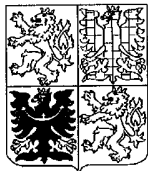


PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28.04.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.04.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9805424**
(33) Země priority: **FR**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.03.2001**
(Věstník č. 3/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/FR99/01005**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/55309**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4012

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 9/16

(71) Přihlašovatel:
VIRSOL, Paris, FR;

(72) Původce:
Bru-Magniez Nicole, Paris, FR;
Le Visage Catherine, Paris, FR;
Fattal Elias, Paris, FR;
Couvreur Patrick, Villebon sur Yvette, FR;
Breton Pascal, Tigy, FR;

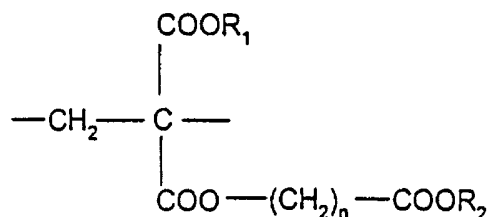
(74) Zástupce:
Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nové mikrosféry na bázi
poly(methylidenmalonátu), způsob jejich
přípravy a farmaceutické kompozice tyto
mikrosféry obsahující**

(57) Anotace:

Řešení se týká nových mikrosfér, které jsou zejména použitelné ve farmaceutické oblasti jako nosiče obzvláště určené pro transport biologicky účinných látek, zejména hydrofilních látek, při peronálním podání. Mikrosféry podle řešení jsou tvořené kontinuální sítí nosičového materiálu, ve kterém je případně dispergovaná látka, přičemž uvedený nosičový materiál obsahuje alespoň 70 % hmotn. homopolymeru tvořeného opakujícími se strukturními jednotkami obecného vzorce I, ve kterém R_1 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů nebo skupinu $(CH_2)_m-COOR_3$, ve kterém m znamená celé číslo od 1 do 5 a R_3 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, R_2 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a n znamená celé číslo od 1 do 5.



27.10.00

2000-4012

1

16 80934

JUDr. F. ...
22.00 PRAHA

Nové mikrosféry na bázi poly(methylidenmalonát)u, způsob jejich přípravy a farmaceutické kompozice tyto mikrosféry obsahující

Oblast techniky

Vynález se týká nových mikrosfér, které jsou zejména použitelné ve farmaceutické oblasti jako částicové nosiče určené pro transport biologicky účinných látek, zejména hydrofilních látek (peptidy nebo proteiny), perorálním podáním.

Vynález se rovněž týká výroby těchto mikročástic a farmaceutických kompozic, které tyto mikrosféry obsahují.

V rámci popisu a definice vynálezu se výrazem "mikrosféry" rozumí v podstatě kulovité částice, jejichž střední průměr činí 1 až 100 μm , výhodně 5 až 100 μm , a které jsou tvořené více či méně hustou sítí nosičového materiálu.

Tyto mikrosféry se liší od mikrokapslí, které jsou tvořeny stěnou obklopující dutinu. Nicméně je třeba poznamenat, že mikrosféry připravené ve vícenásobné emulzi mohou obsahovat množinu kuliček dispergovaných v kontinuální síti, která uvedené mikrosféry tvoří.

V tomto posledně uvedeném případě představuje celkový objem takových kuliček obecně zlomek $1/20$ až $1/2$ z celkového objemu mikrosfér.

Dosavadní stav techniky

V průběhu posledních let prokázaly četné studie, že částicové systémy na bázi polymerů mohou být použity pro modifikování profilu uvolňování terapeuticky účinných látek.

Takto byly různými technikami připraveny mikrosféry na bázi syntetických polymerů, jakými jsou například poly(kyselina mléčná), poly(kyselina mléčná-koglykolová), polystyren, polyepsilon-kaprolakton, polymethylmethakrylát nebo mikrosféry na bázi methylcelulózy anebo ethylcelulózy.

Nicméně je třeba konstatovat, že takto připravené mikrosféry nejsou obecně biodegradovatelné a v případě, že jsou biodegradovatelné, potom je jejich biologická degradace velmi pomalá.

Takto například v případě mikrosfér na bázi kyseliny poly(mléčné) degradace neprobíhá postupně, nýbrž probíhá najednou a to až po velmi dlouhé době.

Kromě toho tyto mléčné polymery při jejich degradaci uvolňují silně kyselé produkty, které nejen, že způsobují autokatalýzu degradace polymeru, ale jsou také původcem indukce nekompatibility se zapouzdřenými látkami.

V případě ostatních použitých polymerů mají mikrosféry extrémně nízkou degradační rychlost anebo vůbec nedegradují.

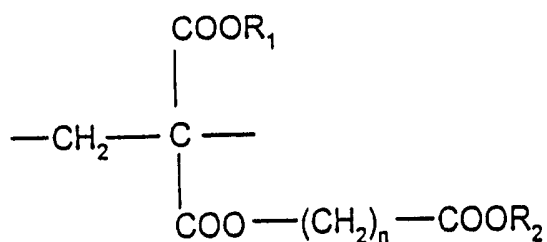
Doba setrvání takových částic v organismu může omezit opakovatelnou aplikaci těchto mikročástic v lidském organismu.

Konečně lze uvést, že známé mikrosféry jsou většinou výrazně hydrofóbní, což podporuje silné a mnohdy denaturující interakce s látkou určenou k zapouzdření, zejména v případě, kdy látka k zapouzdření má proteinový nebo peptidový charakter.

