

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

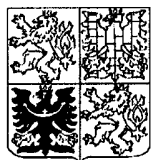
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

129-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28. 05. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **17.07.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/503323**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 06. 98**
(Věstník č. 6/98)

(86) PCT číslo: **PCT/SE96/00684**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/04012**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 08 B 37/08
C 08 L 5/08
A 61 K 31/725

(71) Přihlášovatel:

Q MED AB, Uppsala, SE;

(72) Původce:

Agerup Bengt, Uppsala, SE;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

Polysacharidový gelový prostředek

(57) Anotace:

Příprava zesíťovaného biokompatibilního polysacharidového gelového prostředku obsahuje: vytvoření vodného roztoku ve vodě rozpustného, zesíťovatelného polysacharidu, zesíťování polysacharidu; iniciaci zesíťování v přítomnosti polyfunkčního zesíťovacího činidla; sterické zabránění ukončení zesíťovací reakce před výskytem gelování, získání aktivovaného polysacharidu; a znovu zavedení stericky nebráněných podmínek pro aktivovaný polysacharid, aby pokračovalo jeho zesíťování na viskoelastický gel. Vynález také poskytuje gelový prostředek připravený takovým postupem, jakož i gelové prostředky pro různá medicínská použití.

CZ 129-98 A3



Polysacharidový gelový prostředek

Oblast techniky

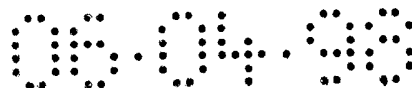
Vynález se týká oblasti biokompatibilních polysacharidových gelových prostředků a zvláště nových způsobů pro zesíťování těchto prostředků a takto získaných nových gelových struktur. Nové struktury umožňují zdokonalení vlastností doposud známých gelů tak i dovolují nové užití těchto prostředků, jako takových a těch obsahujících aktivní složku.

Dosavadní stav techniky

Vodu vázající gely jsou široce používány v oblasti biomedicíny. Při použití biokompatibilních polymerů obecně je nízký stupeň zesíťování využíván k udržení biokompatibility. Avšak pro vlastní efekt využití aktivní složky je často žádána větší hustota gelu, ale v takových případech se biokompatibilita často ztrácí. Další cennou vlastností vody vázajících gelů nebo hydrogelů je, že peptidy a větší biologicky aktivní látky mohou být uzavřeny uvnitř a tak vytvoří trvale propustný (uvolňující) prostředek. Avšak praktické problémy jsou obsaženy v dosažení dostatečného času zadržení aktivní látky, poté kdy je aktivní látka propouštěna se stejnou rychlostí jako je rozpouštěna nebo uzavírána do prostředku. Dále jestliže takový gel byl při pokusu zhuštěn k prodloužení času zadržení, mohl by bobtnat v zvířecích tkáních, které jsou volně přístupné vodě.

Jedním ze široce užívaných biokompatibilních gelů pro medicínském použití je kyselina hyalurová. Třebaže je přítomná v totožném prostředku v každém živém organismu, dává minimum reakcí možností pro pokročilé medicínském použití. V důsledku toho byla subjektem mnoha modifikačních pokusů. Takže byla zesíťována činidly jako aldehydy, epoxidy, polyaziridylovými sloučeninami a divinylsulfony (Laurent a spol., Acta Chem. Scand 18 (1964) Č.1, s. 274; EP 0 161 88781; EP 0 265 116A4; a US 4, 716,154).

V WO 87/07898 byla objevena reakce polysacharidů s polyfunkčními epoxidy, odstranění přebytku epoxidu a závěrečná sušící operace vede k filmu, prášku nebo k podobnému suchému produktu. Avšak není v něm žádný návrh pro zředění a pro



následnou rekoncentraci vedoucí k žádané hustotě nebo konsistenci, která je pak částečně stálá.

V US 5,128,3265 je popsáno množství modifikovaných hyalurových kyselin a jejich využití jako depotních farmak. Popsaná metoda „nabití“ gelových přípravků je založena je na difuzi aktivní látky do gelu a jejím následným uvolňováním z tohoto gelu se stejnou difusní konstantou. Na proti předkládaný vynález zahrnuje rozpuštění aktivní látky, následné zahuštění nebo zkoncentrování gelového prostředku až do té doby kdy neprobíhá žádná nebo velmi malá difuze.

V US 5,399,351 jsou popsány směsi gelů a polymerní roztoky, tyto roztoky jsou používány k zlepšení reologických vlastností gelu. Avšak také v tomto případě byly objeveny zpětně zhuštěné gely, jak může být usouzeno z např. od. 6. řad. 53-58.

Podstata vynálezu.

