US 4 695 623 viz výše, z alginátového gelu se zpožděným uvolňováním účinné látky. K alginátovému roztoku byla přimíchána voda, ZnCl_2 , Tris pufr a klasický interferon (v 10 mM Tris pH 7,5). Směs byla poté smíchána s CaCO_3 a δ -glukonolaktonem tak, aby finální koncentrace složek byla 1 mg/ml klasického interferonu, 10 mM ZnCl_2 , 1% alginátu, 20 mM Tris, 10 mM CaCO_3 a 40 mM δ -glukonolaktonu. Směs byla přenesena do eppendorfek (0,4 ml na jednu zkumavku), vytvoření gelu bylo uskutečněno za pokojové teploty a poté byla provedena inkubace přes noc při 4 °C. Po noční inkubaci při pokojové teplotě byla provedena v 10 mM histidinovém pufru, pH 7,4 studie na in vitro uvolňování účinné látky. Uvolněný protein z gelu vykazoval pouze nízké okamžité uvolňování, které bylo 3 % za jednu hodinu a 14 % za jeden den. Do čtyř dnů bylo uvolněno 70 % účinné látky. Pátý a šestý den došlo ke zpomalení uvolňování na méně než 5 % za den.

45

Příklad 14

Tento příklad ukazuje, že alginátové gely se zpožděným uvolňováním účinné látky mohou být použity pro trvalé uvolňování klasického interferonu. Alginátový gel se zpožděným uvolňováním účinné látky obsahující klasický interferon byl připraven podle Příkladu 13 s výjimkou finálních koncentrací, které byly následující: 0,2 mg/ml klasického interferonu, 10 mM ZnCl_2 , 2% alginátu, 20 mM Tris, 10 mM CaCO_3 a 40 mM δ -glukonolaktonu. Další preparát byl připraven stejným způsobem s výjimkou koncentrace klasického interferonu, která byla 1 mg/ml. Směsi byly přeneseny do injekčních stříkaček a po dvou hodinách došlo k vytvoření gelu. Preparát obsahující 0,2 mg/ml byl subkutánní injekcí aplikován samcům Syrských křečků v dávce 1 mg/kg a preparát

55

obsahující 1 mg/ml byl těmto zvířatům aplikován v dávce 1 mg/kg a 5 mg/kg. Krev byla odebrána srdeční punkcí a bylo provedeno stanovení klasického interferonu k posouzení trvalého uvolňování léku.

5

PATENTOVÉ NÁROKY

10

1. Gelotvorná farmaceutická kompozice s prodlouženým uvolňováním a zpožděnou tvorbou gelu, **vyznačující se tím**, že obsahuje

a) alginát;

b) biologicky aktivní činidlo; a

15

c) alespoň jeden vázaný polyvalentní ion kovu,
ve farmaceuticky vhodném nosiči nebo ředidle.

2. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje

20

d) alespoň jeden donor protonu schopný poskytnout hydrolýzou, jako důsledek špatné rozpustnosti nebo pomalého rozpouštění kyselinu, jejímž působením se uvolňuje vázaný polyvalentní ion kovu.

3. Kompozice podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že donor protonu je zvolený z pufru, esteru, špatně rozpustné kyseliny, pomalu se rozpouštějící kyseliny nebo laktanu.

25

4. Kompozice podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že donorem protonu je laktan kyseliny glukonové.

30

5. Kompozice podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že vázaný polyvalentní ion kovu je směsí vázaného a nevázaného polyvalentního iontu kovu.

6. Kompozice podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje excipient nebo excipienty pro stabilizaci biologicky aktivního činidla nebo alginátu.

35

7. Kompozice podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že vázaný polyvalentní ion kovu je ve formě soli vybrané z fosfátů, tartrátů, sulfátů, karbonátů, hydroxidů nebo solí s anionty mastných kyselin.

40

8. Kompozice podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že ion kovu je vybraný z manganu, stroncia, železa, hořčíku, vápníku, barya, mědi, hliníku nebo zinku.

9. Kompozice podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že ion kovu je vápník.

45

10. Kompozice podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že alginát obsahuje aspoň 30 % guluronové kyseliny.

11. Kompozice podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že biologicky aktivní činidlo obsahuje protein.

50

12. Kompozice podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že protein je vybraný z hematopoetických faktorů, kolonie stimulujících faktorů, faktorů účinkujících proti obezitě, růstových faktorů a protizánětlivých faktorů.

13. Kompozice podle nároku 11 nebo 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protein je vybrán z leptinu, faktorů stimulujících kolonie granulocytů (G-CSF), růstových faktorů stimulujících kolonie (CSF), neurotrofických faktorů odvozených z mozkové tkáně (BDNF), neurotrofických faktorů odvozených z glií (GDNF), neurotrofického faktoru 3 (NT3), faktorů stimulujících kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), antagonistů receptoru interleukinu 1 (IL-1ra), interleukinu 2 (IL-2), vazebných proteinů pro faktor nekrózy nádorů (TNF-bp), růstových faktorů odvozených z megakaryocytů (MGDF), osteoprotegerinu (OPG), interferonů, erythropoetinu, keratinocytového růstového faktoru (KGF), inzulínu a jejich analogů nebo derivátů.
14. Kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že biologicky aktivním činidlem je komplexované biologicky aktivní činidlo.
15. Kompozice podle nároku 14, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že komplexovaným biologicky aktivním činidlem je vysrážený protein.
16. Kompozice podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že vysráženým proteinem je leptin vysrážený zinkem.
17. Kompozice podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je umístěná v injekční stříkačce.
18. Použití kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16 ve farmaceuticky vhodném nosiči, ředidle nebo adjuvans pro výrobu léčiva pro léčení určité poruchy nebo choroby.
19. Použití podle nároku 18, kde porucha nebo choroba je zvolena z nadměrné hmotnosti, diabetes, vysoké hladiny krevních lipidů, arteriální sklerózy, arteriálních plátů, léčením se sleduje snížení nebo prevence tvorby žlučových kamenů, nedostatečnost hmoty beztukové tkáně, nedostatečná senzitivita na inzulín a mrtvice.
20. Použití podle nároku 18, kde porucha nebo choroba je zvolena z deficiencie hematopoetických buněk, infekce a neutropenie.
21. Použití podle nároku 18, kde poruchou nebo chorobou je zánět.

Konec dokumentu