Nyní bylo zjištěno, a toto zjištění tvoří podstatu vynálezu, že je možné získat nové mikrosféry, které nemají výše uvedené nedostatky mikročástic spadajících do dosavadního stavu techniky.

Podstata vynálezu

Prvním předmětem vynálezu přihlášky vynálezu jsou mikrosféry tvořené kontinuální sítí nosičového materiálu, ve kterém je případně dispergovaná látka, jejichž podstata spočívá v tom, že uvedený nosičový materiál obsahuje alespoň 70 % hmotn. homopolymeru tvořeného opakujícími se strukturními jednotkami následujícího obecného vzorce



ve kterém

R_1 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů nebo skupinu $(\text{CH}_2)_m-\text{COOR}_3$, ve které m znamená celé číslo 1 až 5 a R_3 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

R_2 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, a

n znamená celé číslo 1 až 5.

Bylo zjištěno, že vzhledem k chemické povaze polymerů tvořících matrici uvedených mikrosfér, tyto mikrosféry:

- mají postupnou a modulovanou degradační kinetiku, a
- umožňují zapouzdřit s vysokou účinností hydrofilní látky, zejména biologického původu.

Kromě toho bylo s překvapením a zcela neočekávatelně pozorováno, že tyto mikrosféry:

- mohou indukovat stimulaci imunitní odezvy v případě, že jsou sdruženy s antigenem, a
- umožňují v některých případech potlačení patologických hypersenzibilizačních reakcí (indukce tolerance) v případě, že jsou podány perorálně.

Je to tedy charakter polymerního materiálu tvořícího matrici mikrosfér, který způsobuje originalitu tohoto vynálezu.

Tento polymerní materiál je v podstatě tvořen homopolymerem tvořeným opakujícími se strukturními jednotkami výše definovaného obecného vzorce I.

Takové polymery mají pozoruhodnou biokompatibilitu a biodegradovatelnost, přičemž jsou schopné degradace chemickou nebo biologickou cestou mechanismem stěpení bočních substituentů.

Rychlost eroze mikrosfér podle vynálezu je závislá na molekulové hmotnosti nosičového materiálu a může být tedy jednoduše modulována použitím nosičového materiálu majícího molekulovou hmotnost přizpůsobenou požadované rychlosti eroze.

Mikrosféry podle vynálezu vykazují tedy modulovanou a postupnou erozi, která například umožňuje transport

biologicky účinné látky, dispergované v nosičovém materiálu, až do místa v organismu, ve kterém bude účinek biologicky účinné látky nejúčinnější.

Bioeroze uvedených mikrosfér rovněž eliminuje akumulaci polymerního materiálu, ze kterého jsou mikrosféry vytvořeny, v organismu, v důsledku čehož není použití uvedených mikrosfér omezeno uvedenou akumulací.

V rámci specifické formy provedení vynálezu je výše uvedený homopolymer tvořen opakujícími se strukturními jednotkami výše uvedeného obecného vzorce I, ve kterém

R_1 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

R_2 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a

n znamená celé číslo rovné 1, přičemž výhodně R_1 a R_2 znamenají skupinu $\text{CH}_2\text{-CH}_3$.

Tyto různé typy polymerů skupiny poly(methylidenmalonát)u jsou zejména vhodné pro zapouzdření hydrofilních látek, zejména hydrofilních látek biologického původu, které jsou případně biologicky účinné.

Pod pojmem "biologicky aktivní molekula" se zde neomezujícím způsobem rozumí každá molekula mající profylaktickou nebo kurativní biologickou účinnost in vitro nebo in vivo, zejména protiinfekční činidlo, obzvláště antiseptické, antibiotické, antivirální, antiparazitické nebo antimitotické a zejména protirakovinné činidlo.

Použitelnými antibiotickými nebo antiseptickými činidly mohou být například rifampicin a colistin.

Jakožto příklady antivirálních činidel lze uvést neomezujícím způsobem didanosin, ribavirin, zidovudin,

acyclovir, ganciclovir, foscarnet, vidarabin a zalcitabin.

Jakožto protirakovinná činidla mohou být například použity cis-plastin a taxol.

V rámci skutečně výhodné formy provedení vynálezu obsahuje nosičový materiál mikrosfér:

- 90 až 99,5 % hmotn. výše definovaného homopolymeru a
- 0,5 až 10 % hmotn. kopolymeru obsahujícího alespoň jednu sekvenci mající hydrofilní charakter a alespoň jednu sekvenci mající hydrofobní charakter, přičemž uvedená sekvence s hydrofobním charakterem výhodně obsahuje alespoň jednu strukturní jednotku výše uvedeného obecného vzorce I.

Výhodně je sekvence s hydrofilním charakterem uvedeného kopolymeru zvolena z množiny zahrnující poly(oxyethylen), poly(vinylalkohol), poly(vinylpyrrolidon), poly(N-2-hydroxypropylmethakrylamid), poly(hydroxyethylmethakrylát), hydrofilní poly(aminokyseliny), jakou je například polylysin, polysacharid, přičemž takovou sekvencí je obzvláště poly(oxyethylen).

Uvedený kopolymer může mít blokovou strukturu, výhodně dvoublokovou strukturu nebo tříblokovou strukturu, anebo může mít roubovanou strukturu.

Přidání takových kopolymerů do nosičového materiálu umožňuje získat homogenní disperzi látky určené k zapouzdření uvnitř každé z mikrosfér.