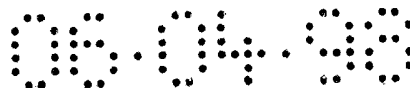
Podle předkládaného vynálezu bylo neočekávaně nalezeno, že polysacharidové gelové prostředky, mající novou strukturu a tím nové vyčnívající vlastnosti, mohou být získány použitím novým technik pro jejich zesíťování. Nová technika zesíťování dovoluje mnohostranné řízení struktury a vlastností vyráběných polysacharidových gelových prostředků, což umožňuje připravit konečný prostředek na zakázku pro zamýšlený účel.

Podrobněji, jeden předmět předkládaného vynálezu je poskytnutí postupu pro přípravu zesíťovaného polysacharidového gelového prostředku, kde biokompability může být zachována i přes vysoký stupeň zesíťování nebo polymerizace.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí polysacharidového gelového prostředku s viskoelastickými vlastnostmi i přes podstatný stupeň zesíťování.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí polysacharidového gelového prostředku, který je více nebo méně nevratně zhuštěný nebo koncentrovaný tzn. který částečně nebobtná nebo jenom do limitovaného stupně při styku s vodou.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí polysacharidového gelového prostředku uzavírajícího biologicky aktivní látku pro použití tohoto jako trvale propustného prostředku nebo depotního prostředku.



Dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí polysacharidového gelového prostředku obsahujícího různé biologicky aktivní látky pro použití medicínských nebo profylaktických prostředků pro různé účely.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí použití zmíněného prostředku pro výrobu medicínských nebo profylaktických prostředků a pro jejich podávání savcům, zvláště lidem.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí částečně zesíťovaného aktivovaného polysacharidového prostředku získaného jako intermediat v postupu podle vynálezu výše zmíněného, tento intermediat může být do zesíťován in situ a v jakékoli žádaném posici.

Tyto a další předměty vynálezu budou zřejmé v tomto níže předkládaném detailnějším popisu. Podle jednoho aspektu předkládaného vynálezu je takto získán postup pro přípravu zesíťovaného biokompatibilního gelového prostředku, kterýžto postup zahrnuje:

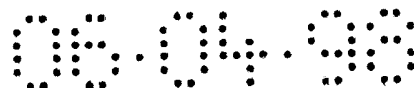
Tvorbu vodného roztoku ve vodě rozpustných, zesíťovatelných polysacharidů;

Iniciaci síťování polysacharidu v přítomnosti polyfunkčního síťovacího činidla;

Sterické zabránění ukončení síťovací reakce před výskytem gelovatění, takto je získán aktivovaný polysacharid; a znovuzavedení stericky odbráněných podmínek pro aktivovaný sacharid tak, aby pokračovalo zesíťování tohoto až k viskoelastickému gelu.

Dále nový postup podle předkládaného vynálezu dovoluje zesíťování ve vodě rozpustných, ze síťovatelných polysacharidů alespoň ve dvou krocích nebo stupních, kde zesíťovací reakce je přerušena před zahájením gelovatění, přerušení je dosaženo sterickým bráněním zesíťovací reakce. Zesíťovací reakce pak pokračuje v druhém kroku znovuzavedením stericky odbráněných podmínek.

Takto, za prvé je neočekávaně nalezeno, že aktivovaný polysacharid je získán sterickou překážkou zesíťování nebo polymerizace, které může proto pokračovat pouze znovuzavedením stericky odbráněných podmínek. Za druhé je také neočekávaně nalezeno, že polysacharidový gelový prostředek takto získaný, netvoří kompaktní, hustou strukturu, který by byl získán je provedením odpovídající zesíťovací reakce v jednom jednoduchém kroku vedoucím k plně zesíťovanému gelu, ale dosti viskoelastický gel. Kromě toho, jak bylo výše zmíněno, získaná nová gelová struktura podle předkládaného vynálezu představuje částečně nevratnou gelovou strukturu, která nebobtná do znatelného stupně při kontaktu s vodou, nebo s



dalším vodním mediem. To obecně znamená, že nabobtnání je menší než 10 objemových procent objemu, který byl získán nárokovaným postupem.

Ačkoli vynález není spojen s jakoukoli teorií, je možné, že získaná nová gelová struktura podle předkládaného vynálezu je spíše kombinací zesít'ování mezi existujícími polymerními řetězci a než prodloužením existujících řetězců tím spíše, že velmi hustá síť poskytuje velmi rigidní strukturu. Což může znamenat, že takový mechanismus je skutečností, protože viskoelastický gel je získatelný tímto vynálezem.

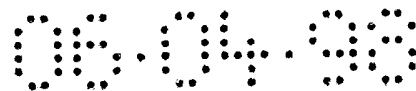
Zde užívaný termín „sterické bránění zesít'ovací reakce“ by mohl být interpretován v širokém smyslu tj. nemusí být to nezbytně úplná zábrana, ale v mnoha případech spíše částečnou překážku zmíněné reakce. Důležité je, že rychlost zesít'ování je částečně redukována, což dává možnost závěrečné zesít'ovací reakci probíhat na požadovaném reakční místě.