Uvedené přidání rovněž umožňuje modulovat poměr hydrofilie/hydrofobie povrchu mikrosfér, což umožňuje vyloučit nebo alespoň omezit silné a mnohdy denaturující interakce s látkou určenou k zapouzdření.

Kromě toho tyto kopolymery, jejichž chemický charakter hydrofobní sekvence je identický s charakterem homopolymeru tvořícího podstatnou část mikrosfér, jsou obzvláště výhodné pro skutečně výhodnou formu provedení přípravy mikrosfér, která bude detailněji vysvětlena v následujícím popisu.

Obecně mohou být mikrosféry podle vynálezu získány provedením způsobu, který zahrnuje:

- přípravu vícenásobné emulze se třemi fázemi, přičemž mezilehlá fáze této emulze je tvořena roztokem polymeru nebo polymerů tvořících nosičový materiál v těkavém organickém rozpouštědle, a
- odpaření uvedeného organického rozpouštědla za podmínek umožňujících vyvolat srážení polymeru okolo kapiček tvořících vnitřní fázi.

Uvedená vícenásobná emulze může být získána klasickým způsobem spočívajícím v tom, že se primární emulze typu voda-v-oleji disperguje ve druhé vodné fázi obsahující stabilizační činidlo.

Taková vícenásobná emulze může být rovněž získána "inverzním" způsobem spočívajícím v tom, že se vodný roztok nalije do primární emulze typu voda-v-oleji. Tento "inverzní" způsob zcela neočekávatelně umožňuje získat zcela pozoruhodné výsledky, které jsou mnohdy lepší než výsledky získané výše uvedenou klasickou technikou.

Takto se druhý předmět vynálezu týká způsobu získání výše popsaných mikrosfér, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje:

- a) přípravu prvního roztoku výše uvedeného polymeru nebo polymerů tvořících nosičový materiál v těkavém organickém rozpouštědle obsahujícím případně povrchově aktivní činidlo,
- b) přípravu druhého roztoku nemísitelného s roztokem

získaným ve stupni a), obsahujícího případně uvedenou látku určenou k dispergování a případně povrchově aktivní činidlo,

c) přípravu primární emulze dispergováním uvedeného druhého roztoku v uvedeném prvním roztoku, přičemž kontinuální fáze je tvořena roztokem polymeru nebo polymerů,

d) přípravu sekundární emulze:

- buď dispergováním za míchání primární emulze získané ve stupni c) v dispergačním prostředí nemísitelném s uvedenou primární emulzí, přičemž uvedené dispergační prostředí obsahuje případně stabilizační činidlo,
- nebo nalitím za míchání do uvedené primární emulze roztoku tvořeného prostředím nemísitelným s uvedenou primární emulzí, přičemž uvedené prostředí případně obsahuje stabilizační činidlo, a
- odpaření uvedeného organického činidla za míchání.

V rámci specifické formy provedení vynálezu zahrnuje výše popsaný způsob dále:

f) izolaci mikrosfér odstředěním,

g) jedno nebo několik následných promytí uvedených mikrosfér a

h) lyofilizaci uvedených mikrosfér.

První stupeň způsobu přípravy mikrosfér podle vynálezu zahrnuje tedy získání emulze typu voda-v-oleji, výhodně v přítomnosti vhodného povrchově aktivního činidla, přičemž olejová nebo organická fáze obsahuje polymer nebo polymery určené pro vytvoření nosičového materiálu uvedených mikrosfér.

Nejdříve se připraví roztok polymeru nebo polymerů tvořících nosičový materiál pomocí vhodného těkavého organického rozpouštědla a to případně v přítomnosti povrchově aktivního činidla.

Výhodně se v tomto stupni použijí předběžně připravené polymery v případě, že homopolymery tvořící v podstatě nosičový materiál mikrosfér mohou být získané za podmínek umožňujících dobrou charakterizaci, pokud jde o molární hmotnost a hmotnostní disperzitu.

Homopolymery tvořené opakujícími se strukturními jednotkami obecného vzorce I mohou být připraveny z monomerů například postupy popsány v patentovém dokumentu EP 283346, který odpovídá patentovým dokumentům US 4 931 584 a US 5 142 098, přičemž uvedené monomery jsou obecně odplyněny za vakua dosaženého lopatkovým čerpadlem až do konstantní hmotnosti za účelem eliminace inhibitoru polymerace (SO_2).

Tyto homopolymery budou nicméně výhodně připraveny aniontovou polymerací v aprotickém prostředí, například dispergováním monomeru v acetonu, následným přidáním hydroxidu sodného za míchání a následným odpařením acetonu a vysušením takto získaného polymeru.

Namísto acetonu mohou být použita i další organická aprotická rozpouštědla, jako například acetonitril, dioxan nebo tetrahydrofuran.

Molekulová hmotnost homopolymeru, který může být získán provedením tohoto způsobu, může být dokonale regulována rozumnou volbou pracovních podmínek, zejména volbou koncentrace monomeru v organické fázi, hodnoty pH a molaritou polymeračního iniciátoru (hydroxid sodný).

Obecně se v rámci vynálezu používají homopolymery mající střední molární hmotnost 1 000 až 100 000, výhodně homopolymery mající střední molární hmotnost 5 000 až 80 000.

Těkavé organické rozpouštědlo, které může být použito pro přípravu prvního roztoku obsahujícího polymer nebo polymery tvořící nosičovým materiál, bude obecně zvoleno tak, aby jeho teplota varu byla nižší, než je teplota varu vody. Takové rozpouštědlo tedy bude moci být snadno odstraněno při finálním stupni odpaření rozpouštědla umožňujícím vysrážení polymeru.

Ethylacetát představuje těkavé organické rozpouštědlo, které je obzvláště vhodné k tomuto účelu.

Povrchově aktivní činidla, která mohou být použita pro stabilizaci primární emulze mohou mít různou povahu a budou přidána k organické fázi obsahující polymer nebo polymery (první roztok) nebo/a k vodné fázi (druhý roztok) tvořící dispergovanou fázi.

Může se například jednat o poloxamer, jakým je produkt uvedený na trh pod označením Pluronic F68 nebo také o polyvinylalkohol, jakým je produkt uvedený na trh pod označením Mowiol 40-88, nebo také o polysorbat a nebo ještě o povrchově aktivní kopolymer, jehož hydrofobní sekvence má stejný chemický charakter jako je charakter homopolymeru tvořeného strukturními jednotkami obecného vzorce I.

Bylo prokázáno, že takové povrchově aktivní kopolymery a zejména kopolymery poly(methylidenmalonát)u a polyoxyethylenu jsou obzvláště výhodné vzhledem k tomu, že jednak umožňují získat velmi stabilní primární emulzi a jednak umožňují dosáhnout dobrého ukotvení povrchově aktivního činidla v matrici po odpaření rozpouštědla.

Výše uvedené povrchově aktivní kopolymery mohou být připraveny o sobě známými klasickými polymeračními technikami.

Z těchto technik se výhodně použije aniontová polymerace, radikálová polymerace nebo také technika kopulace prekurzorových sekvencí kopolymeru, přičemž tyto sekvence byly předběžně funkcionalizované na konci řetězce adekvátním způsobem.

Aniontová polymerace je obzvláště vhodná pro přípravu blokových kopolymerů.

Tento typ polymerace zahrnuje sekvenční přidávání monomerů a umožňuje získat dokonale definovanou strukturu, přičemž použitá množství iniciátorů a monomerů umožňují regulovat stupeň polymerace každé ze sekvencí.

Blokový kopolymer může být takto získán:

- buď aniontovou polymerací prvního monomeru a reakcí na růstovém řetězci druhého monomeru,
- nebo aktivací prekurzorového polymeru, který bude sloužit jako iniciátor při polymeraci druhého monomeru.

Iniciačními činidly schopnými použití v rámci uvedených aniontových polymerací obecně budou:

- jednak organokovové deriváty, jako například butyllithium a zejména difenylhexyllithium, a
- jednak alkoxidy a zejména makromolekulární alkoxidy, jako například POE-alkoxid, které mohou být získány aktivací hydroxy-funkce pomocí kumylodraslíku, difenylmethyldraslíku nebo naftalendraslíku.

Uvedená aniontová polymerace bude rovněž provedena v rozpouštědle, které je kompatibilní s různými sekvencemi kopolymeru.

V případě, kdy je sekvence s hydrofilním charakterem tvořena poly(oxyethylen)em a sekvence s hydrofobním charakterem je tvořena poly(methylidenmalonát)em, budou

blokové kopolymery podle vynálezu výhodně připraveny postupnou aniontovou polymerací ethylenoxidu a potom methyлідenmalonátu nebo aktivací komerčního monohydroxylovaného polyoxyethylenového prekurzoru a následnou aniontovou polymerací poly(methyлідenmalonát)ové sekvence.

Obecně se jako polymerační rozpouštědlo výhodně použije tetrahydrofuran, přičemž toto rozpouštědlo umožňuje pracovat v homogenním prostředí, což příznivě ovlivňuje kinetiku polymerace.

Monomery použité pro přípravu uvedených hydrofilních sekvencí jsou obecně komerčně dostupné produkty.

Technika kopulace je rovněž obzvláště vhodná pro přípravu blokových kopolymerů.

Tato reakce se obecně provádí za použití předběžně syntetizovaných a funkcionalizovaných homopolymerů v přítomnosti kopulačního činidla a případně aktivačního činidla a ve vhodném rozpouštědle.

V případě přípravy výhodných kopolymerů podle vynálezu, jejichž hydrofilní sekvence je tvořena poly(oxyethylen)em a jejich hydrofobní sekvence je tvořena poly(methyлідenmalonát)em, se výhodně použije homopolymer poly(oxyethylen)u funkcionalizovaného α -karboxy-skupinou a homopolymer poly(methyлідenmalonát)u funkcionalizovaného α -hydroxy-skupinou.

Homopolymer poly(oxyethylen)u funkcionalizovaného α -karboxy-skupinou může být například získán převedením komerčního poly(oxyethylen)u funkcionalizovaného α -hydroxy-skupinou za použití anhydridu kyseliny jantarové.

Homopolymer poly(methyлідenmalonát)u funkcionalizovaného

α -hydroxy-skupinou může být získán přímo aniontovou syntézou ve vodném prostředí nebo aniontovou syntézou v rozpouštědle za použití vodného roztoku hydroxidu sodného jakožto polymeračního iniciátoru.

Jako kopulační činidlo, které je obzvláště vhodné pro uvedenou polymeraci, lze výhodně použít dicyklohexylkarbodiimid (DCCI).

Uvedená kopulační reakce může být případně aktivována bázeckou katalýzou a obecně probíhá v rozpouštědle, které je kompatibilní s uvedenými homopolymery, a kterým je zejména dichlormethan ve specifickém případě výhodných kopolymerů podle vynálezu.