Podobně termín „znovuzavedením stericky odbráněných podmínek“ by mohl být široce interpretován, což obecně znamená, že stericky odbráněné podmínky nemusí být přesně ty samé sterické podmínky, které byly použity při počáteční zesít'ovací reakci. Tedy co je obecně důležité je, že stericky odbráněné podmínky dávají možnost probíhat rychlejšími reakcím, než při stericky obráněných podmínkách.

Sterická zábrana zesít'ovací reakce může být získána různými způsoby, ale výhodným provedením vynálezu, z tohoto hlediska, je representováno případem, kde sterická zábrana obsahuje naředění vodního media, v kterém je zesít'ovací reakce prováděna, pro dosažení nižší koncentrace polysacharidu v mediu.

Znovuzavedení stericky odbráněných podmínek je možné také různými způsoby, ale výhodným provedením vynálezu, z tohoto hlediska, je representováno případem, který obsahuje odpaření vodního media, v kterém je zesít'ovací reakce prováděna, pro dosažení vyšší koncentrace polysacharidu v mediu. Další výhodné provedení, z tohoto hlediska, je representováno případem obsahujícím dialysu vodního media, v kterém je zesít'ovací reakce prováděna.

Podle výhodného provedení vynálezu, sterická zábrana zesít'ovací reakce je dosažena před spotřebou sít'ovacího činidla. To obecně také znamená, že znovuzavedení stericky odbráněných podmínek je iniciováno v přítomnosti nespotřebovaného sít'ovacího činidla.



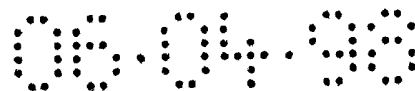
Sterická zábrana zesít'ovací reakce může být nastartována nebo vytvořena v rozsahu 50 – 90% celkového času gelovatění použitého v procesu podle vynálezu, ohled je také brán na vhodnou elasticitu a konsistenci pro další použití prostředku.

Tvůrčí myšlenka by mohla být aplikovaná na jakýkoli biokompatibilní polysacharid, který je zesít'ovatelný a rozpustný ve vodném mediu. Tedy, termín „ve vodě rozpustný“ by mohl být interpretovaný v širokém smyslu, voda není nevyhnutelně nutná. Toto znamená, že vodné roztok znamená jakýkoli roztok, v kterém je voda hlavní komponentou. Preferovanou podskupinou polysacharidů ve spojení s vynálezem je glukosamínglukany, z kterých hyalurová kyselina je obzvláště zajímavý příklad.

Sít'ovací činidla užívaná ve spojení s vynálezem jsou jakákoli dříve známé sít'ovací činidla užitečná ve spojení s polysacharidy, s ohledem na zajištění, že nezbytné předpoklady biokompatibility jsou splněny. S výhodou jsou jakákoli sít'ovací činidla vybrána ze skupiny skládající se z aldehydů, epoxidů, polyaziridylových sloučenin, glycidyl etherů a divinylsulfonů. Z těchto glycidyl ethery reprezentují zvláště preferovanou skupinu, z které 1,4-butandiol diglycidyl ether může být povýšen na preferovaný příklad. V tomto spojení to by mohlo znamenat, že „polyfunkční“ znamená difunkční.

Počáteční sít'ovací reakce může probíhat v přítomnosti polyfunkčního sít'ovacího činidla při různých hodnotách pH, zejména závisí zdali by mohla být zahájena etherová nebo esterová reakce. To s výhodou znamená, že sít'ovací reakce je zahájena v alkalickém pH zvláště nad pH 9 např. v rozmezí pH 9-12, kde vznikají ethery. Pro vznik esterů sít'ovací reakce s výhodou probíhá v kyselém pH, zvláště při pH 2-6.

Jeden zajímavý aspekt vynálezu je reprezentován případem, kde připravený zesít'ovaný gelový prostředek je použit jako takový, vynález umožňuje výrobu viskoelastického prostředku. Takový viskoelastický prostředek je na příklad užitečný v oční chirurgii, jako synoviální náhrada, jako oční kapky, atd. a jak bylo uvedeno, výše předkládaný vynález činí možnou přípravu viskoelastických vlastností na zakázku právě pro takové použití. Tedy užitím sterické technologie podle předloženého vynálezu je možné získat prodloužením řetězce, rozvětvení řetězce, zesít'ování, atd. a více řídit proces než u předchozích technik s více nebo méně náhodnými reakčními místy napojení. Dále skrze tento fakt, že získané gely v souladu s vynálezem si neponechávají svůj původní objem v přítomnosti vodného



media, nové produkty nezpůsobují žádné interferující a negativní objemové efekty v těchto nebo dalších medicínských použití.