Pro přípravu roubovaných kopolymerů je obzvláště vhodná radikálová polymerace.

Tato polymerace se obecně provádí za použití makromonomeru ve funkci výchozího produktu, t.j. oligomeru nesoucího na jednom ze svých konců ethylenickou skupinu, která je radikálově polymerovatelná a která je schopna reagovat s monomerem za vzniku kopolymeru s roubovanou strukturou.

Tato polymerace bude obecně provedena v přítomnosti iniciátoru a ve vhodném rozpouštědle.

V případě přípravy roubovaných kopolymerů podle vynálezu, jejichž hydrofilní sekvence je tvořena poly(oxyethylen)em, mohou být použity různé funkcionalizované makromery.

Obzvláště výhodné je použití makromonomeru funkcionalizovaného methakryloylovou skupinou.

Takový produkt může být komerčně dostupný (Aldrich) a bude tvořen například poly(oxyethylen)ovým řetězcem s molární molekulovou hmotností mezi 308 a 440 g/mol nebo bude připraven z komerčně dostupného poly(ethylen glykol)monomethyletheru kopulací s kyselinou methakrylovou v dichlormethanu za účelem vytvoření terminální methoxy-funkce.

Takový makromonomer může být rovněž připraven aktivací poly(oxyethylen)u a následnou reakcí s methakryloylchloridem.

Kopolymery s roubovanou strukturou podle vynálezu mohou být rovněž připraveny transesterifikací poly(oxyethylen)monomethyletheru v úrovni bočních esterových řetězců předběžně syntetizovaného poly(methylidenmalonát)u.

Tato transesterifikace bude obecně provedena za použití alkoholu, v přítomnosti katalyzátoru a při zvýšené teplotě.

Kopolymery, jejichž celková molární hmotnost sekvencí s hydrofobním charakterem činí 1 000 až 80 000 g/mol, výhodně 1 000 až 50 000 g/mol, jsou obzvláště vhodné pro použití v rámci vynálezu.

Obecně může být primární emulze sloužící pro přípravu mikrosfér tvořících podstatu vynálezu, získána pomocí homogenizátoru na bázi stříhového napětí, kterým je například zařízení typu Uktraturrax (13 500 otáček za minutu, 5 minut)

Látka, která má být zapouzdřena se obecně přidává do vodné fáze, která je dispergovaná v primární emulzi.

Druhý stupeň způsobu přípravy mikrosfér podle vynálezu

zahrnuje přípravu sekundární emulze:

- buď dispergováním za míchání primární emulze získané ve stupni c) v dispergačním prostředí nemísitelném s uvedenou primární emulzí, přičemž uvedené dispergační prostředí obsahuje případně stabilizační činidlo,
- nebo nalitím za míchání do uvedené primární emulze roztoku tvořeného prostředím nemísitelným s uvedenou primární emulzí, přičemž uvedené prostředí případně obsahuje stabilizační činidlo.

Obecně je dispergačním prostředím nemísitelným s primární emulzí vodná fáze, do které se primární emulze zavede výhodně po kapkách, přičemž rovněž tato emulze se připraví například za použití homogenizátoru typu Ultraturrax (8000 otáček za minutu, 5 minut).

Polyvinylalkohol tvořící stabilizační činidlo je obzvláště vhodný pro přípravu sekundární emulze.

Po tomto druhém stupni může případně následovat dodatečný stupeň vytěsnění organického rozpouštědla.

Třetí podstatný stupeň způsobu přípravy mikrosfér podle vynálezu spočívá v tom, že se odpaří těkavé organické rozpouštědlo, které sloužilo pro přípravu roztoku polymeru nebo polymerů.

Ve specifickém případě, kdy je tímto rozpouštědlem ethylacetát, se uvedené odpaření provádí po dobu asi 12 hodin při teplotě místnosti za mechanického míchání (1 400 otáček za minutu).

Odborník v daném oboru vhodným způsobem zvolí jednotlivé podmínky provedení těchto tří podstatných stupňů přípravy způsobu podle vynálezu a to v závislosti na požadovaných fyzikálně-chemických a morfologických

vlastnostech uvedených mikrosfér.

Obecně mají tyto mikrosféry střední průměr 1 až 100 μm , výhodně 5 až 50 μm , v případě jejich použití jakožto nosiče účinných látek ve farmaceutické oblasti.

Obecně budou mikrosféry získané na výstupu uvedeného třetího stupně izolovány odstředěním, promyty a případně lyofilizovány.

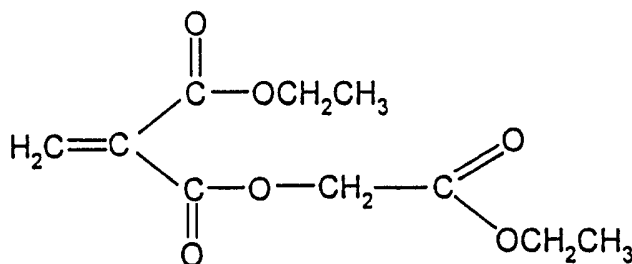
Třetí předmět vynálezu se týká farmaceutických kompozic obsahující mikrosféry, které byly právě popsány. Tyto kompozice budou obecně vhodné pro perorální podání a budou například ve formě tablet, želatinových tobolek, prášků nebo granulí.

V následující části popisu bude vynález popsán pomocí příkladů jeho konkrétního provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu. Zkratky použité v těchto příkladech mají následující významy:

OE: ethylenoxid,

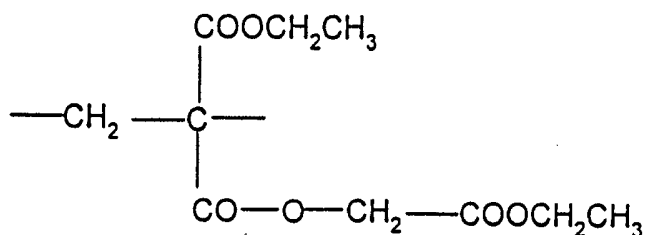
POE: poly(oxyethylen),

MM 2.1.2: methylenmalonát obecného vzorce:



který má chemický název: 1-ethoxykarbonyl-1-ethoxykarbonyl-methylenoxykarbonylethen,

PMM 2.1.2: polymer tvořený strukturními jednotkami vzorce:



Jinak v uvedených příkladech:

- velikost mikrosfér byla měřena technikou Coulterova počítače a zkoumání morfologie bylo provedeno skanovacím elektronovým mikroskopem a to buď za použití surových mikrosfér nebo po kryogenní destrukci, a
- molekulová hmotnost polymerů byla stanovena permeační gelovou chromatografií (CPG).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

100 mg methyлідenmalonátu 2.1.2 se rozpustí v 10 ml acetonu za míchání magnetickým míchadlem. K získanému roztoku se potom postupně stále za míchání magnetickým míchadlem přidá 100 mikrolitrů 0,1N hydroxidu sodného. Polymerace se ponechá probíhat po dobu 5 minut, načež se přidá 100 mikrolitrů 0,1 N kyseliny chlorovodíkové, přičemž se směs stále míchá magnetickým míchadlem. Získaný polymer se potom promyje pomocí asi 100 ml destilované vody, načež se vysuší za vakua. Molekulová hmotnost tohoto polymeru činí 30 000.

280 mg polymethyлідenmalonátu se rozpustí v 10 ml

ethylacetátu. 1 ml vodné fáze obsahující 60 mg vaječného albuminu se emulguje v organické fázi za míchání pomocí zařízení Ultraturrax při rychlosti otáčení míchadla 13 500 otáček za minutu a při době míchání 5 minut. Tato emulze se potom přidá ke 100 ml 2% vodného roztoku polyvinylalkoholu, přičemž se směs míchá v zařízení Ultraturrex po dobu 5 minut při rychlosti otáčení míchadla 8 000 otáček za minutu. Odpaření ethylacetátu se provede v průběhu noci při teplotě místnosti za mechanického míchání lopatkovým míchadlem při rychlosti otáčení míchadla 1 400 otáček za minutu. Získané mikrosféry se izolují odstředěním při 4 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, načež se šestkrát promyjí destilovanou vodou a po každém z těchto promytí se podrobí odstředění. Po posledním odstředění se mikrosféry znovu suspendují ve 3 ml destilované vody a potom lyofilizují.

Takto získané mikrosféry mají střední průměr 6 mikrometrů, přičemž v těchto mikrosférách tvořených PMM 2.1.2 je zapouzdřeno 14,2 % vaječného albuminu použitého při této přípravě, což odpovídá zapouzdření 2,5 % hmotnosti.

Takto získaný přípravek se podává perorálně myším C3H v dávce 100 mikrogramů zapouzdřeného vaječného albuminu (na myš a den) po dobu pěti po sobě jdoucích dnů. Poslední dávka je podána 7 dní před senzibilací pokusných zvířat na vaječný albumin, která se provede subkutánní injekcí volného vaječného albuminu (100 mikrogramů/myš) ve dnech D0 a D14. 90 % myši přežije druhou injekci vaječného albuminu, zatímco přežije méně než 30 % myši, kterým byly podány mikrosféry bez vaječného albuminu nebo kterým byla podána stejná dávka nezapouzdřeného vaječného albuminu.

Postupuje se stejně jako v příkladu 1, avšak s výjimkou spočívající v tom, že se do vodné fáze obsahující vaječný albumin přidá Pluronic F 68 v koncentraci 2 %.

Příklad 3

Postupuje se stejně jako v příkladu 1, avšak s výjimkou spočívající v tom, že se do organické fáze obsahující polymer přidá 20 mg kopolymeru POE-PMM.

V tomto příkladu byl použit blokový kopolymer POE-PMM 2.1.2. Tento kopolymer byl získán následnou polymerací obou monomerů, přičemž byl nejdříve připraven blok POE za použití následujícího postupu.

Reaktor, ve kterém se provádí polymerace (250 ml) je spojen s vakuovým čerpadlem umožňujícím pracovat za hlubokého vakua a zbavit se tak protických nečistot.

Rozpouštědlo (tetrahydrofuran, 150 ml), které je přečištěním zbaveno všech stop vlhkosti, se zavede do reaktoru mechanismem kryogenní destilace při teplotě -70°C .

Pomocí injekční stříkačky se potom skrze přestupní komůrku reaktoru do reaktoru zavede polymerační iniciátor (terc.butoxid draselný (0,1N/THF), 10 ml).

Mechanismem kryogenní destilace se potom do reaktoru zavede ethylenoxid (5 g).

Polymerace se provádí při teplotě místnosti po dobu 48 hodin. Po uplynutí této doby se odebráním vzorku a jeho analýzou pomocí permeační gelové chromatografie stanoví molární hmotnost (4000 g/mol) a index polymolekularity

(1,13) získané první sekvence.