V souladu s předkládaným vynálezem je také možné uzavřít do polysacharidového gelového prostředku jakoukoli biologicky aktivní látku, pro kterou je polysacharidový gelový nosič žádaný nebo přijatelný. V tomto kontextu užívaná zředění-koncentrační technika v nárokováném postupu umožňuje uzavření biologicky aktivní látky před podstoupení polysacharidu stericky odbráněním podmínkám. Tedy, ačkoli stericky odbráněné podmínky obecně znamenají koncentrační operace, taková operace znamenají, že biologicky aktivní látka bude v přítomnosti fáze, která je kompaktnější než tato látka, bude uzavřena do nosiče. Dále biologicky aktivní látka může být zadržena mnohem déle v porovnání s předchozími gelovými zesítovanými reakcemi. Tímto je možné získat lepší trvale propustný profil pro aktivní látku.

Ve spojení s inkorporací biologicky aktivní látky do prostředku a přizpůsobení podmínek fyziologickému pH a iontovým podmínkám, je s výhodou vytvořen pro držení preparátu připraveného pro medicínské použití. Takové fyziologické nastavení je také preferováno, co se týče reakčních podmínek při druhém stupni postupu, bylo nalezeno, že za právě těchto podmínek reakce probíhá velmi dobře.

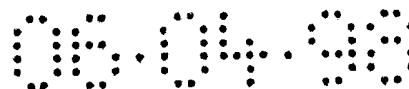
Vynález by neměl být limitován v žádném jak pro biologicky aktivní látku tak v porovnání užití látky v přednostních případech. Dále podmínka léčby mohou být rozhodující pro vybrání specifické látky.

Jakékoliv způsobem zajímavé látky ve spojení s vynálezem mohou být vybrány ze skupiny hormonů, cytokinů, vakcín, buněk, tkáňových růstových látek. Unikátní kombinace vlastností nového gelového prostředku podle předkládaného vynálezu činí toto extrémně výhodné ve spojení s těmito látkami, tj. zejména díky vynikajícím depotním a trvale propustným vlastnostem a neobobtnajícím vlastnostem.

Jedna zajímavá skupina z biologicky aktivních látek jsou tkáňové růstové látky pro něž je polysacharidový gel vhodný nosič. Další detaily ohledně těchto produktů můžou být nalezeny v WO94/21199. Podrobněji, preferované tkáňové růstové látky obsahují polymer vybraný z kolagenu, škrobu, dextranomeru, polylaktidů a jejich kopolymerů a poly- β -hydroxybutyratu a jeho kopolymerů.

Ve spojení s hormony, erytropoeitin a calcitonin jsou zvláště preferované.

Způsob podle předloženého vynálezu také umožňuje inkorporaci biologicky aktivních látek chemickou reakcí s polysacharidovou gelovou strukturou, nebo se síťovacím činidlem, za předpokladu, že aktivní látka obsahuje s těmi to reaktivní skupinu.



Unikátní vlastnosti nebo kombinace vlastností tím mohou být získány v takovém případě např. rychlost uvolňování aktivní látky bude řízena degradací nebo rozkladem polymerní sítě, spíše než rozpouštěcí a migrační rychlostí pro látku pro látku ve vztahu s gelovou sítí.

Modifikace právě zmíněné techniky v souladu s vynálezem znamená, že funkční skupiny aktivní látky smí být nejdříve reagovány se síťovacím činidlem pro polysacharid. To samé síťovací činidlo je použito, jako je užíváno pro zesíťování polysacharidu.

Od té doby co postup z předkládaného vynálezu poskytuje nové polysacharidové gelové prostředky nebo struktury, další aspekt vynálezu je representován připraveným neobvyklým polysacharidovým gelovým prostředkem. Po této stránce pole chránění zahrnuje nejen polysacharidový gelový prostředek připravený kdykoli dle jmenovaného postupu, ale také jakékoli polysacharidový gelový prostředek, který je získatelný podobnou technikou.

Příklady použití

Vynález bude nyní ilustrován následujícími příklady, které jej však žádným způsobem neomezuji.

Příklad 1

Aktivace polymeru

a, za alkalických podmínek

Polysacharid ve formě 10 g hyalurové kyseliny připravené fermentací *Streptokokem* byl rozpuštěn v 100 ml 1% NaOH pH > 9. Síťovací činidlo ve formě 1,4-butandiol diglycidyl etheru bylo přidáno o koncentraci 0,2%. Roztok byl inkubován 4 hodiny při 40 °C.

B, za kyselých podmínek

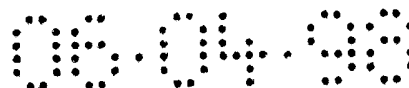
Experiment byl proveden jako v 1a při kyselém pH mezi 2 – 6 přidáním 1% kyseliny octové do roztoku jako náhrady viz. 1a

Příklad 2

Příprava viskoelastického gelu

Inkubáty dle 1a a 1b byly naředěny na objem, který je dvojnásobek žádaného objemu nebo 0,5-1% a byly zneutralizovány. Gel byl rotačně odpařen do viskoelastického gelu.

Příklad 3



Příprava gelu obsahující dextranomerní částice.

Inkubáty dle 1a a 1b byly naředěny na 1% koncentraci 20 g suchých dextranomerních částic bylo mícháno s roztokem, částice byly uzavřeny zesít'ováním polymeru hyalurové kyseliny v několika minutách v důsledku koncentrace (zhušť'ování) hyalurové kyseliny, které je dosaženo absorpcí vody dextranomerními kuličkami.

Získané viskoelastické gely jsou stálé, autoklávovatelné a vhodné pro injektáž pomocí podkožních jehel.

Příklad 4

Příprava gelu obsahující erytropoeitin (EPO) pro použití jako depotního léku.

Inkubát získaný v příkladu 1a byl naředěn na koncentraci 1% a pH bylo upraveno přidáním citrátového pufru, podle instrukcí výrobce (Ortho Biotech Inc., Raritan USA), pro dobrou stabilitu ve vodním roztoku. 5×10^6 IU, imunologických jednotek EPO bylo přidáno za míchání. Po odpaření roztoku na čtvrtinový objem, polymer byl zesít'ovaný na depotní přípravek a 20 000 IU bylo získáno zpět.

Příklad 5

Příprava gelu obsahující calcitonin pro použití jako depotního léku.

Calcitonin z lososa 100IU/ml (Miacalcic® Sandoz) byl smíchán s 2% polymerním roztokem v souladu s experimentem 1b a roztok byl rotačně odpařen na koncentraci 5% (250IU/ml). Kůň s chronickou kulhavostí v pravé přední noze byl léčen injekcí 2 ml s.c. týdně po dva týdny. Po šesti týdnech byl kůň zbaven bolestí. Sérum kalcia bylo sníženo pouze o 12%.

Příklad 6

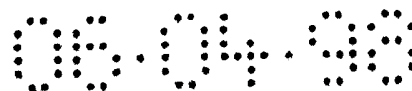
Příprava gelu obsahující heparin k uvolňování v trvalé cestě.

V naředěném aktivovaném polymeru dle příkladu 4 byl rozpuštěn v 5% množství k polymeru. Obdržená směs byla ekvilibrovaná 1 hodinu, načež byla odpařena na čtvrtinový objem. Koagulace inhibující uvolňování z prostředku nebyla pozorována během 16 dní inkubace v fyziologickém roztoku.

Příklad 7

Příprava gelu s kovalentně vázaným heparinem v stericky řízené posici.

Aktivovaný gel dle příkladu 1 byl precipitován v methanolu za silného míchání. Získaný práškový precipitát byl sušen přes noc. Heparin byl aktivován v souladu s příkladem 1. Po inkubaci (4 hodiny při 40°C) polymerní precipitát byl smíchán a



roztokem aktivovaného heparinu. Směs byla inkubována přes noc a následující den byl gelový roztok neutralizován, vysrážen a promyt od reakčních zbytků.

Vytvořený gel byl schopný vázat růstový faktor, mezi jinými základní Fibroblastický růstový faktor (bFGF), ale neukazuje žádnou inhibici koagulace zdravé krve.

Příklad 8

Příprava gelu obsahující pozitivní nabitě skupiny chitosanu

Inkubace směsi 7,5 g polymeru hyalurové kyseliny a 2,5 g chitosanu (See Cure® Protan) byla provedena v souladu s příkladem 1. Po rozpuštění a neutralizaci byl získán kopolymerizovaný viskoelastický roztok. Roztok měl hojivé podpůrné vlastnosti po aplikaci pro léčení přetrvávajících bolestí.

Příklad 9

Příprava stericky spojovaného gelu

7,5 g hyalurové kyseliny bylo aktivováno v souladu s příkladem 1a. Stejným způsobem bylo aktivováno 2,5 g dextranu. Hyalurová kyselina byla precipitována v methanolu, precipitát pak smíchán s 500 ml naředěného 0,5% roztoku dextranu. Po smíchání a úpravě pH a koncentraci solí byl získán viskoelastický gel. 5 ml tohoto roztoku bylo zavedeno do pouzdra Achillovi šlachy, které opakovaně vykazovalo zánět ve formě bolestivosti a „skřípání“. Po čtyřech týdnech problémy Achillovi šlachy zmizely.