Jako inhibitor polymerace se použije MM 2.1.2 (0,5 ml), který byl za vakua čerstvě odplyněn za účelem odstranění oxidu siřičitého; tento inhibitor se přidá rychle a najednou při teplotě místnosti.

Po 5 hodinách se kopolymer deaktivuje přidáním methanolu a vysráží v diethyletheru.

Na POE je zachyceno 5 strukturních jednotek MM 2.1.2, což odpovídá molární hmotnosti pro PMM 2.1.2 1 150 g/mol.

Pomocí termické analýzy kopolymeru bylo zjištěna teplota přechodu do skelného stavu -16°C a pík teploty tání při 45°C ($\Delta H = 117 \text{ J/G}$).

Příklad 4

Postupuje se stejně jako v příkladu 1, avšak s výjimkou spočívající v tom, že se vaječný albumin (60 mg) nahradí 2 mg peptidu V3 28 smyčky V3 BRU, gp 120, HIV (sekvence NNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQA). Získané mikrosféry mají průměrnou velikost 5,8 mikrometrů a 70 % použitého peptidu V3 28 je zapouzdřeno v uvedených mikrosférách, což odpovídá zapouzdření 0,48 % hmotnosti. Studie provedená pod skanovacím mikroskopem ukazuje, že částice jsou hladké a mají kulovitý tvar.

Příklad 5

Postupuje se stejně jako v příkladu 4, avšak s výjimkou spočívající v tom, že se do vodné fáze obsahující peptid v koncentraci 2 % přidá Pluronic F 68. Získané mikrosféry

mají velikost 7,0 mikrometrů a 70 % použitého peptidu je zapouzdřeno v získaných mikrosférách.

Příklad 6

Postupuje se stejně jako v příkladu 4, avšak s výjimkou spočívající v tom, že se do vodné fáze obsahující peptid přidá 20 mg kopolymeru POE-PMM.

Příklad 7

Postupuje se stejně jako v příkladu 4, avšak s výjimkou spočívající v tom, že se k organické fázi obsahující polymer přidá 20 mg kopolymeru POE-PMM.

Příklad 8

Postupuje se stejně jako v příkladu 1, avšak s výjimkou, spočívající v tom, že vnitřní fáze je tvořena 1 ml 0,5M kyseliny octové obsahující 3 mg kolagenu typu II. Takto získané mikrosféry mají střední průměr 6 mikrometrů a 66,6 % použitého kolagenu je zapouzdřeno v mikrosférách PMM 2.1.2, což odpovídá zapouzdření 0,7 % hmotnosti.

Příklad 9

Postupuje se stejně jako v příkladu 1, avšak s výjimkou spočívající v tom, že vnitřní vodná fáze je tvořena 1 ml destilované vody. Takto získané mikrosféry neobsahují

biologicky účinnou látku. Jejich střední průměr činí 7,0 mikrometrů.

Příklad 10

Postupuje se stejně jako v příkladu 1, avšak s výjimkou, že vaječný albumin (60 mg) je nahrazen plasmidem pCDNA3 (5 mg). Takto získané mikrosféry mají střední velikost 7 μm a 9,8 % použitého plasmidu je zapouzdřeno v uvedených mikrosférách, což odpovídá zapouzdření 0,17 % hmotnosti. Studie pod skanovacím elektronovým mikroskopem ukázala, že získané částice jsou hladké a mají kulovitý tvar.

Příklad 11

Postupuje se stejně jako v příkladu 10, avšak s výjimkou spočívají v tom, že se k vodné fázi obsahující plasmid přidá Pluronic v koncentraci 2 %. Takto získané mikrosféry mají střední průměr 7 μm a 12 % použitého plasmidu je zapouzdřeno do mikrosfér, což odpovídá zapouzdření 0,22 % hmotnosti.

Příklad 12

Postupuje se stejně jako v příkladu 1, avšak s výjimkou spočívající v tom, že vaječný albumin (60 mg) je nahrazen oligonukleotidem (pdT16) (2 mg). Získané mikročástice mají střední velikost 4,8 μm a 20,6 % použitého oligonukleotidu

27.10.00

23

je zapouzdřeno v uvedených mikrosférách, což odpovídá zapouzdření 0,19 % hmotnosti.

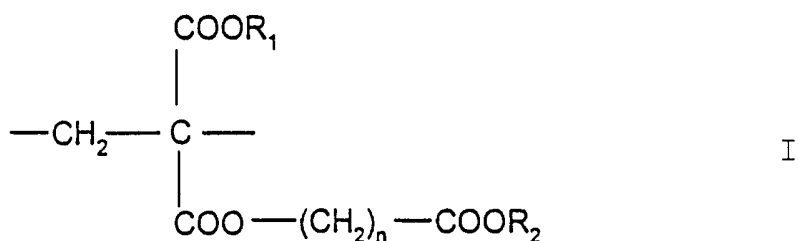
Příklad 13

Postupuje se stejně jako v příkladu 12, avšak s výjimkou spočívající v tom, že se k vodné fázi obsahující oligonukleotid přidá Pluronic v koncentraci 2 %. Získané mikrosféry mají střední průměr 5,7 μm a 23 % použitého oligonukleotidu je zapouzdřeno v uvedených mikrosférách, což odpovídá zapouzdření 0,21 0 hmotnosti.