Příklad 10

Příprava gelu obsahující GMCSF pro použití jako depotního léku

Produkt byl připraven v souladu s příkladem 5, ale místo calcitoninu zde byl přidán Granulocyte makrofág – kolonie stimulačního faktoru, GMCSF (Leucomax®) 1mg/g polymeru.

Příklad 11

Příprava gelu obsahující umrtvený virus typu chřipka A2.

Příprava byla provedena jako v příkladu 4, ale místo EPO bylo na 100 ml zředěného aktivního 1% polymerního roztoku přidáno 40960 HAU umrtveného viru koňské chřipky. Po čtyřnásobné koncentraci přípravek obsahoval 600 HAU na ml. Vakcinaci více než 100 koní ve styku s epidemickou chřipkou bylo nalezeno, že prostředek je vysoce efektivní jako ochrana před infekcí, ochrana byla zachována po dlouhou dobu (více než 6 měsíců).

Příklad 12

Příprava čerstvého gelu obsahujícího suspensi živých buněk



5 ml fibroblastického kultury bylo smícháno se 100 ml neutralizovaného roztoku dle příkladu 1a. Směs byla okysličená a „sušena“ na poloviční objem. Byl získán viskoelastický roztok obsahující živé buňky.

Příklad 13

Příprava silně rozmělněného gelu obsahující malé peptidy.

K aktivovanému gelu dle příkladu 1a bylo přidáno 5 mg peptidu obsahujícího 12 aminokyselin. Gel byl odpařen za míchání na 10% a suspendován v minerálním oleji. Po přidání methanolu byly suché gelové částice odfiltrovány a promyty od olejových zbytků.

Příklad 14

Příprava gelu obsahujícího silně rozmělněný gel s malými peptidy dle příkladu 13

K 1% roztoku neutralizovaného polymeru aktivovaného dle příkladu 1a byly přidány mikročástičky z příkladu 13. Gel byl pak odpařen na polovinu svého objemu. Byl připraven homogenní, stabilní a vhodný pro injekci gel obsahující jemně rozptýlené mikročástičky.

Příklad 15

Příprava gelu obsahujícího sférické polymethylmethakrylátové (PMMA) kuličky mající velikost 40-120 μm .

K 5 g polymeru rozpuštěného na 1% a neutralizovaného a aktivovaného dle příkladu 1a byl přidáno 100 mg kuliček polymethylmethakrylátu (PMMA). Odpařením na 3% polymerní gel vznikl stabilního, vhodného pro injekci, viskoelastického gelu.

Příklad 16

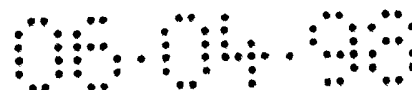
Příprava gelu obsahujícího PMMA 500 nm fragmenty, ke kterým byl přidán hydrofobní antigen.

Hemaglutinin antigen připravený z A2 viru dle příkladu 11 byl absorbován hydrofobní interakcí na 500 nm PMMA částice. Tyto částice byly přidány k 1% roztoku dle Příkladu 15 a objem byl zmenšen na polovinu. Vznikl stabilní homogenní viskoelastický gel, který je užitečný jako vakcína mající vysoký adjuvas efekt.

Příklad 17

Porovnání mezi stupněm na bobtnání při volném styku s vodou mezi obvykle připravenými gely a gely připravenými dle presentovaného vynálezu.

Gely hyalurové kyseliny připravené dle Laurent a spol. a dle příkladu 1 a 2 výše popsané byly vysušeny na poloviční bobtnající objemy. A pak byly navraceny do svých původních roztoků. Doposavad známé gely nabobtnaly do svých původních



objemů zatímco gelový prostředek dle příkladu 1 a2 bobtnal pouze marginálně (10%).

Příklad 18

Srovnání mezi biologickou aktivitou gelu, který je kopolymer hyalurové kyseliny a EPO a gelu připraveného dle příkladu 1 do kterého byl EPO uzavřen koncentrováním gelu

Čtyři pacienti léčení Eprex® (CILAG) na jejich anemii způsobenou chronickou uremií, byly léčení dva měsíce dávkami každý měsíc podle následujícího režimu:

Pacient č.	1	2	3	4
Dávka IU	60 000	70 000	70 000	50 000
Měsíc 1	Přímo gelovaný depot	Přímo gelovaný depot	Kontrolní	Kontrolní
Měsíc 2	Kontrolní	Kontrolní	Koncentrovaný	Koncentrovaný

Přímo gelovaný depot: Epoxid zesíťovaný za mírných podmínek dle příkladu 11 v přítomnosti EPO

Kontrolní: EPO rozpuštěné v 4% hyalurové kyselině M.h 6×10^6 z kohoutího hřebínku připraveného podle US 4 141 973 (Healon® Pharmacia)

Koncentrovaný: EPO do aktivovaného gelu koncentrací

Dávka byla vybrána jako celková dávka na měsíc, která je obvykle potřebná pro pacienta k udržení hladiny hemoglobinu. Hladina sera EPO byla analyzována v pravidelných intervalech prostřednictvím imunochemické metody.

Výsledky

Běžnou metodou pro vyjádření funkčního efektu depotních přípravků je vypočítání plochy pod křivky (jednotky EPO x dny). Tato studie poskytuje biodostupnost ve tvaru hladiny hemoglobinu v krvi jako 0=zachována, + = vzrůst a - = pokles.

05.04.98

Tabulka

Pacient č/měsíc	1/1	1/2	2/1	2/2	3/1	3/2	4/1	4/2
Ploch pod křivkou	41	424	57	534	224	952	567	656
Kontrola hemoglobinu	-	+	-	+	0	+	+	+

Závěr

Uzavření EPO v depotním přípravku dle předkládaného vynálezu dává nejvyšší možné uvolňování během analýzy. Pokus o provedení reakce gelovatění v přítomnosti EPO zničil hormony tak, že velmi nízké uvolňování mohlo být registrováno.

Průmyslová využitelnost

Vyjádřeno dalším způsobem předložený vynález také poskytuje zesíťovaný polysacharidový gelový prostředek, který je získávaný zesíťováním zesíťovatelného polysacharidu s polyfunkčním zesíťovacím činidlem ve dvou krocích, první zesíťovací krok ukončený před vyskytnutím gelovatění sterickou zábranou zesíťovací reakce, druhým zesíťovacím krokem je zahájen znovuzavedením stericky odbráněných podmínek pro zesíťovací reakci, která pokračuje až k viskoelatickému gelu.

Všechny tyto rysy, které jsou presentované jako preferované nebo zajímavé ve spojení s nárokovaným postupem jsou aplikovatelné také na polysacharidový gelový prostředek sám o sobě a nemusí být více opakován.

Další aspekt vynálezu je reprezentován příkladem, kde meziprodukt je získán odložením konečného kroku zesíťovací reakce se stericky odbráněnými podmínkami na pozdější stupeň nebo místo, na příklad pro konečné použití prostředku. Tedy bylo nalezeno, intermediat získaný po sterické zábraně zesíťovací reakce má takovou stabilitu, že je možné ukončení zesíťovací reakce v pozdějším stupni.

Vynález také uvádí do vztahu prostředek výše definovaný a užití medicínského a profylaktického prostředku.

Další aspekt vynálezu je použití prostředku pro výrobu medicínských a profylaktických prostředků pro jakýkoli výše zmíněné specificky léčebné a terapeutické účely, preferované aplikace jsou tkáňový růst a hormonální léčba savců, obzvláště lidí.

Patentové nároky

1. Způsob přípravy zesíťovaného biokompatibilního polysacharidového gelového prostředku, který zahrnuje:

- vytvoření vodného roztoku ve vodě rozpustného, zesíťovaného polysacharidu;

- iniciaci zesíťování polysacharidu v přítomnosti polyfunkčního síťovacího činidla

sterické zabránění zesíťovací reakce ukončením před výskytem gelovatění, tímto získání aktivovaného gelu; a

znovuzavedení stericky odbráněných podmínek pro aktivovaný polysacharid takže ukončení tohoto zesíťování směřuje k viskoelastickému gelu.

2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že polysacharid je vybrán ze skupiny skládající se z glukosamín glukanů.

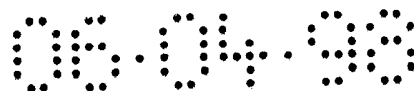
3. Způsob podle nároku 2, vyznačujícím se tím, že glukosamín glukany obsahují hyalurovou kyselinu.

4. Způsob podle nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že síťovací činidlo je vybráno ze skupiny obsahující aldehydy, epoxidy, polyaziridylové sloučeniny, glycidyl ethery a divinyl sulfony.

5. Způsob podle nároku 4, vyznačující se tím, že glycidyl ether obsahuje 1,4-butandiol diglycidyl ether.

6. Způsob podle nároků 1 až 5, vyznačující se tím, že sterické zabránění zesíťovací reakce obsahuje naředění vodního média, v kterém je zesíťovací reakce prováděna, k dosažení nižší koncentrace polysacharidu v médiu.

7. Způsob podle nároků 1 až 6, vyznačující se tím, že odbráněné podmínky zahrnují odpaření vodního media, ve kterém je zesíťovací reakce prováděna, k dosažení vyšší koncentrace polysacharidu v médiu.
8. Způsob podle nároků 1 až 6, vyznačující se tím, že znovu zavedení stericky odbráněných podmínek obsahuje dialýzu vodného media, ve kterém je zesíťovací reakce prováděna.
9. Způsob podle nároku 1 až 8, vyznačující se tím že, počáteční zesíťovací reakce v přítomnosti zesíťovacího činidla je prováděna při alkalickém pH, nejlépe nad pH 9, tímto jsou zahajeny etherické zesíťovací reakce.
10. Způsob podle nároku 1 až 8, vyznačující se tím že, počáteční zesíťovací reakce v přítomnosti zesíťovacího činidla je prováděna v kyselém pH, nejlépe při pH 2 až 6, tímto jsou zahajeny esterové zesíťovací reakce.
11. Způsob podle nároků 1 až 10, vyznačující se tím, že stérické zábrany zesíťovací reakce je dosaženo před spotřebováním zesíťovacího činidla.
12. Způsob podle nároků 1 až 11, vyznačující se tím, že biologicky aktivní látka je uzavřena do zesíťovaného polysacharidového gelového prostředku, během jeho přípravy, nejlépe při fyziologickém pH, a iontových koncentračních podmínek.
13. Způsob podle nároku 12, vyznačující se tím, že aktivní látka je uzavřena do gelového prostředku, svým rozpuštěním nebo rozptýlením v aktivovaném polysacharidu pře podstoupením výše zmíněného polysacharidu stericky odbráněným podmínkám.
14. Způsob podle nároků 12 a 13, vyznačující se tím, že biologicky aktivní látka je vybrána ze skupiny hormonů, cytokinas, vakcín, buněk a tkáňových růstových látek.
15. Způsob podle nároku 14, vyznačující se tím, že tkáňová růstová látka obsahuje polymer vybraný z kolagenu, škrobu, dextranomeru, polylaktidu a jeho kopolymerů, a poly - β - hydroxybutyrát a jeho kopolymery.



16. Způsob podle nároku 14, vyznačující se tím, že hormon je vybrán ze skupiny obsahující erytropoetin a calcitonin.

17. Způsob podle nároků 12 až 16, vyznačující se tím, že biologicky aktivní látka obsahuje funkční skupiny reagující s polysacharidem a je navíc uzavřena v gelu chemickou reakcí.

18. Způsob podle nároku 17, vyznačující se tím, že biologicky aktivní látka obsahuje funkční skupiny předreagované zesíťovacím činidlem pro polysacharid, nejlépe s tím samým zesíťovacím činidlem, které je použité pro zesíťování polysacharidu.

19. Zesíťovaný biokompatibilní polysacharidový gelový prostředek, připravený nárokovanými postupy v nárocích 1 až 18.

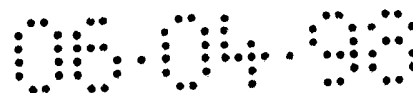
20. Částečně zesíťovaný biokompatibilní aktivovaný polysacharidový gelový prostředek získaný nárokovanými postupy v nárocích 1 až 18, před pokračováním zesíťováním aktivovaného polysacharidu, znovu zavedením stericky odbraněných podmínek pro zesíťovací reakci.

21. Zesíťovaný biokompatibilní polysacharidový gelový prostředek, který je získatelný zesíťováním zesíťovatelného polysacharidu s polyfunkčním zesíťovacím činidlem, z toho důvodu ve dvou krocích, první zesíťovací krok ukončený před výskytem gelovatěním sterickou zábranou zesíťovací reakce a druhý zesíťovací krok počínající znovu zavedením stericky odbraněných podmínek pro pokračování zesíťovací reakce až k viskoelastickému gelu.

22. Zesíťovaný biokompatibilní polysacharidový gelový prostředek, podle nároku 21, charakterizovaný nárokovanými rysy v nárocích 2 až 11.

23. Zesíťovaný biokompatibilní polysacharidový gelový prostředek, podle nároků 21 a 22, který obsahuje uvnitř uzavřenou biologicky aktivní látku.

24. Zesíťovaný biokompatibilní polysacharidový gelový prostředek, podle nároku 23, vyznačující se tím, že biologicky aktivní látka je podle nároku v nárocích 12 až 18.



25. Medicínský nebo profylaktický polysacharidový gelový prostředek, podle nároků v nárocích 21 až 24.

26. Prostředek, podle nároku 25, který je upraven jako depotní prostředek.

27. Prostředek, podle nároků 21 až 24, pro použití jako medicínský nebo profylaktický prostředek.

28. Použití prostředku podle nároků 21 až 24 pro výrobu medicínského nebo profylaktického prostředku pro tkáňový přídavek savce, zvláště člověk.

29. Použití prostředků podle nároků 21 až 24 pro přípravu medicínského nebo profylaktického depotního prostředku zvláště hormonální léčbu savce, zvláště člověk.

30. Metodu pro medicínskou nebo profylaktickou léčbu savce, zvláště člověka, která obsahuje podávání prostředku podle nároků 25 a 26, savci potřebuje-li takovou léčbu.