JULIUS MIHOŠ VŠETEČKA
advokát
120 00 PRAHA 2, Hálkova 2

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Mikrosféry tvořené kontinuální sítí nosičového materiálu, ve kterém je případně dispergovaná látka, v y z n a č e n é t í m, že uvedený nosičový materiál obsahuje alespoň 70 % hmotn. homopolymeru tvořeného opakujícími se strukturními jednotkami následujícího obecného vzorce



ve kterém

R_1 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů nebo skupinu $(\text{CH}_2)_m-\text{COOR}_3$, ve které m znamená celé číslo 1 až 5 a R_3 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

R_2 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, a

n znamená celé číslo 1 až 5.

2. Mikrosféry podle nároku 1, v y z n a č e n é t í m, že uvedený homopolymer je tvořen opakujícími se strukturními jednotkami obecného vzorce I, ve kterém

R_1 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6

uhlíkových atomů,

R_2 znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a

n znamená celé číslo 1.

3. Mikrosféry podle nároku 1, v y z n a č e n é t í m, že uvedený homopolymer je tvořen opakujícími se strukturními jednotkami obecného vzorce I, ve kterém R_1 a R_2 znamenají skupinu $\text{CH}_2\text{-CH}_3$.

4. Mikrosféry podle některého z nároků 1 až 3, v y z n a - č e n é t í m, že uvedený nosičový materiál obsahuje:

- 90 až 99,5 % hmotn. homopolymeru definovaného v nároku 1, 2 nebo 3, a
- 0,5 až 10 % hmotn. kopolymeru obsahujícího alespoň jednu sekvenci mající hydrofilní charakter a alespoň jednu sekvenci mající hydrofobní charakter, přičemž uvedená sekvence mající hydrofobní charakter obsahuje alespoň jednu strukturní jednotku obecného vzorce I.

5. Mikrosféry podle nároku 4, v y z n a č e n é t í m, že sekvence s hydrofilním charakterem uvedeného kopolymeru je zvolena z množiny zahrnující poly(oxyethylen), poly(vinylalkohol), poly(vinylpyrrolidon), poly(N-2-hydroxypropylmethakrylamid), poly(hydroxyethylmethakrylát), hydrofilní poly(aminikyseliny), zejména polylysin, a polysacharid.

6. Mikrosféry podle nároku 4 nebo 5, v y z n a č e n é t í m, že uvedený kopolymer má blokovou strukturu, výhodně dvoublokovou nebo tříblokovou strukturu, nebo roubovanou strukturu.

7. Mikrosféry podle některého z nároků 1 až 6, v y z n a - č e n é t í m, že v uvedeném nosičovém materiálu je účinně dispergovaná látka, přičemž tato látka je případně biologicky účinnou látkou.

8. Mikrosféry podle některého z nároků 1 až 7, v y z n a - č e n é t í m, že uvedenou dispergovanou látkou je peptid.

9. Mikrosféry podle některého z nároků 1 až 8, v y z n a - č e n é t í m, že uvedenou dispergovanou látkou je protein.

10. Způsob přípravy mikrosfér podle některého z nároků 1 až 9, v y z n a č e n ý t í m, že zahrnuje:

- a) přípravu prvního roztoku výše uvedeného polymeru nebo polymerů tvořících nosičový materiál v těkavém organickém rozpouštědle obsahujícím případně povrchově aktivní činidlo,
- b) přípravu druhého roztoku nemísitelného s roztokem získaným ve stupni a), obsahujícího případně uvedenou látku

určenou k dispergování a případně povrchově aktivní činidlo,

c) přípravu primární emulze dispergováním uvedeného druhého roztoku v uvedeném prvním roztoku, přičemž kontinuální fáze je tvořena roztokem polymeru nebo polymerů,

d) přípravu sekundární emulze:

- buď dispergováním za míchání primární emulze získané ve stupni c) v dispergačním prostředí nemísitelném s uvedenou primární emulzí, přičemž uvedené dispergační prostředí obsahuje případně stabilizační činidlo,
- nebo nalitím za míchání do uvedené primární emulze roztoku tvořeného prostředím nemísitelným s uvedenou primární emulzí, přičemž uvedené prostředí případně obsahuje stabilizační činidlo, a
- odpaření uvedeného organického činidla za míchání.

11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č e n ý t í m, že dále obsahuje stupeň e') vytěsnění uvedeného organického rozpouštědla, přičemž stupeň e') se provádí mezi stupněm d) a stupněm e).

12. Způsob podle nároku 10 nebo 11, v y z n a č e n ý t í m, že dále zahrnuje:

- f) izolaci mikrosfér odstředěním,
- g) jedno nebo několik následných promytí uvedených mikrosfér a
- h) lyofilizaci uvedených mikrosfér.

13. Způsob podle některého z nároků 10 až 12, v y z n a č e-
n ý t í m, že povrchově aktivní činidlo použité pro
přípravu primární emulze se zvolí z množiny zahrnující
poloxamery, polysorbáty, polyvinylalkoholy a kopolymery
definované v některém z nároků 4 až 6.

14. Způsob podle některého z nároků 10 až 13, v y z n a č e-
n ý t í m, že uvedeným stabilizačním činidlem použitým
pro přípravu sekundární emulze je polyvinylalkohol.

15. Farmaceutické kompozice určené pro perorální podání,
v y z n a č e n é t í m, že obsahují mikrosféry
definované v některém z nároků 1 až 9 nebo získané způsobem
podle některého z nároků 10 až 14.

Zastupuje: