P03 03719

KIVONAT

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Mitoxantron hatóanyag-tartalmú liposzómás gyógyszerkészítmények és eljárás az előállítására

Jelen találmány mitoxantron hatóanyag-tartalmú liposzómás gyógyszerkészítményekre, ezek előállítási eljárásaira és alkalmazására vonatkozik. A jelen találmány szerinti gyógyszerkészítmények a mitoxantron liposzómás összetételeit tartalmazzák, amelyekben a liposzóma a különféle semleges vagy töltéssel rendelkező liposzóma-képző vegyületekkel együtt egy olyan anyagot tartalmaz, amelyről ismert, hogy megköti a mitoxantront. Ilyen anyag például a kardiolipin.

A liposzómás készítmények előnyösen alkalmazhatók a mitoxantrontól különböző másodlagos terápiás szerekkel együtt, például antineoplazmás, gombaellenes szerekkel, antibiotikumokkal stb.

A találmány a gyógyszerkészítmény összetétel terápiásan hatékony mennyiségének ~~emlős állatnak, mint például embernek történő~~ adagolásából álló eljárásokra is vonatkozik.

P03 03719

A2 27709

Mitoxantron hatóanyag-tartalmú liposzómás gyógyszerkészítmények és eljárás az előállításukra

KÖZZÉTETELI PÉLDÁNY

A találmány tárgya

Jelen találmány mitoxantron hatóanyag-tartalmú liposzómás gyógyszerkészítményekre, ezek előállítási eljárásaira és alkalmazásukra vonatkozik.

A technika állása

A mitoxantron, főleg ennek hidroklorid só formája, a rák és a szklerozis multiplex gyógyításában jól használható hatóanyag. Az US Food and Drug Administration (FDA) a mitoxantron-hidroklorid kereskedelmi forgalomba kerülését először 1987.-ben hagyta jóvá az Egyesült Államokban a Novatrone® márkanevű injekciós készítményben. A Novatrone® egy steril, pirogénmentes, sötétkék színű vizes oldat, amely 2 mg/ml mitoxantron szabad bázissal egyenértékű mitoxantron-hidroklorid só hatóanyagot és inaktív alkotórészként 0,80 térfogat/tömeg %-os nátrium-kloridot, 0,005 térfogat/tömeg % nátrium-acetátot és 0,046 térfogat/tömeg % ecetsavat tartalmaz.

A kortikoszteroidokkal kombinált Novatrone® az elsődlegesen választandó kezelés a fájdalmas, hormon-kezelésre nem reagáló, előrehaladott prosztatarák

esetében. A Novatrone® javallott adagja 12-14 mg/m^2 21 napon át minden nap, rövid intravénás infúzióban.

A Novatrone® együttes adását más engedélyezett hatóanyaggal (hatóanyagokkal) ugyancsak jóváhagyták az akut, nem limfocitás leukémia (ANLL) – beleértve a mielogén, promielocitás, monocitás és az eritrocitás akut leukémiákat is – elsődleges terápiájaként. A Novantrone® javasolt napi adagja 12 mg/m^2, az 1-3 napon intravénás infúzióban 100 mg/m^2 citarabinnal együtt, 7 napon át, az 1-7 napokon 24 órás folyamatos infúzióban adagolva.

A Novantrone® ugyancsak bevált szer a neurológiai rokkantság és/vagy a másodlagos (krónikus) progresszív, progresszív visszaeső vagy súlyosbodó visszaeső-enyhülő szklerozis multiplexben szenvedő betegek klinikai visszaesési gyakoriságának csökkentésére. A mitoxantron-hidrokloridról úgy vélik, hogy DNS-reaktív vegyület, amely emberi sejtkultúrákban citotoxikusnak bizonyult mind a burjánzó, mind pedig a nem burjánzó sejtekre nézve.

A mitoxantron toxicitása korlátozza a hatóanyag betegek számára történő adagolhatóságát. Azonfelül a mitoxantronnak kitett sejtekben kialakuló több-hatóanyagos rezisztencia korlátozza a hatóanyag hatékonyságát. Következésképpen szükségesek olyan mitoxantron tartalmú gyógyszerkészítmények, amelyekben a mitoxantron kellően szolubilizált, miközben a hatékonysága maximális, például a toxicitás és a kezelt sejtekben a több-hatóanyagos rezisztencia kialakulásának minimálisra csökkentése révén.

A jelen találmány ilyen gyógyszerkészítményekre és eljárásokra vonatkozik. A jelen találmány ezen és más előnyei éppen úgy, mint a további invenciózus jellemzők, az ezután következő kitanításból nyilvánvalóvá válnak.

A találmány összefoglaló ismertetése

A jelen találmány új mitoxantron gyógyszerkészítményekre, ezek előállítási eljárásaira és különösképpen emlősben, előnyösen emberben történő alkalmazásukra vonatkozik olyan megbetegedések kezelésére, mint például a rák. Az eljárás során a mitoxantront és a gyógyszerészetileg elfogadható segédanyagokat tartalmazó gyógyszerkészítmény terápiásan hatásos mennyiségét beadjuk egy emlősnek. A jelen találmány szerinti gyógyszerkészítmények a mitoxantron liposzómás összetételeit tartalmazzák, amelyekben a liposzómákat a semleges vagy a töltéssel rendelkező liposzóma-képző anyagok bármelyike és egy olyan vegyület alkotja, mint például a kardiolipin, amelyről ismert, hogy megköti a mitoxantront. Ezek a liposzóma-képző anyagok lehetnek amfifil molekulák, mint amilyenek a foszfolipidek, például a foszfatidil-kolin, dipalmitoil-foszfatidil-kolin, foszfatidil-szerin, koleszterin stb., amelyek poláros oldószerben liposzómát képeznek. A liposzómákban lévő kardiolipin természetes vagy szintetikus eredetű lehet. A liposzóma összetételétől függően a liposzóma töltése lehet tisztán negatív, pozitív vagy semleges. Előnyösek azok a liposzómák, amelyek tokoferolt is tartalmaznak. Bár a mitoxantron széles koncentrációtartományban alkalmazható ezekben a

készítményekben, a legelőnyösebb, ha a mitoxantron koncentrációja 0,5-2 mg/ml. A mitoxantron lipid alkotórészekhez viszonyított mólaránya szintén széles tartományban változhat, de legelőnyösebb, ha a körülbelül 1:10-től a körülbelül 1:20 tartományban van. A liposzómák méretének kívánalom szerinti ellenőrzésére átbocsáthatjuk azokat különböző lyukméretű szűrőkön. A liposzómás készítményeket előnyösen együtt alkalmazhatjuk a mitoxantrontól különböző másodlagos terápiás szerekkel, például antineoplazmás, gombaellenes szerekkel, antibiotikumokkal is. A jelen találmány szerinti liposzómák kívánalom szerint lehetnek többrétegű vagy egyrétegű vezikulumok, vagy ezek keverékei. A találmány eljárásokra is vonatkozik, amelyek során az említett liposzómák gyógyszerészetileg elfogadható segédanyagokban lévő, terápiásan hatékony mennyiségét beadjuk egy emlősnek, például egy embernek.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmény egy különösen előnyös előállítási eljárásában a mitoxantron egy gyógyszerészetileg elfogadható segédanyagban lévő mennyiségét (például a Novantront®) hozzáadjuk a gyártótartályban lévő, előformált liofilizált liposzómák bizonyos mennyiségéhez, amely liposzómák mitoxantron-kötő anyagot tartalmaznak, és hagyjuk, hogy a mitoxantron hozzákötődjék a liposzómákhoz, és így előállítjuk a gyógyszerkészítményt.

A találmány előnyös kiviteli formáinak részletes ismertetése

A jelen találmány egy gyógyszerkészítményre, annak előállítási eljárásaira és egy emlősön való alkalmazására vonatkozik. A gyógyszerkészítményre és annak előállítási eljárásaira jellemző a mitoxantron oldékonysági problémáinak kiküszöbölése, a liposzómák és a mitoxantron hatóanyag nagyfokú stabilitása, a mitoxantron magas koncentrációban bóluszként vagy rövid időtartamú infúzióként történő adagolhatósága, a mitoxantron lecsökkentett toxicitása, különösképpen a mitoxantron szívizomban történő felhalmozódásának csökkentése, a mitoxantron terápiás hatékonyságának fokozása és a ráksejtek több-hatóanyagos rezisztenciájának modulálása. A gyógyszerkészítmény összetételekben a kardiolipin alkalmazása meglepő mértékben megemeli a liposzómákba zárható mitoxantron mennyiségét.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmény a mitoxantron liposzóma készítménye, amely kardiolipint tartalmaz. A liposzóma készítményeket általánosan ismert eljárásokkal állíthatjuk elő. Például az egyik előnyös előállítási eljárásban a mitoxantront a kardiolipinnel együtt feloldjuk egy hidrofób oldószerben, és hagyjuk, hogy a kardiolipin komplexet alkosson a mitoxantronnal. A kardiolipin-mitoxantron tartalmú elegyet bepárolhatjuk, hogy a komplex-képződés elősegítésére egy film keletkezzék. Ezután bármely kívánság szerinti további lipofil összetevő oldatát hozzáadhatjuk ehhez a filmhez, és a mitoxantron-kardiolipin komplexet feloldjuk, vagy alaposan eldiszpergáljuk ebben az oldatban. Az oldatot

ezután bepároljuk, hogy egy második lipid filmet kapjunk. Egy poláros oldószert, például vizes oldószert adunk a lipid filmhez, és az így kapott keveréket alaposan elhomogenizáljuk, hogy előállítsuk a jelen találmány szerinti liposzómákat.

Egy másik megoldás szerint a lipofil összetevőket fel lehet oldani egy megfelelő oldószerben, majd be lehet párolni a rendszert, hogy lipofil filmet kapjunk. Ezután egy poláros oldószert, például egy vizes oldószert adunk a lipid filmhez, és az így kapott keveréket alaposan elhomogenizáljuk, hogy előállítsuk a jelen találmány szerinti liposzómákat.

Amikor a mitoxantron a fent leírtak szerint beleoldódott a lipid filmbe, a gyógyszerkészítményt megfelelően becsomagoljuk egyszeri adagolású üveg fiolákba, amelyekben a megfelelő vizes oldószer beletöltésével előállíthatóak a liposzómák. Alternatív megoldásként kettős üveg fiola rendszert is készíthetünk, amikor az egyik üveg fiolába kiszereljük a lipofil alkotórészeket vagy az előformált liposzómákat, a másikba pedig a mitoxantront tartalmazó vizes alkotórészeket. A vizes alkotórészeket és a mitoxantront tartalmazó üveg fiola tartalmát beleöntjük a lipid filmet vagy az előformált liposzómákat tartalmazó üveg fiolába, és a mitoxantron tartalmú liposzómákat erélyes összekeveréssel, örvénykeverős és/vagy ultrahangos homogenizálással állítjuk elő.

Kívánt esetben a liposzómákat méretük ellenőrzése végett képződésük után megfelelő szűrőkön átszűrjük. Megfelelő szűrők azok, amelyek segítségével a megfelelő részecskeméret-tartományba eső liposzómák kiszűrhetők. Például

27709

elkészítésük után leszűrhetjük a liposzómákat egy 5 μm lyukbőségű szűrőn, és így körülbelül 5 μm vagy ennél kisebb méretű liposzómákat kapunk. De alkalmazhatunk 1 μm, 500 nm, 200 nm, 100 nm vagy egyéb lyukbőségű szűrőket, hogy a megfelelő liposzóma méretet kapjuk.

A mitoxantron tartalmú gyógyszerkészítmény előállításához a mitoxantront feloldjuk egy megfelelő oldószerben. Megfelelő oldószerek azok, amelyekben a mitoxantron feloldódik, és amelyeket elpárologtathatunk anélkül, hogy gyógyszerészetileg elfogadhatatlan mennyiségű, gyógyszerészetileg elfogadhatatlan maradék maradjon vissza a bepárlás után. Például nem poláros, enyhén poláros vagy poláros oldószereket alkalmazhatunk, például etanolt, metanolt, kloroformot, acetont, élettani sóoldatot stb.

Bármilyen megfelelő kardiolipint felhasználhatunk a jelen találmányban. Például a kardiolipin származhat természetes forrásból tisztítás útján, vagy kémiai szintézisből, mint például a tetramirisztilkardiolipin. A kardiolipint feloldjuk egy megfelelő oldószerben, amely oldószerben a kardiolipin oldódik, és amelyet elpárologtathatunk anélkül, hogy gyógyszerészetileg elfogadhatatlan mennyiségű, gyógyszerészetileg elfogadhatatlan maradék maradjon vissza belőle a bepárlás után. A kardiolipin oldat elkeverhető a mitoxantron oldattal. Egy alternatív megoldás lehet az, hogy a kardiolipint közvetlenül a mitoxantron oldatában oldjuk fel. Azt találtuk, hogy a kardiolipin liposzómába való belefoglalása révén a liposzóma mitoxantron befogadó képessége meglepő mértékben megnövekszik. Így megfelelő kardiolipin

származékokat is alkalmazhatunk a jelen találmány szerinti liposzómás gyógyszerkészítményekben, amíg a képződött liposzómák kellően stabilak terápiás felhasználásra, és megfelelő mitoxantron-kötő képességgel rendelkeznek.

Bármilyen megfelelő liposzóma-képző anyag felhasználható a jelen találmány szerinti liposzóma gyógyszerkészítményekhez. Megfelelő liposzóma-képző anyagok azok a szintetikus, fél-szintetikus (módosított természetes) vagy természetes vegyületek, amelyek hidrofil és hidrofób résszel egyaránt rendelkeznek. Ezek a vegyületek amfifil molekulák melyek töltése egyaránt lehet pozitív, negatív vagy semleges. A liposzóma képző vegyületek hidrofób része tartalmazhat egy vagy több nem poláros, alifás láncot, például palmitoil csoportokat. Megfelelő liposzóma-képző vegyületek például a foszfolipidek, szterolok, zsírsavak és a hasonló vegyületek. Előnyös liposzóma képző vegyület például a kardiolipin, foszfatidil-kolin, koleszterin, dipalmitoil-foszfatidil-kolin, foszfatidil-szerin és az α-tokoferol.

A liposzóma képző anyagot feloldjuk egy megfelelő oldószerben, amelyben feloldódik, amely lehet egy olyan alacsony polaritású vegyület, mint például a kloroform, vagy egy nem poláros oldószer, mint például a n-hexán. Csak azok a megfelelő oldószerek, amelyekben a liposzóma-képző anyagok oldhatóak, és amelyeket elpárologtathatunk anélkül, hogy gyógyszerészetileg elfogadhatatlan mennyiségű, gyógyszerészetileg elfogadhatatlan maradék maradjon vissza a bepárlás után. Egyéb összetevőket is belekeverhetünk ebbe az oldatba, beleértve a mitoxantront is, és így előállíthatunk

egy olyan oldatot, amelyben minden összetevő feloldott állapotban van jelen, és amelyből az oldószer elpárologtatásával egy homogén lipid filmet kapunk. Az oldószert bármely megfelelő eljárással bepárolhatjuk, amelynek során a mitoxantron és a többi lipofil alkotórész stabil marad.

A megfelelő liposzómák lehetnek semlegesek, negatív vagy pozitív töltésűek attól függően, hogy milyen a liposzómát alkotó összetevők töltése és a liposzóma oldat pH-ja. Például semleges pH értéknél pozitív töltésű liposzómákat állíthatunk elő a foszfatidil-kolin, a koleszterin és a sztearil-amin keverékéből. Negatív töltésű liposzómák állíthatók elő például a foszfatidil-kolinból, koleszterinből és a foszfatidil-szerinből. A találmány szerinti egyik előnyös mitoxantron tartalmú liposzómás gyógyszerkészítmény tetramirisztoilkardiolipint, koleszterint és tojás foszfatidil-kolint tartalmaz.

Az előnyös mitoxantron tartalmú liposzómás készítményben a mitoxantron és a lipid relatív mólaránya megfelelő. A mitoxantron és a lipid megfelelő relatív mólaránya a körülbelül 1:1-50, előnyösen a körülbelül 1:2-40, még előnyösebben a körülbelül 1:5-30, még ennél is előnyösebben a körülbelül 1:10-20 tartományban van, és a legelőnyösebben körülbelül 1:15.

A liposzómás gyógyszerkészítmények megfelelő relatív moláris mennyiségben kardiolipint, foszfatidil-kolint és koleszterint is tartalmaznak. A kardiolipin:foszfatidil-kolin:koleszterin megfelelő relatív moláris mennyisége a 0,1-25:1-99:0,1-50. Előnyösebb, ha a relatív moláris arány

tartomány 0,2-10:2-50:1-25, még előnyösebb, ha 0,5-5:4-25:2-15, még ennél is előnyösebb, ha 0,75-2:5-15:4-10 és a legelőnyösebb arány az 1:10:6,8. Az előnyös liposzómás készítmények tartalmaznak megfelelő mennyiségű antioxidánst, például α-tokoferolt vagy egyéb megfelelő antioxidánsokat. A megfelelő antioxidáns mennyiség a körülbelül 0,001 tömeg% vagy többtől körülbelül 5 tömeg% vagy kevesebbig terjedő tartományban van.

A liposzómákat úgy állíthatjuk elő, hogy a lipid filmhez hozzáadunk egy poláros oldószert, előnyösen egy vizes oldatot, például élettani sóoldatot, és erélyes keveréssel eldiszpergáljuk ebben a filmet. A poláros oldószer előnyösen tartalmazza a mitoxantront. Az oldószer lehet tisztán víz, vagy tartalmazhat sókat, pufferképző anyagokat vagy egyéb oldható hatóanyagokat. Bármilyen keverési eljárás alkalmazható, feltéve, hogy a választott eljárás kellő nyíróerőt hoz létre a lipid film és a poláros oldószer között ahhoz, hogy erőteljesen elhomogenizálja a keveréket, és liposzómákat képezzen. Például a keverés történhet örvénykeverős, mágneskeverős és/vagy ultrahangos eljárással. Többrétegű liposzómákat kapunk az oldat egyszerű örvény-keverésével. Ha egyrétegű liposzómákat akarunk előállítani, akkor ultrahangos kezelés és/vagy szűrés beiktatása szükséges az előállítási eljárásba.

A mitoxantron tartalmú liposzómás készítmények előnyös előállítási eljárása során egy üveg fiolában liofilizált liposzómákat készítünk, és hozzáadjuk a Novantrone®-t, hogy mitoxantron tartalmú liposzómás gyógyszerkészítményt nyerjünk. A liofilizált liposzómákat a 7. példában

részletesebben ismertetett eljárással úgy állítjuk elő, hogy a lipid alkotórészeket és a D-α-tokoferilsavat meleg butil-alkoholban feloldjuk. Ehhez az oldathoz trehalóz-dinitrátot tartalmazó meleg vizet keverünk, amíg teljesen kitisztul. Az oldatot sterilre szűrjük 0,22 μm lyukbőségű szűrőn, steril üveg fiolákba töltjük, és liofilizáljuk. A liofilizált termék kívánalom szerint egy piszkosfehér pogácsa vagy por, amelynek nedvességtartalma körülbelül 12 % vagy kevesebb, és amelyet könnyen fel lehet oldani egy körülbelül 3-tól körülbelül 6 pH értékű homogén liposzóma oldattá.

A végtermék kialakításához a liofilizált lipideket tartalmazó üveg fiolába beletöltünk 7,5 ml mitoxantron oldatot (15 mg), például egy Novantrone® fiolából, és 7,5 ml élettani sóoldatot (0,9 % NaCl). A liposzóma keverék szobahőmérsékleten 30 percig hidratálódik, majd 2 percig szobahőmérsékleten örvénykeverővel erőteljesen keverjük. A keveréket 10 percen át hagyjuk hidratálódni, mialatt egy fürdő-típusú ultrahangos készülékben ultrahanggal maximális intenzitással homogenizáljuk. A gyógyszerkészítmény végterméket fecskendőbe vagy standard infúziós szerelékbe tölthetjük a felhasználás előtt 45 perccel, a liofilizált formából való előállításától számított 8 órán belül. Ezzel az eljárással a hozzáadott mitoxantron körülbelül 75 tömeg%-a vagy több zárható be a liposzómákba a készítményben. Még előnyösebben a mitoxantron körülbelül 80 tömeg%-a vagy több záródik be a liposzómákba. Még előnyösebben a mitoxantron 85 tömeg%-a vagy több záródik be a liposzómákba. Még ennél is előnyösebben a mitoxantron körülbelül 90 tömeg%-a vagy

több, vagy még inkább körülbelül 95 tömeg%-a vagy több záródik be a liposzómákba.

A mitoxantron bezáródás hatékonysága alikvot mennyiségű liposzóma gyógyszerkészítmény egy éjszakán át tartó, vizes oldatban történő dialízisével, és ezután a liposzómák metanolban való feloldásával és a minta standard eljárásokkal végzett analízisével, magas nyomású reverz fázisú folyadék-kromatográfia (HPLC) alkalmazásával határozható meg. Alternatív megoldásként a liposzómákat 50.000xg-n 1 órán át tartó centrifugálással is összegyűjthetjük, mielőtt metanolban feloldanánk ezeket a HPLC meghatározás céljára. Általában a mitoxantron liposzómákba történő bekapszulázási hatékonysága a kiindulási adag több, mint 80 %-a.

Még általánosabban, bármilyen liposzóma képzésre alkalmas eljárás alkalmazható, amellyel mitoxantron tartalmú liposzóma állítható elő. Tehát azok az oldószer bepárlásos eljárások is alkalmazhatók, amelyek során nem képződik száraz lipid film. Például liposzómákat állíthatunk elő oly módon, hogy emulziót készítünk vizes és szerves fázisban, majd bepároljuk a szerves oldószert. Jelen találmány valamennyi, bármilyen módon előállított mitoxantron liposzómás gyógyszerkészítményre egyaránt vonatkozik.

A találmány azon gyógyszerkészítmény termékekre, valamint azok előállítási eljárásaira is vonatkozik, amelyek a mitoxantron liposzómás gyógyszerkészítményeket nem toxikus, gyógyszerészetileg megfelelő, közömbös segédanyagokkal együtt tartalmazzák. A „gyógyszerészetileg megfelelő

segédanyagok" kifejezésbe beleértjük a szilárd, félszilárd vagy a folyékony higítószereket, töltőanyagokat és mindenféle egyéb, a formulálást elősegítő segédanyagokat. A találmány adagolási egységeket tartalmazó gyógyszerkészítményekre is vonatkozik. Ez alatt azt értjük, hogy a gyógyszerkészítmény egyedi egységekből áll, például üveg fiolákból, fecskendőkből, kapszulákból, pilulákból, kúpokból vagy ampullákból, amelyekben a liposzómákba zárt mitoxantron mennyisége megfelel egy egyedi adag tört részének vagy többszörösének. Egy adagolási egység például tartalmazhatja az egyedi adag 1-, 2-, 3- vagy 4-szeresét, vagy felét, harmadát, negyedét. Az egyedi adag előnyösen azt a mitoxantron mennyiséget jelenti, amelyet egyszerre beadunk a betegnek, és amely általában megfelel a napi teljes, fél vagy harmad vagy negyed adagnak.

Megfelelő gyógyszerkészítmény forma a tabletta, drazsé, kapszula, pilula, granulátum, kúp, oldat, szuszpenzió, emulzió, paszta, kenőcs, gél, krém, külsőleges oldat, por és a spray. A kúpok a liposzómában lévő mitoxantron mellett tartalmazhatnak még megfelelő, vízoldékony vagy vízben oldhatatlan segédanyagokat. Megfelelő segédanyagok azok, amelyekben a találmány szerinti liposzómás mitoxantron kellően stabil a terápiás alkalmazáshoz, ilyenek például a polietilénglikolok, bizonyos zsírok, észterek és ezek keverékei. A kenőcsök, paszták, krémek és gélek is tartalmazhatnak olyan segédanyagokat, amelyekben a liposzómás mitoxantron stabil.

A mitoxantron gyógyszerkészítmény összetétel előnyösen a gyógyszerkészítmény szárazanyag tartalmának körülbelül

0,1-50 tömeg%-ában, előnyösen körülbelül 0,5-25 tömeg%-ában van jelen a fent említett gyógyszerkészítmény formákban.

A fent említett gyógyszerkészítmény formák a szokásos módon az ismert eljárásokkal állíthatók elő, például a liposzómás mitoxantron egy vagy több segédanyaggal való összekeverésével.

A hatóanyagot és a hatóanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmény formákat az ember- és állatgyógyászatban alkalmazhatjuk a betegségek megelőzésére, enyhítésére és/vagy gyógyítására, főleg az olyan betegségek esetében, amelyeket sejtburjánzás okoz, mint amilyen például a rák, bármely emlősben, mint például a tehén, ló, sertés, kutya vagy macska. Például a kutyák limfómáját hatékonyan kezelhetjük a jelen találmány szerinti mitoxantron gyógyszerkészítménnyel. A jelen találmány szerinti gyógyszerkészítmény azonban különösen előnyösen alkalmazható emberek kezelésére, főként a rák és más egyéb, sejtburjánzás következtében kialakuló betegségek esetében. A találmány szerinti gyógyszerkészítmény különösen előnyös az emberi szklerózis multiplex, limfóma, valamint a prosztata-, máj-, petefészek-, emlő-, tüdő- és vastagbélrák gyógyításában.

A hatóanyagot vagy annak gyógyszerkészítmény formáit adagolhatjuk lokálisan, orálisan, parenterálisan, intraperitoneálisan és/vagy rektálisan, előnyösen parenterálisan, de a legelőnyösebben mégis intravénásan.

Egy körülbelül 70 kg-os testtömegű embernek például körülbelül 0,5-100 mg/m^2 mitoxantron adható. Előnyösen körülbelül 5,0 mg/m^2 vagy több-től 50 mg/m^2 mitoxantron, még

előnyösebben körülbelül 10 mg/m^2 vagy több-től körülbelül 45 mg/m^2 adható. Még ennél is előnyösebben körülbelül 20 mg/m^2 vagy több-től körülbelül 40 mg/m^2, és még ennél is előnyösebben körülbelül 25 mg/m^2 vagy több-től körülbelül 40 mg/m^2 mitoxantron adható. Előfordulhat azonban, hogy a kezelésre szoruló beteg állapotától és testtömegétől, a betegség természetétől és súlyosságától, a gyógyszer-készítmény természetétől, az adagolástól, valamint az adagolás idejétől vagy időtartamától függően el kell térni az itt megadott adagoktól. Így előfordulhat, hogy egyes esetekben elégséges a fent felsoroltaknál kisebb adagok adása a hatóanyagból, míg más esetekben a fenti hatóanyag adagok megnövelhetők. A megfelelő adagok azok a terápiásan hatékony adagok, amelyek toxicitása, amint az a tapasztalat és az esettanulmányok alapján meghatározható, nem túlságosan nagy.

A jelen találmány egyik előnye, hogy az a mitoxantronnal kezelt rákos sejtek több-hatóanyagos rezisztenciáját moduláló eljárásra is vonatkozik. Pontosabban a jelen találmány szerinti liposzómás gyógyszerkészítmény csökkenti a mitoxantron kemoterápiával kezelt sejtek azon hajlamát, hogy rezisztencia fejlődjék ki bennük a mitoxantronnal, illetve más hatóanyagokkal, például a kamptotecinnel, taxollal vagy a doxorubicinnel szemben. Ennélfogva más anyagokat is előnyösen alkalmazhatunk a jelen találmány szerinti kezeléssel együtt, akár a hatóanyag és a mitoxantron kombinációjával, akár külön történő adagolással.

A példákban bemutatjuk, hogy a mitoxantron adagolás farmakológiai hatékonyságát az emlős tumorokra nem gyengíti, ha a mitoxantront liposzómákba zárjuk. Azonfelül az állatok nagyobb mitoxantron adagokat toleráltak a liposzómás mitoxantronból, és az átlagos túlélési idővel vagy a tumor térfogat csökkenésével mérve jobb eredményeket mutattak, mint azok az állatok, amelyeket a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítményekkel kezeltünk. Bemutatjuk egerekben és kutyákban a magasabb plazmakoncentráció értékeket, illetve egerekben a vegyület hosszabb felezési idejét. Összehasonlítható adagok esetében a plazma csúcskoncentráció értékei egerekben körülbelül 50-szer, kutyákban körülbelül 9-szer voltak magasabbak. Az egereknél a hagyományos mitoxantron szöveti koncentráció értékei a liposzómás készítmény beadása után a szívben, a tüdőben és a vesékben alacsonyabbak, a májban és a lépben magasabbak voltak a hagyományos gyógyszerkészítményhez képest. Toxicitás mindaddig nem fordult elő, amíg magasabb adagokat nem adagoltunk a liposzómás mitoxantronból a hagyományos mitoxantronhoz képest, bár a toxicitási profilok hasonlónak tűntek. Semmiféle olyan toxicitás nem jelentkezett a liposzómás gyógyszerkészítménynél, amit a mitoxantron egyedüli adagolásakor már ne tapasztaltunk volna. Az állatok jobban tolerálták a liposzómás mitoxantron nagyobb adagjait, és azok hatásosabbak voltak, mint a hagyományos mitoxantron adagjai a jelenlegi hagyományos (nem liposzómás) gyógyszerkészítmény formájukban.

A jelen találmányt a továbbiakban a korlátozás szándéka nélkül, pusztán csak a szemléltetésre szolgáló példákkal mutatjuk be.

1. példa

Ebben a példában bemutatunk egy liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítményt. 3 μM mitoxantront és 3 μM kardiolipint feloldunk kloroformban. 14 μM foszfatidil-kolin hexánban lévő és 10 μM koleszterin kloroformban lévő oldatát keverés közben hozzáadjuk a mitoxantron oldathoz. Az oldószereket vákuumban körülbelül 30 °C vagy ez alatti hőmérsékleten elpárologtatjuk, és így létrehozzuk a lipid és a hatóanyag vékony száraz filmjét. 2,5 ml élettani sóoldat hozzáadásával és az alkotórészek örvénykeverővel történő erélyes elkeverésével liposzómákat készítünk. A fiolákban ezután örvénykeverős keveréssel többrétegű, vagy ultrahangos kezeléssel kisméretű egyrétegű liposzómákat állítunk elő.

2. példa

Ebben a példában bemutatjuk egy másik liposzómás mitoxantron készítmény előállítását. Körülbelül 6 μM mitoxantronból, 6 μM kardiolipinből, 28 μM foszfatidil-kolinból és 20 μM koleszterinből megfelelő oldószerben oldatot készítünk, majd az oldószert elpárologtatjuk. A lipidet és a hatóanyagot tartalmazó, megszárított filmet eldiszpergáljuk 7 %-os vizes trehalóz-élettani sóoldatban. A keveréket örvénykeverővel és ultrahanggal kezeljük. A liposzómákat ezután kívánalom szerint dializálhatjuk. HPLC meghatározás

alapján a mitoxantron bekapszulázottságát 80 %-nak vagy többnek találtuk.

3. példa

Ebben a példában bemutatjuk egy másik liposzómás mitoxantron készítmény előállítását. 2,5 ml térfogatban 3 μM hatóanyag, 15 μM dipalmitoil-foszfatidil-kolin, 1 μM kardiolipin és 9 μM koleszterin felhasználásával liposzómákba zárjuk a mitoxantront. A hatóanyag és a lipidek keverékéből az oldószert vákuum alatt elpárologtatjuk, és a képződött filmet ugyanolyan térfogatú élettani sóoldatban elszuszpendáljuk. A liposzómákat az 1. példa szerinti eljárással állítjuk elő. Ezzel az eljárással a mitoxantron bekapszulázási hatékonyság több, mint 80 %-os.

4. példa

Ebben a példában bemutatjuk egy másik liposzómás mitoxantron készítmény előállítását. Ennél a mitoxantron liposzómás készítménynél 2 μM mitoxantronból, 2 μM foszfatidil-szerinből, 11 μM foszfatidil-kolinból, 2 μM kardiolipinből és 7 μM koleszterinből oldatot készítünk. A liposzómákat az 1. példa szerinti eljárással állítjuk elő. Így a mitoxantron bekapszulázási hatékonyság várhatóan több, mint 80 %-os.

5. példa

Ebben a példában bemutatunk egy másik liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítményt. 3 μM mitoxantront feloldunk 3 μM kardiolipint tartalmazó kloroformban, és hagyjuk, hogy a keverékben komplexek képződjenek. A komplex-képződés elősegítésére a kloroformot elpárologtatással eltávolítjuk. 14 μM foszfatidil-kolin hexánban lévő és 10 μM koleszterin kloroformban lévő oldatát hozzáadjuk a száraz filmhez. A keveréket enyhén keverjük, és az oldószereket vákuumban 30 °C alatti hőmérsékleten elpárologtatjuk, és így létrehozzuk a lipid és a hatóanyag vékony száraz filmjét. 2,5 ml élettani sóoldat hozzáadásával, és az alkotórészek örvénykeverővel történő erélyes elkeverésével liposzómákat készítünk. A fiolákban ezután örvénykeverős keveréssel többrétegű, vagy kívánt esetben ultrahangos kezeléssel kisméretű egyrétegű liposzómákat állítunk elő.

6. példa

Ebben a példában bemutatunk egy másik liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítményt. Általában ez az eljárás a következő lépésekből áll: a mitoxantron oldat előállítása, a mitoxantron oldat hozzáadása az előre elkészített liposzómákhoz, a keverékben az egyensúlyi állapot kialakulása és így a mitoxantron tartalmú liposzómák kialakulása. Minden egyes Novantrone® üveg fiola 2 mg/ml szabad bázisnak megfelelő mennyiségű mitoxantron-hidrokloridot, 0,8

tömeg/térfogat% nátrium-kloridot, 0,005 tömeg/térfogat% nátrium-acetátot és 0,046 tömeg/térfogat% ecetsavat tartalmaz. A Novantrone® oldat pH-ja 3,0-4,5 között van, és 0,14 mEq/ml nátriumot tartalmaz.

Előformált liposzómákat készítünk a következő eljárással: körülbelül 2 g D-α-tokoferolsav-szukcinátot hozzáadunk körülbelül 10 kg t-butil-alkoholhoz, amelyet felmelegítünk körülbelül 35-40 °C hőmérsékletűre. Az oldatot körülbelül 5 percen át keverjük, amíg a tokoferol fel nem oldódik. Az oldathoz hozzáadunk körülbelül 60 g tetramirisztoil-kardiolipint, és körülbelül 5 percig keverjük. Az oldathoz hozzáadunk körülbelül 100 g koleszterint, és további körülbelül 5 percig keverjük, majd hozzáadunk körülbelül 300 g tojás foszfatidil-kolint, és megint körülbelül 5 percig keverjük. 2.000 g körülbelül 35-40 °C hőmérsékletű víz és körülbelül 120 g trehalóz-dihidrát oldatát mint második vizes oldatot hozzáadjuk a lipid oldathoz, és addig keverjük, amíg tiszta oldatot nem kapunk. Az oldatot sterilre szűrjük 0,22 µm lyukbőségű Durapore® Millipak 200 szűrőn, és körülbelül 11 g-onként steril üveg fiolákba töltjük, majd liofilizáljuk. Az ezzel az eljárással készített liposzómák piszkosfehér pogácsa vagy por formájúak, és könnyen oldatba vihetők. A liofilizált liposzómák nedvességtartalma körülbelül 12 % vagy ennél kevesebb. A liofilizált terméket felhasználás előtt 4 °C hőmérsékleten tároljuk.

A liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény előállításához 7,5 ml élettani sóoldatot (0,9 % nátrium-klorid) és egy Novantrone® fiolából 7,5 ml mitoxantron oldatot (15

mg) beletöltünk a liofilizált lipidet tartalmazó üveg fiolába. Az üveg fiola tartalmát enyhén kavargatjuk, és szobahőmérsékleten 30 percen át hagyjuk hidratálódni, 2 percig erőteljesen keverjük örvénykeverővel, és vízfürdő típusú ultrahangos berendezésben 10 percen át a maximális fokozaton ultrahanggal kezeljük. Az üveg fiolából ezután adagokat vehetünk ki használatra. A gyógyszerkészítményt elkészíthetjük egy fecskendőben vagy egy infúziós szerelékben a felhasználás előtt 45 percen belül. Kívánatos, hogy a mitoxantron liposzómás gyógyszerkészítményt a felhasználásig szobahőmérsékleten tároljuk, és az újrafeloldástól számított 8 órán belül felhasználjuk.

7. példa

Ebben a példában bemutatunk egy másik liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítményt. Előállítottunk egy kardiolipin : foszfatidil-kolin : koleszterin 1:10:6,8 mólarányú liofilizált lipid készítményt. 29 kísérletet végeztünk el, és változtattuk a mitoxanton lipidekhez viszonyított arányait, a hidratációs és az ultrahangos kezelési időket. A gyógyszerkészítményeket egy éjszakán át dializáltuk élettani sóoldatban, és minden egyes összetételnél meghatároztuk a visszamaradó mitoxantron mennyiségét.

A vizsgálat eredménye azt mutatta, hogy a mitoxantron : lipid 1:15 aránya (a mitoxantron 1 mg-jára 2 mg 1,1,2,2-tetramirisztoil-kardiolipin, 12 mg foszfatidil-kolin és körülbelül 4 mg koleszterin esik), a 2 órás hidratálási idő és a 10 perces ultrahangos homogenizálás mellett 1 mg/ml mitoxantron oldat

esetében 94±3 %, 2 mg/ml mitoxantron oldat esetében 95±6 % és 1,5 mg/ml mitoxantron oldat esetében 97 % mitoxantron maradt benne a liposzómákban. A hidratációs idő 30 percre történő lecsökkentése nem befolyásolta érdemlegesen a liposzómába kerülő mitoxantron mennyiségét az 1 mg/ml mitoxantron oldat alkalmazása esetében.

Amennyiben külön nem jelöljük, a további példákban az 1 mg/ml mitoxantron oldatot alkalmazzuk 1:15 mitoxantron:lipid mólaránnyal, 2 órás hidratálási és 10 perces ultrahangos homogenizálási idővel.

8. példa

Az itt következő példa bemutatja, hogy a mitoxantron a fent ismertetett liposzómás gyógyszerkészítményekben kisebb toxicitással rendelkezik, mint az azonos koncentrációjú hagyományos (nem liposzómás) mitoxantron, és liposzómás gyógyszerkészítményként adagolva a legalább 15 mg/kg mitoxantron az egereknél nem toxikus.

80 darab hím, CD2F1, 20-22 g testtömegű egeret 1 hétig szoktattunk a körülményekhez, és véletlenszerűen tízesével 8 csoportba osztottuk őket. Minden ketrecbe 5 állatot helyeztünk. A vizsgálat kezdeti napján (0. nap) minden állat farki vénájába i.v. beadtuk a hatóanyagot vagy a vivőanyagot mint kontroll készítményt. A beadott térfogat az állatok egyéni testtömegétől függött. Az állatok testtömegét az injekciót követő minden második napon megmértük, és betegségre utaló klinikai tüneteiket legalább naponta regisztráltuk. A 8 csoport az 1. táblázatban megadottak szerinti injekciókat kapta.

1. táblázat

csoport	gyógyszerkészítmény	adag
1.	hagyományos mitoxantron	15mg/kg
2.	hagyományos mitoxantron	10mg/kg
3.	hagyományos mitoxantron	5mg/kg
4.	liposzómás mitoxantron	15mg/kg
5.	liposzómás mitoxantron	10mg/kg
6.	liposzómás mitoxantron	5mg/kg
7.	üres liposzómák	15mg/kg
8.	élettani sóoldat	

Az első 5 napon egyik állat sem mutatott klinikai mellékhatásokat. A 6-10. napon az 1. csoportba tartozó valamennyi állat súlyos állapotba került. Az egyik súlyosan beteg állat a 9. napon elhullott, a többit a 10 napon leöltük. A 4., 7. és a 8. csoportból 4 állatot szándékosan leöltünk, és hematológiai és labor vizsgálatokat végeztünk. Főbb szerveiket 10 %-os pufferelt formalinban fixáltuk, és megvizsgáltuk.

A toxicitás klinikai jeleit az 1. csoport kivételével sehol sem tapasztaltuk. A vizsgálat befejeztével valamennyi állatot leöltük, hematológiai és labor vizsgálatokat végeztünk rajtuk, főbb szerveiket 10 %-os pufferelt formalinban fixáltuk, és megvizsgáltuk.

Az állatok testtömegének összehasonlítása a különböző csoportokban klinikailag enyhe vagy elhanyagolható változást mutatott valamennyi csoportban, kivéve az 1., a hagyományos

mitoxantron 15 mg/kg-os adagjával kezelt csoportot. Az 1. csoportban az állatok a 9/10 napra a testtömegük 35 %-áig terjedő mértékű, fokozódó testtömeg-veszteséget mutattak. A 2. csoportban az állatok kezdetben jelentős, a 10. napra a 20 %-ot elérő testtömeg-veszteséget mutattak, ám a kezelés további szakaszában fokozatosan felépültek. Az összes többi csoportba tartozó állatnál testtömeg-gyarapodást tapasztaltunk a vizsgálat teljes időtartama alatt.

Ebben és a további vizsgálatokban megvizsgáltuk a vérben a bilirubin, a vér urea nitrogén (BUN), kreatinin, alkalikus foszfatáz, aszpartát-aminotranszferáz (AST), alanin-aminotranszferáz (ALT) és hemoglobin koncentrációt, a hematokrit értéket, a fehérvérsejt és a vörösvértest számot, a vörösvértestek átlagos korpuszkuláris térfogatát (MCV), átlagos korpuszkuláris hemoglobin (MCH) tartalmát, átlagos korpuszkuláris hemoglobin koncentrációját (MCHC) és a vérlemezkék, a neutrofil és a pálcikamagvú neutrofil granulociták, limfociták, monociták, eozinofil és bazofil granulociták számát.

Klinikailag jelentősen emelkedett ALT értéket tapasztaltunk a 10. napon az 1. csoportban a legtöbb egérnél, és a 7. csoportban egy egérnél.. Az AST értékekben hasonló növekedést tapasztaltunk. Az 1. csoportban csoportban két egér változatlan kreatinin érték mellett enyhe BUN emelkedést mutatott, ami prérenális hatásra utal, és amit feltehetően a dehidráció vagy a vér bekoncentrálódása okozott. Más egyéb, a hatóanyaggal összefüggő mellékhatást nem tapasztaltunk ebben a vizsgálatban.

A szerv-patológiai vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a hatóanyag a hagyományos és a liposzómás mitoxantron kezelésnél egyaránt hat az egerekben a lép és a csontvelő vérképző és limfoid szöveteire. A 67. napon a liposzómás mitoxantronnal kezelt állatoknál a kapott adagtól függetlenül teljes felépülést tapasztaltunk, ami azt sugallja, hogy a liposzómás mitoxantron kevésbé citotoxikus.

Összefoglalva, a vizsgálat során sem morbiditást sem mortalitást nem tapasztaltunk a vivőanyag kontrollal és a liposzómás mitoxantronnal kezelt állatok között, még a 15 mg/kg adagnál sem, ezzel szemben a 15 mg/kg mitoxantron-hidrokloridot tartalmazó hagyományos gyógyszerkészítménnyel kezelt állatoknál a morbiditás 100 %-os volt.

9. példa

Az itt következő példában bemutatjuk, hogy a 7. példa szerinti liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény toxicitása kisebb, mint az azonos adagú hagyományos mitoxantron-hidroklorid gyógyszerkészítményeké, valamint azt, hogy a mitoxantron 35 mg/kg-ig terjedő adagban adható egereknek liposzómás gyógyszerkészítményben anélkül, hogy nyilvánvaló toxicitás tapasztalható lenne.

20 darab hím, CD2F1, 20-22 g testtömegű egeret 1 hétig szoktattunk a körülményekhez, és véletlenszerűen ötösével 4 csoportba osztottuk őket. Minden ketrecbe 5 állatot helyeztünk. A vizsgálat kezdeti napján (0. nap) minden állat farki vénájába i.v. beadtuk a hatóanyagot vagy a vivőanyagot mint kontroll készítményt. A beadott térfogat az állatok egyéni

27709

testtömegétől függött. Az állatok testtömegét az injekciót követő minden második napon megmértük minden egyes egérnél, és betegségre utaló klinikai tüneteiket legalább naponta regisztráltuk. A 4 csoport a 2. táblázatban megadottak szerinti injekciókat kapta.

2. táblázat

csoport	gyógyszerkészítmény	adag
1.	liposzómás mitoxantron	35mg/kg
2.	liposzómás mitoxantron	20mg/kg
3.	hagyományos mitoxantron	25mg/kg
4.	üres liposzómák	35mg/kg

Az első 5 napon egyik állat sem mutatott mellékhatásokat. A 6-7. napon a 3. csoportba tartozó valamennyi állat súlyos állapotba került. Az egyik súlyosan beteg állat a 6. napon elhullott, a 3. csoportban a többi állatot a 7. napon leöltük. A többi csoportban semmilyen nyilvánvaló toxicitási tünetet nem tapasztaltunk.

A vizsgálat befejeztével valamennyi állatot leöltük, és a 8. példa szerint hematológiai és labor vizsgálatokat végeztünk rajtuk. Az állatok főbb szerveit 10 %-os pufferelt formalinban fixáltuk, és megvizsgáltuk valamennyi állatnál.

Az állatok testtömegének összehasonlítása a különböző csoportokban klinikailag enyhe vagy elhanyagolható változást mutatott valamennyi csoportban, kivéve a 3., a hagyományos mitoxantron 25 mg/kg-os adagjával kezelt csoportot. A 3. csoportban az állatok a 7. napra a testtömegük 30 %-áig

27709

terjedő mértékű, fokozódó testtömeg-veszteséget mutattak. Az 1. csoportban az állatok kezdetben jelentős, a 10. napra a 20 %-ot elérő testtömeg-veszteséget mutattak, ám a kezelés további szakaszában fokozatosan felépültek. Az összes többi csoportba tartozó állatnál testtömeg-gyarapodást tapasztaltunk a vizsgálat teljes időtartama alatt.

Összefoglalva, a vizsgálat során sem morbiditást sem mortalitást nem tapasztaltunk a vivőanyag kontrollal és a liposzómás mitoxantronnal kezelt állatok között, míg a 25 mg/kg mitoxantron tartalmú hagyományos gyógyszerkészítménnyel kezelt állatoknál a morbiditás 100 %-os volt.

10. példa

Az itt következő példában bemutatjuk, hogy a 7. példa szerinti liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény toxicitása kisebb, mint az azonos adagú hagyományos mitoxantron-hidroklorid gyógyszerkészítményeké, valamint azt, hogy a mitoxantron legalább 35 mg/kg adagja liposzómás gyógyszerkészítményben az egereknél nem toxikus.

70 darab hím, CD2F1, 20-22 g testtömegű egeret 1 hétig szoktattunk a körülményekhez, és véletlenszerűen tízesével 7 csoportba osztottuk őket. Minden ketrecbe 5 állatot helyeztünk. A vizsgálat kezdeti napján (0. nap) minden állat farki vénájába i.v. beadtuk a hatóanyagot vagy a vivőanyagot mint kontroll készítményt. A beadott térfogat az állatok egyéni testtömegétől függött. Az állatok testtömegét az injekciót követő minden második napon megmértük minden egyes

27709

egérnél, és betegségre utaló klinikai tüneteiket legalább naponta regisztráltuk. A 7 csoport a 3. táblázatban megadottak szerinti injekciókat kapta.

3. táblázat

csoport	gyógyszerkészítmény	adag
1.	hagyományos mitoxantron	10mg/kg
2.	hagyományos mitoxantron	25mg/kg
3.	liposzómás mitoxantron	10mg/kg
4.	liposzómás mitoxantron	25mg/kg
5.	liposzómás mitoxantron	35mg/kg
6.	üres liposzómák	35mg/kg
7.	élettani sóoldat	

Az első 2 napon egyik állat sem mutatott mellékhatásokat. A 3. napon a 2. csoportban az összes állat súlyos állapotba került, és hármat leöltünk. A 3. napon az 1., 3., 4., 5., 6. és a 7. csoportból 3-3 állatot szándékosan leöltünk, majd hematológiai és labor vizsgálatokat végeztünk rajtuk.

A 7. napon a 2. csoportból 3 további súlyosan beteg állatot, az 1., 3., 4., 5., 6. és a 7. csoportból további 3-3 állatot leöltünk. A 10. napon elpusztultak a 2. csoportban eddig megmaradt állatok. A toxicitás semmilyen további tünetét nem tapasztaltuk 60 napon át. A 2. csoportot kivéve a toxicitás semmilyen klinikai tünetét nem láttuk egyik csoportban sem.

A vizsgálat befejeztével valamennyi megmaradt állatot leöltük, és hematológiai és labor vizsgálatokat végeztünk rajtuk a 8. példában leírtak szerint. Az állatok főbb szerveit 10

%-os pufferelt formalinban fixáltuk, és megvizsgáltuk valamennyi állatnál.

Az állatok testtömegének összehasonlítása a különböző csoportokban klinikailag enyhe vagy elhanyagolható változást mutatott valamennyi csoportban, kivéve a 2., a hagyományos mitoxantron 25 mg/kg-os adagjával kezelt csoportot. A 2. csoportban az állatok, a 7. napra a testtömegük körülbelül 27 %-áig terjedő mértékű, fokozódó testtömeg-veszteséget mutattak. Az 1. és az 5. csoportban az állatok kezdetben jelentős (13% és 8%) testtömeg-veszteséget mutattak, ám a kezelés további szakaszában fokozatosan felépültek. Az összes többi csoportba tartozó állatnál testtömeg-gyarapodást tapasztaltunk a vizsgálat teljes időtartalma alatt.

A 3. napon semmilyen, a hatóanyag hatásával összefüggésbe hozható labor vizsgálati eredményt nem találtunk, bár egy egérnél a 2. csoportból (25 mg/kg hagyományos mitoxantron) és egy másik egérnél az 5. csoportból (35 mg/kg liposzómás mitoxantron) enyhe ALT érték növekedés mutatkozott. Az üres liposzómákkal kezelt egerek kivételével a legtöbb, mitoxantronnal kezelt egérnél citotoxikus hatásokat tapasztaltunk a fehérvérsejtekben.

A 7. napon a labor eredmények nem voltak egyértelműek, bár az AST és az ALT aktivitás néhány állatnál, összefüggésbe hozhatóan bizonyos mértékű májkárosodással, a nagyobb értékek felé irányulva, szélesebb tartományban ingadozott. A 67. napon az egereknél hasonló, nem következetes értéknövekedést tapasztaltunk ugyanúgy, ahogy a 6. csoportba tartozó, üres liposzómákal kezelt egerek némelyikénél.

Összefoglalva, a vizsgálat során sem morbiditást sem mortalitást nem tapasztaltunk a vivőanyag kontrollal és a liposzómás mitoxantronnal kezelt állatok között, míg a 2. csoportba tartozó, 25 mg/kg hagyományos mitoxantronnal kezelt állatoknál a morbiditás 100 %-os volt.

11. példa

Az itt következő példában bemutatjuk, hogy a mitoxantron többszöri adagja jobban tolerálható a 7. példa szerinti liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény, mint az azonos mennyiségű hagyományos mitoxantron-hidrokloridot tartalmazó gyógyszerkészítmény adagolásakor, valamint azt, hogy a mitoxantron liposzómás gyógyszerkészítmény legalább 10 mg/kg adagban 5 egymást követő napon át történő ismételt adagolása az egereknél nem toxikus.

40 darab hím, CD2F1, 20-22 g testtömegű egeret 1 hétig szoktattunk a körülményekhez, és véletlenszerűen ötösével 8 csoportba osztottuk őket. Minden ketrecbe 5 állatot helyeztünk. A vizsgálat kezdeti napján (0. nap) minden állat farki vénájába i.v. beadtuk a hatóanyagot vagy a vivőanyagot mint kontroll készítményt, majd ezt követően 5 napon át minden nap egyszer megismételtük az adagolást. A beadott térfogat az állatok egyéni testtömegétől függött. Az állatok testtömegét az injekciót követő minden második napon megmértük minden egyes egérnél, és betegségre utaló klinikai tüneteiket legalább naponta regisztráltuk. A 8 csoport a 4. táblázatban megadottak szerinti injekciókat kapta.

4. táblázat

csoport	gyógyszerkészítmény	adag
1.	hagyományos mitoxantron	2,5 mg/kg
2.	hagyományos mitoxantron	5,0 mg/kg
3.	hagyományos mitoxantron	7,5 mg/kg
4.	liposzómás mitoxantron	2,5 mg/kg
5.	liposzómás mitoxantron	5,0 mg/kg
6.	liposzómás mitoxantron	7,5 mg/kg
7.	üres liposzómák	7,5 mg/kg
8.	élettani sóoldat	

Az első 5 napon egyik állat sem mutatott mellékhatásokat. A 6. napon az 1., 2., 3. és a 6. csoportba tartozó állatok összegörnyedtek, és a szőrük csapzott lett. A 2. és a 3. csoportból 2 súlyosan beteg állatot leöltünk. Minden csoportból 2 további állatot leöltünk a vizsgálat céljára. A 7. napon a 2. csoport 3 és a 3. csoport 2 súlyosan beteg állatát leöltük. A 3. csoport egy további állata elhullott. A 6., 7. és a 8. csoportból 1-1 állatot a hematológiai és laborvizsgálatok céljára leöltünk. A többi megmaradt állaton 60 napon át nem észleltük a toxicitás klinikai jeleit. A 60. napon valamennyi állatot leöltük. Vérmintákat gyűjtöttünk a 8. példában ismertetett hematológiai és labor vizsgálatok céljára. Az állatok főbb szerveit 10 %-os pufferelt formalinban fixáltuk.

A különböző csoportokba tartozó állatok testtömegének változása mérsékelt, csekély vagy elhanyagolható volt, kivéve a 2. (5 mg/kg hagyományos mitoxantron) és a 3. (7,5 mg/kg hagyományos mitoxantron) csoportokat. Az ezekbe a

csoportokba tartozó állatok fokozódó testtömeg-veszteséget mutattak, ami a 7. napra elérte a körülbelül 25 %-ot. Az 1. (2,5 mg/kg hagyományos mitoxantron) és a 6. (7,5 mg/kg liposzómás mitoxantron) csoportba tartozó állatok kezdetben elvesztették testtömegük körülbelül 28 %-át, de a vizsgálat végére fokozatosan visszanyerték eredeti testtömegüket. A többi vizsgálati csoportban testtömeg-változás a vizsgálat alatt nem volt tapasztalható.

A 7. napon a 6., 7. és a 8. csoportból elölt állatoknál enyhe AST növekedést találtunk. A 8. csoportba tartozó egerek alkalikus foszfatáz aktivitása szintén megnövekedett, a 6. és 7. csoportba tartozó egerek kreatinin és alkalikus foszfatáz szintje csökkent. A 2., 3. és a 6. csoportba tartozó súlyosan beteg elölt egerek határozott, klinikailag jelentős mértékű, hatóanyag-függő leukopéniát mutattak lecsökkent neutrofil granulocita és limfocita sejtszámmal, mérsékelten lecsökkent vérlemezke szám mellett. Az 1., 4., 6. és a 7. csoportba tartozó, a 64. napon vizsgált egereknél enyhe alkalikus foszfatáz és AST emelkedést tapasztaltunk, míg a többi értékük egyébként normális volt.

A szerv-patológiai vizsgálatok a lép és a csontvelő vérképző és limfoid funkcióinak leépülését, valamint valamennyi kezelt csoportban a bélbolyhok és/vagy a kripták atrófiáját mutatta ki. A liposzómás mitoxantron kevésbé látszik toxikusnak a lépre nézve, és sokkal kevésbé citotoxikus a bél hámsejtjeire nézve, mint a hagyományos mitoxantron. Számos, a hagyományos mitoxantron 5 mg/kg vagy 7,5 mg/kg adagjával kezelt egérben a májsejtek bizonyos mértékű vakuoláris

degenerálódása figyelhető meg. Ezzel ellentétben mindössze egy egérnél figyeltük meg a májsejtek minimális vakuoláris degenerációját, amely 5 mg/kg liposzómás mitoxantront kapott, és egyetlen egynél sem észleltünk degenerációt azok között, amelyek 7,5 mg/kg liposzómás mitoxantront kaptak. Mind a hagyományos, mind a liposzómás mitoxantron adagolása olyan mértékben legyengítette az oszteoblasztokat és az oszteoklasztokat, ami elegendő volt ahhoz, hogy számos egérben hátrányosan befolyásolja a hosszanti irányú csontnövekedést.

A 64. napra valamennyi, a hagyományos mitoxantron és a liposzómás mitoxantron 2,5 mg/kg adagjával kezelt túlélő állat összes tünetének jelentős mértékű javulása volt megfigyelhető. A liposzómás mitoxantron 7,5 mg/kg adagjával kezelt egerekben a 64. napon még megfigyelhető volt egy minimális szövettani hatás a vérképző és a limfoid szövetekben.

A liposzómás mitoxantron valamivel kevésbé bizonyult citotoxikusnak a lépben, és sokkal kevésbé bizonyult citotoxikusnak a bél hámrétegében, mint a hagyományos mitoxantron, annak ellenére, hogy a szöveti eloszlás-vizsgálat erősen megnövekedett mitoxantron koncentrációkat mutatott ki. Számos, a hagyományos mitoxantron 5 mg/kg vagy 7,5 mg/kg adagjával kezelt egér májsejtjeiben bizonyos mértékű vakuoláris degeneráció volt megfigyelhető. A liposzómás mitoxantron 5 mg/kg adagjával kezelt egerek közül csak egynél, a 7,5 mg/kg adaggal kezelt egerek közül egynél sem észleltük a májsejtek vakuoláris degenerációját.

Összefoglalva, nem tapasztaltunk morbiditást vagy mortalitást a liposzómás mitoxantronnal kezelt egerek egyik csoportjában sem, illetve a hagyományos mitoxantron 2,5 mg/kg adagjával kezelt egerek csoportjában sem. Ezzel szemben a 2. csoportba (5 mg/kg hagyományos mitoxantron) és a 3. csoportba (7,5 mg/kg hagyományos mitoxantron) tartozó valamennyi egér elpusztult.

12. példa

Az itt következő példában bemutatjuk, hogy a 7. példa szerinti liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény toxicitása kisebb, mint az azonos adagú hagyományos mitoxantron-hidroklorid gyógyszerkészítményé, valamint azt, hogy a mitoxantron liposzómás gyógyszerkészítmény legalább 35 mg/kg adagban történő adagolása az egereknél nem toxikus.

30 darab hím, CD2F1, 20-22 g testtömegű egeret 1 hétig szoktattunk a körülményekhez, és véletlenszerűen ötösével 6 csoportba osztottuk őket. Minden ketrecbe 5 állatot helyeztünk. A vizsgálat kezdeti napján (0. nap) minden állat farki vénájába i.v. beadtuk a hatóanyagot vagy a vivőanyagot mint kontroll készítményt, majd ezt követően 5 napon át minden nap egyszer megismételtük az adagolást. A beadott térfogat az állatok egyéni testtömegétől függött. Az állatok testtömegét az injekciót követő minden második napon megmértük minden egyes egérnél, és betegségre utaló klinikai tüneteiket legalább naponta regisztráltuk. A 6 csoport az 5. táblázatban megadottak szerinti injekciókat kapta.

5. táblázat

csoport	gyógyszerkészítmény	adag
1.	hagyományos mitoxantron	2,5 mg/kg
2.	hagyományos mitoxantron	5,0 mg/kg
3.	liposzómás mitoxantron	5,0 mg/kg
4.	liposzómás mitoxantron	7,5 mg/kg
5.	liposzómás mitoxantron	10 mg/kg
8.	élettani sóoldat	

Az első 5 napon egyik állat sem mutatott mellékhatásokat. Az 1., 2., 3. és az 5. csoportba tartozó állatok összegörnyedtek, és a szőrük csapzott lett. A 8. napon a 2. és az 5. csoportból 3 súlyosan beteg állatot leöltünk, és az 5. csoportból egy állat elpusztult. A 8. napon a 6. csoportból 3 állatot hematológiai és laborvizsgálatok céljára leöltünk. A 10. napon a 2. csoport egy súlyosan beteg állatát leöltük, és egy állat elpusztult. A 10. napon az 5. csoportból egy súlyosan beteg állatot leöltünk. A 12. napra az 1. csoportból 3 állat elpusztult. A 18. napon a 4. csoportból egy állat elpusztult. A többi megmaradt állaton 60 napon át nem észleltük a toxicitás klinikai jeleit. A 60. napon valamennyi állatot leöltük. Vérmintákat gyűjtöttünk a 8. példában ismertetett hematológiai és labor vizsgálatok céljára. Az állatok főbb szerveit 10 %-os pufferelt formalinban fixáltuk.

A különböző csoportokba tartozó állatok testtömegének változása mérsékelt, csekély vagy elhanyagolható volt, kivéve a 2. (5 mg/kg hagyományos mitoxantron) és az 5. (10 mg/kg

liposzómás mitoxantron) csoportokat. Az ezekbe a csoportokba tartozó állatok fokozódó testtömeg-veszteséget mutattak, ami a 9. napra elérte a körülbelül 35%-ot, illetve a körülbelül 25%-ot. A 13. napra az 1. (2,5 mg hagyományos mitoxantron), a 3. (5 mg/kg liposzómás mitoxantron), illetve a 4. (7,5 mg/kg liposzómás mitoxantron) csoportba tartozó állatok kezdetben elvesztették testtömegük körülbelül 30 %-át, 7 %-át, illetve 30 %-át, de a vizsgálat végére fokozatosan visszanyerték eredeti testtömegüket. A többi vizsgálati csoportban testtömeg-változás a vizsgálat alatt nem volt tapasztalható.

A vivőanyaggal mint kontroll készítménnyel vagy a liposzómás mitoxantron 5 mg/kg-ig terjedő adagjával (naponta 1 alkalommal 5 napon át) kezelt egereknél morbiditást vagy mortalitást nem tapasztaltunk. A hagyományos mitoxantron 2,5 mg/kg adagjával kezelt egerek morbiditása 60 % volt. A liposzómás mitoxantron 7,5 mg/kg adagjával kezelt egerek morbiditása 20 % volt. A 10 mg/kg liposzómás vagy az 5 mg/kg hagyományos mitoxantron a vizsgált egerek 100 %-ánál bizonyult halálosnak.

A 2. (5 mg/kg hagyományos mitoxantron) és az 5. (10 mg/kg liposzómás mitoxantron) csoportból elölt állatoknál erőteljes AST és ALT növekedést találtunk. Ezen felül a 2. csoportba tartozó 4 egér közül háromnál és az 5. csoportba tartozó 4 egér közül egynél a bilirubin koncentráció magasabb volt, mint a kontroll egereknél. A súlyosan beteg egereknél jelentős mértékű, csökkent mennyiségű neutrofil granulocitával és limfocitával jellemezhető leukopéniát találtunk. A vérlemezke szám mérsékelt, változó mértékű csökkenését és a

vörösvértestek számának minimális növekedését is megfigyeltük. A többi érték nem változott lényegesen. A 70. napon leölt egerek labor értékeit normálisnak találtuk, de a fehérvérsejt szám alacsony volt. Ezekben az egerekben a limfociták és a neutrofil granulociták száma alacsony, a többi értékük normális volt.

A 8. példa szerinti egy-adagos adagoláskor a 15 mg/kg hagyományos mitoxantron a liposzómás mitoxantronnal ellentétben az ALT értékek jelentős mértékű megnövekedését idézte elő, ami akut májkárosodásra utal. A 10. példában a nagyobb adagoknál nem tapasztaltunk ilyen változást. A többszörös adagolási rend adataiból világosan látszik, hogy a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmények képesek jelentős májkárosodást okozni. A vizsgálat végeztével leölt állatokból származó adatok azt sugallják, hogy jelentős mértékű állapot javulás következik be, és kevés a bizonyíték akár a toxicitásra, akár a citotoxicitásra.

A nagyobb hatóanyag mennyiséggel kezelt csoportokban az egereknél a fehérvérsejteken és a vérlemezkéken citotoxikus hatások mutatkoztak. A neutrofil granulociták és a limfociták száma egyértelműen, a vérlemezkék száma mérsékelten csökkent. A kisebb adagok esetében ez a hatás jóval kevésbé volt kifejezett. Az adatokból látható, hogy az 5 mg/kg napi adagú hagyományos mitoxantron és a 10 mg/kg napi adagú liposzómás mitoxantron nagyjából azonos mértékű akut májkárosodást okozott, amelyet a 8. napra megemelkedett ALT, AST és bilirubin értékek bizonyítanak.

Összefoglalva, a jelen vizsgálat klinikai patológiai adataiból látható, hogy a liposzómás mitoxantron 10 mg/kg/nap adagban nem toxikusabb, mint a hagyományos mitoxantron 5 mg/kg/nap adagban. Ugyanakkor a hatóanyag toxikus és citotoxikus hatásából származó károsodásokból az állatok bizonyítottan meggyógyultak. Az adatokból látható, hogy a liposzómás mitoxantron biztonsággal adható olyan adagokban, amelyek több, mint kétszeresei a hagyományos mitoxantron biztonságosnak tartott adagjainak.

13. példa

Az itt következő példában bemutatjuk, hogy a 7. példa szerinti liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény adagolásával a mitoxantron magasabb plazmaszintjei érhetők el, a felezési idő hosszabb és emlősökben a vér klírensze kisebb, mint a hagyományos mitoxantron gógyszerkészítmény adagolásával. A farmakológiai vizsgálatokat hímnemű CD2F1 egereken végeztük el a farki vénába i.v. beadott egyszeri, 5 mg/kg adagú hagyományos és liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítményekkel. Az állatokat négyes csoportokban a hatóanyag beadása után 5, 15, 30 perccel, 1, 2, 4, 8, 24 és 48 órával elöltük, és a véreket és a szerveket mitoxantron tartalom meghatározásra összegyűjtöttük.

A plazma- és a szerv-mintákat reverz fázisú HPLC eljárással analizáltuk. A plazma-mintákat (0,25 ml) összekevertük 0,5 ml 0,01 mg/ml hexánszulfonsav, 0,5 mg/ml aszkorbinsav és 0,25 µg ametantron tartalmú oldattal mint belső standarddal. 30 másodpercig tartó örvénykeverős

keverés után hozzáadtunk 0,5 ml 0,1 M borát puffert (pH 9,5) és 150 µl 1M nátrium-hidroxidot, és a mintákat 30 másodpercig tovább kevertük örvénykeverővel. A mintákat 10 ml diklórmetánnal kivontuk egy vízszintes rázóedényben 1 órán át tartó rázással, majd 15 percig 3.000 rpm fordulaton centrifugáltuk. A szerves fázist (9 ml) elkülönítettük, és nitrogén alatt bepároltuk. A mintákat a HPLC vizsgálat előtt újra feloldottuk 10 µl mobil fázissal.

A szervmintákat elhomogenizáltuk 1 ml 20 % aszkorbinsavat tartalmazó 0,1 M citrát puffer (pH 3,0) oldatban, és a fent leírt eljárással kivonást végeztünk. A mitoxantront reverz fázisú kromatográfiával különítettük el (Waters µBondapak® C-18), mobil fázisként 33 % acetonitrilt és 67% 0,16 M ammónium-formiát puffert (pH 2,7) alkalmazva 1 ml/perc áramlási sebesség mellett. A mitoxantront 600 nm-nél mértük. Az érzékenységi határ 10 ng/ml volt.

A plazma farmakokinetikai értékeit standard eljárásokkal határoztuk meg. Az eliminációs sebesség konstans (K) értékét a plazma koncentráció-idő görbe lineáris regressziós analíziséből számítottuk ki. A görbe alatti területet ($AUC_{0-\infty}$) lineáris trapezoid módszerrel számítottuk ki a végső fázist a végtelenre extrapolálva ($C_{utolsó}/K$), ahol a $C_{utolsó}$ az utoljára mért koncentráció érték. Kiszámítottuk még a teljes test klírensz (Cl) értékét mint az adag/AUC hányadost, a megoszlási térfogatot ($V_{terület}$= Cl/K) és az elimináció felezési idejét ($t_{1/2}$= 0,693/$K_{terület}$).

Összefoglalva, i.v. adás után a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel sokkal magasabb (50-szeres) plazma

csúcskoncentráció értéket értünk el, mint a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítménnyel. A plazmában a hatóanyag koncentráció elsőrendű kinetika szerint csökkent, a felezési idő 6,6 perc volt a hagyományos és 1 óra a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménynél. A hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmény esetében C_{max}= 0,41 µg/ml, AUC= 0,14 µgh/ml és $t_{1/2}$= 0,11 óra, a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménynél pedig C_{max}= kb. 21 µg/ml, AUC= 28 µgh/ml és $t_{1/2}$= 1 óra. Az emelkedett értékeket magyarázhatjuk a klírensz és a vegyület megoszlási térfogatának együttes csökkenésével. A számított teljes mitoxantron klírensz értéke lényegesen alacsonyabb volt a liposzómás mitoxantron (3 ml/perc/kg), mint a hagyományos mitoxantron (600 ml/perc/kg) gyógyszerkészítménynél. A számított megoszlási térfogat értéke is határozottan alacsonyabb volt a liposzómás (0,3 l/kg), mint a hagyományos (5,5 l/kg) mitoxantron gyógyszerkészítménynél.

A klírensz értékek ehhez hasonlóan alakultak a tüdő- és a vese-szövetben, ahol a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmény adása után a tüdőben körülbelül 20 µg/g, a vesékben körülbelül 40 µg/g, a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény adása után a tüdőben 13 µg/g, a vesékben 16 µg/g értékeket észleltünk. A májban a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmény alkalmazása után a mitoxantron koncentráció fokozatosan csökkent körülbelül 19 µg/g-ról 2 µg/g-ra, míg a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény alkalmazása után 4 órával a mitoxantron koncentrációja 25 µg/g-ról 37 µg/g-ra emelkedett, mielőtt

nagyon lassan, 48 óra alatt lecsökkent volna 30 µg/g-ra. Öt perccel a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény beadása után alacsonyabb csúcskoncentráció értékeket (5,6 µg/g szövet) mértünk a szívben, mint a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmény adagolásakor (11 µg/g szövet). Ez a különbség a gyógyszerkészítmények beadása után 48 óráig legalább kétszeres maradt.

A mitoxantronnal kezelt egerek szív, tüdő és vese mitoxantron koncentrációi valamennyi vizsgálati időpontban magasabbak voltak a hagyományos mitoxantron kezelés esetében, mint a liposzómás mitoxantron kezelés esetében.

A mitoxantronnal kezelt egerek lép és máj mitoxantron koncentrációi valamennyi vizsgálati időpontban magasabbak voltak a liposzómás mitoxantron kezelés esetében, mint a hagyományos mitoxantron kezelés esetében, ami azt mutatja, hogy a liposzóma gyógyszerforma megváltoztatja a mitoxantron eloszlását. A hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmények adagolásakor a szív szövetében a mitoxantron koncentráció 5 és 15 perccel a hatóanyag beadása után körülbelül 10 µg/g, amely koncentráció 24 és 48 óra alatt fokozatosan lecsökkent 5-6 µg/g-ra. A liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény beadása után 5 perccel a szív szövetében a mitoxantron koncentrációja körülbelül 6 µg/g volt, amely 24-48 óra alatt fokozatosan lecsökkent körülbelül 2 µg/g-ra. Ezekből az adatokból arra következtetünk, hogy a liposzómás mitoxantron készítmény toxicitása a szívre kisebb mértékű.

14. példa

Ebben a példában bemutatjuk a 7. példa szerinti liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény emberi leukémia sejtek elleni hatékonyságát, és azt, hogy a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény hatásosabb, mint a hagyományos.

Rágcsáló leukémia sejteket (L1210) tenyésztettünk CD2F1 egerek hashártyáján három egymást követő beoltással (i.p.). Az utolsó beoltástól számított 8 napon belül kifejlődött aszciteszt használtuk a további vizsgálatokhoz. Meghatároztuk a liposzómás és a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmények L1210 aszciteszes leukémia elleni citosztatikus aktivitását. Az állatok testtömegét hetente 3 alkalommal határoztuk meg, és a beteg állatokat emberségesen elöltük. A túlélő egereket 60 napon át napi megfigyelésnek vetettük alá. A liposzómás és a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmények tumor elleni relatív hatékonyságát az egyszeri vagy többszöri adagban i.v. adagolt mitoxantron gyógyszerkészítmények alkalmazása utáni csoport-túlélési idővel fejeztük ki.

A nőstény CD2F1 egereket tízesével 8 csoportba osztottuk, és i.v. beoltottuk azokat 10.000 darab L1210 sejttel. A beoltás után 24 órával beadtuk a hatóanyagot. A hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítményt 5 és 10 mg/kg adagban alkalmaztuk. A liposzómás gyógyszerkészítményt i.v. alkalmaztuk 5, 10, 20 vagy 35 mg/kg egyszeri adagban, majd meghatároztuk a csoportonkénti átlagos túlélési időt. A túlélő állatokat a vizsgálat 60. napján

leöltük. Kontrollként a 35 mg/kg adaggal azonos mennyiségű üres liposzómát és élettani sóoldatot alkalmaztunk.

A kezeletlen állatok átlagos túlélési ideje 7 nap volt. Az 5 mg/kg hagyományos, illetve liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt állatok átlagos túlélési ideje 12, illetve 13 nap volt. A 10 mg/kg hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt állatok átlagos túlélési ideje 20 nap volt úgy, hogy a 60. napot a 10 állatból kettő érte meg. A 10 mg/kg liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt állatok átlagos túlélési ideje 27 nap volt úgy, hogy a 60. napot a 10 állatból 4 érte meg. A 20 mg/kg liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt állatok mindegyike megérte a 60. napot. A legmagasabb vizsgált liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel, a 35 mg/kg adaggal kezelt 10 állatból 9 érte meg a 60. napot, mivel egy állat a 18. napon elpusztult, feltehetően a hatóanyag toxicitása következtében.

Ebből az egyszeri adag beadásával elvégzett vizsgálatból arra következtethetünk, hogy a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény jobb klinikai eredményekkel, nagyobb adagokban alkalmazható, mint a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmény. A leukémia rágcsáló modelljében a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény a hagyományos mitoxantron összehasonlítható adagjához képest megnövelte az állatok átlagos túlélési idejét, és mind azonos, mind nagyobb adagoknál lecsökkentette a hatóanyag okozta mortalitást. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a mitoxantront liposzómás gyógyszerkészítmény

27709

formájában nagyobb adagokban használhatjuk anélkül, hogy ezzel fokoznánk a toxicitás kockázatát. Az egerek jól tűrték a liposzómás mitoxantron kezelést egészen 20 mg/kg (60 mg/m^2) adagig, és nem mutatták jelét jelentős mértékű toxicitásnak 35 mg/kg (105 mg/m^2) adagig.

15. példa

Ebben a példában bemutatjuk a 7. példa szerinti liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény hatékonyságát ismételt adagban való alkalmazáskor.

40 darab nőstény CD2F1 egeret tízesével 4 csoportba osztottunk, és a 14. példában leírtak szerint beoltottuk őket L1210 sejtekkel. Az egereket a beoltástól számított 24 óra elteltével 2,5 mg/kg hagyományos, vagy 2,5 mg/kg vagy 5 mg/kg liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezeltük 24 óránként 4 napon át. A hagyományos, illetve a liposzómás mitoxantron készítmény 2,5 mg/kg adagjával kezelt egerek átlagos túlélési ideje 13, illetve 14 nap volt. Ez az eredmény hasonló volt a 14. példában a hatóanyag ugyanekkora, egyszeri dózisának beadásakor tapasztalt eredményhez. Ennél a koncentráció értéknél és kezelésnél egyik állat sem érte meg a 60. napot. Az 5 mg/kg liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt állatok átlagos túlélési ideje 37 nap volt úgy, hogy a 10-ből 4 állat érte meg a 60. napot. Ezek az adatok a hatóanyag többszöri adagban történő alkalmazásakor a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény lehetséges klinikai előnyeire utalnak a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítményhez képest.

27709

16. példa

Ebben a példában bemutatjuk, hogy a 7. példa szerinti liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény egyszeri adása megnövelte a túlélést humán prosztatarák sejtekkel beoltott egereknél, és ismételt adagolás esetén a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt állatokban a tumor átlagos térfogata a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítménnyel történő kezeléshez képest jobban lecsökkent. Hím, Balb/c, nu/nu, 6-8 hetes egereket beoltottunk 5×10^6 darab, hormonkezelésnek ellenálló humán prosztatarák sejttel (PC-3). A tumor növekedését hetente 2 alkalommal ellenőriztük, amíg a tumor térfogata el nem érte a 60-100 mm^2-t. Ezután az egereket csoportokba osztottuk, és a farokvénájukon át i.v. injekcióval beadott hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmény 0,625; 1,25; 2,5 és 5 mg/kg adagjával kezeltük őket másnaponta egyszer, 4 napon keresztül. A liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény alkalmazott adagjai 2,5; 5; 7,5 és 10 mg/kg voltak. A kontroll állatok vagy üres liposzómát kaptak, vagy élettani sóoldatot. Kiszámítottuk az átlagos túlélési időket, és a túlélő állatokat a 34. napon leöltük.

A hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmény 0,625 és 1,25 mg/kg adagjával kezelt összes állat életben volt a 34. napon (100 %-os túlélés), azonban a 2,5 és az 5 mg/kg adaggal kezelt állatok közül egy sem élte meg a 34. napot. A liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt állatok túlélése a 2,5 mg/kg adaggal kezelt csoportban 100 %, az 5

mg/kg adaggal kezelt csoportban 91 %, a 7,5 mg/kg adaggal kezelt csoportban 43 % és a 10 mg/kg adaggal kezelt állatoknál 0 % volt.

A vizsgálatot megismételtük a hagyományos mitoxantron 0,625 és 1,25 mg/kg-os, illetve a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény 2,5 és 5 mg/kg-os adagjával ugyanezen adagolási rend szerint. Ebben a vizsgálatban a tumor térfogatát hetente 1 vagy 2 alkalommal mértük a tumor három fő tengelyének lemérésével.

A liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény mindkét adagjával történt kezelés jelentősen lecsökkentette a tumor térfogatát a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt és a kontroll csoportokhoz képest. A PC-3 átültetett tumorok növekedésének jelentős gátlását tapasztaltuk. A hagyományos mitoxantron készítmények súlyos toxicitása korlátozza azok nagyobb adagokban történő klinikai alkalmazhatóságát. A liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmények biztonságosabb és hatékonyabb tumor ellenes szernek bizonyultak, mint a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmények.

17.példa

Ebben a példában bemutatjuk, hogy kutyákban a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítményekkel magasabb vérplazma hatóanyag koncentráció és lassúbb kiürülés érhető el, mint a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítményekkel. A hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmény 0,13 vagy 0,26 mg/kg adagjainak, vagy a liposzómás

2708

mitoxantron gyógyszerkészítmény 0,26; 0,58 vagy 0,87 mg/kg adagjainak i.v. történő beadása után plazma-mintákat vettünk a kutyákból (3 állat/nem/csoport). A plazma- minták mitoxantron tartalmát reverz fázisú HPLC-vel határoztuk meg, belső standardként ametantront használva. A hatóanyag egyszeri beadását követően 0, 5 és 30 perc múlva, valamint 1, 2, 4, 8 és 24 óra múlva vett mintákat elemeztük.

Azoknál az állatoknál, amelyek a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítményt kapták, a kis adagok esetében a beadás után 5 perccel és a nagy adagok esetében a beadás után 30 perccel nem mérhetők a plazma koncentrációk. Egy 0,258 mg/kg adaggal kezelt hím állat plazmájában a hatóanyag koncentráció az 1 órás mintavételkor mérhető volt. Ezzel szemben a legtöbb, liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt állat plazmájában a mitoxantron koncentráció a kis adagok esetében 2 órán át, a közepes és nagy adagoknál 4 órán át mérhető volt.

A mitoxantron koncentráció értékek sokkal alacsonyabbak voltak a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmény, mint a liposzómás gyógyszerkészítmény adagolásakor, amit a C_{max} és az AUC értékek egyaránt tükröznek (lásd 6. táblázat). Ezen felül a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmény klírensze nagyobb volt, mint a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítményé. A liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény adagjainak növekedésével a C_{max} és az AUC értékek egyaránt nőttek, míg a klírensz, a hatóanyag eloszlás és az elimináció felezési ideje állandó maradt. A nemek között nem találtunk különbséget ezeknél a mutatóknál.

A vizsgálati eredményeket összefoglaltuk a 6. táblázatban, amely a jellemzők átlag értékeit tartalmazza. A táblázatban bemutatott többi jellemző a mitoxantron felezési idő ($t_{1/2}$), a megoszlási térfogat (V) és a klírensz (Cl).

6. táblázat

Mitoxantron készítmény	adag (mg/kg)	C_{max} (µg/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (µgh/ml)	$t_{1/2}$ (h)	Cl (ml/perc/kg)	V (l/kg)
hagyományos-H[a]	0,13	0,027	Nsz[b]	Nsz	Nsz	Nsz
hagyományos-N	0,13	0,016	Nsz	Nsz	Nsz	Nsz
hagyományos-H	0,26	0,084	0,05[c]	0,36	89	2,8
hagyományos-N	0,26	0,06	Nsz	Nsz	Nsz	Nsz
liposzómás-H	0,26	0,43	0,32	Nsz	17	1,2
liposzómás-N	0,26	0,77	0,42	0,25	15	0,9
liposzómás-H	0,58	1,5	0,84	0,3	13	0,6
liposzómás-N	0,58	1,9	1,7	Nsz	6,8	0,6
lioszómás-H	0,87	2,41	1,84	Nsz	9	0,8
liposzómás-N	0,87	2,33	1,77	Nsz	11	1

[a]H – hím, N – nőstény

[b]Nsz – nem számított

[c]a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítményeket csak a beadástól számított 30 percig vizsgáltuk.

Ebből a példából jól látható, hogy kutyáknál a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény adagolása a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítmény ugyanakkora adagjával elért plazma csúcskoncentráció körülbelül 9-szeresét eredményezte.

A liposzómás gyógyszerkészítmény emelkedett AUC értékeket és csökkent mértékű klírenszt biztosított. Mind a C_{max}, mind az AUC értékek lineárisan emelkedtek az adag nagyságának növekedésével. A C_{max} értékek körülbelül 0,5; 1,7 és 2,4 µg/ml voltak a 0,26; 0,58 és 0,87 mg/kg (5, 12 és 17 mg/m^2) nagyságú adagok beadása esetén.

18. példa

Ebben a példában bemutatjuk, hogy a kutyák a mitoxantron hagyományos gyógyszerkészítményben tolerálható adagjainál nagyobb adagjait is eltűrik, ha a gyógyszerkészítmény liposzómás. Hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítményt adtunk be intravénásan beagle kutyáknak (3 állat/nem/csoport) a következő adagokban: 0 mg/kg (élettani sóoldat), 0,129 mg/kg vagy 0,258 mg/kg (2,6 vagy 5 mg/m^2) a vizsgálat 1., 23., 43. és 65. napján. Ugyanezeken a napokon beagle kutyáknak (3 állat/nem/csoport) liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítményt adtunk be a következő adagokban: 0 mg/kg (üres liposzóma); 0,258 mg/kg, 0,580 mg/kg vagy 0,869 mg/kg (5, 12 vagy 17 mg/m^2). A hatóanyaggal összefüggő hatásokat a következő vizsgálatok alapján állapítottuk meg: klinikai megfigyelések, testtömeg mérés, táplálékfogyasztás ellenőrzése, szemészeti és EKG vizsgálatok, klinikai patológiai vizsgálatok, a plazma hatóanyag tartalmának meghatározása és a szervek tömegének lemérése és a szervek makroszkópos és mikroszkópos vizsgálata az állatok elpusztulása után.

Egy hím kutyát a 0,869 mg/kg adagú liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt csoportból a 12. napon fel kellett áldoznunk, (így az állat csak egy adag liposzómás gyógyszerkészítményt kapott) mivel a bal végtagjain hámhiány és duzzanat lépett fel, és az állatnál hipoaktivitást, sápadtságot, kiszáradást és hasmenést tapasztaltunk.

Az üres liposzómákkal kezelt állatok közül egy nősténynél szőrhullás, míg egy másiknál erős nyáladzás lépett fel a vizsgálat első 29 napos időtartama alatt. A 0,869 mg/kg adagú liposzómás mitoxantronnal kezelt állatok közül egy nősténynél bal oldali sántítás lépett fel a 31., 32. és a 36. napokon, míg az 52. napon a bal hátsó lábán gyulladást és duzzanatot észleltünk egy sebbel vagy fekéllyel együtt.

Egy állat testtömege sem változott a vizsgálat időtartama alatt, kivéve a 0,258 mg/kg hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt hímeket, amelyek lefogytak. Az táplálékfogyasztás egyik csoportban sem változott.

Az EKG jellemzők sem változtak a vizsgálat egyik időpontjában sem.

A 0,129 és a 0,258 mg/kg hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt állatoknál minden adagolási periódus után 4-10 nappal leukopéniát és trombocitopéniát állapítottunk meg, amelyek súlyossága dózisfüggő volt. A 3 hetes adagolási periódus második részében a fehérvérsejt szám a normális irányában változott. A kvalitatív vérkép adatokban egy dózisfüggő neutrofil granulocita szám csökkenés mutatkozott, amely minden adagolási periódus 10.

napján volt a legsúlyosabb. Dózisfüggő, minden egyes egymást követő adaggal súlyosbodónak tűnő limfopénia is előfordult minden adagolási periódusban. Anémia nem fordult elő a hagyományos mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt állatoknál, de a lecsökkent retikulocita szám eritroid toxicitásra utalt. A retikulociták száma gyorsan visszatért a normálisra vagy annál kicsivel magasabbra a 10., 32. és 46. napokon.

A liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt állatoknál a hagyományos gyógyszerkészítmény adagolásakor megfigyelthez hasonló hematológiai változásokat tapasztaltunk, azzal a kivétellel, hogy a vizsgálat közben leölt állatnál (a 0,869 mg/kg liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt csoportból) leukopéniát, trombocitopéniát és anémiát találtunk. Kis mértékű anémiát figyeltünk meg a nőstény kutyáknál, lecsökkent retikulocita szám mellett. A retikulocita szám a hím kutyáknál is lecsökkent. A retikulocita szám visszaállása a normálisra a nőstény kutyáknál lassabban történt meg, mint a hímeknél.

A véralvadásban és a labor eredményekben nem találtunk változást egyik adagolási csoportnál sem.

A boncolás során a 0,869 mg/kg liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítménnyel kezelt csoportból egy hím állatnál folyadékkal telt mellüreget, megnagyobbodott szívet és gyomor-bélrendszeri elváltozásokat találtunk. Ezek a jelenségek feltehetően a hatóanyaggal kapcsolatosak. Egy másik, ugyanezen adaggal kezelt állatnál több nyirokcsomó elszíntelenedését figyeltük meg. A liposzómás mitoxantron

2709

gyógyszerkészítmény 0,58 és 0,869 mg/kg adagjával kezelt összes állat közül háromnál az injekció beadási helyének kékre színeződését tapasztaltuk. Nem találtunk más olyan elváltozást, ami a hatóanyag adagolásának lett volna tulajdonítható.

Összefoglalva, a 6 darab üres liposzómával kezelt kutya közül egynél, és a liposzómás mitoxantronnal kezelt 18 állat közül egy másiknál tapasztaltuk lábszárfekély kialakulását, ami sántítással járt együtt, és amit feltehetően az üres liposzómák okoztak. Ebben a vizsgálatban bebizonyítottuk, hogy a kutyák nagyobb adagokat tűrnek el a mitoxantronból, ha azt liposzómás formában alkalmazzuk.

19.példa

Ebben a példában bemutatunk egy eljárást, amellyel rákos betegeknek adagoljuk a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítményt, és egy eljárást a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény biztonságos és hatásos mennyiségének meghatározására. Hisztológiai vizsgálattal bizonyítottan szolid tumoros betegeket választottunk be a vizsgálatba. A vizsgálatban az i.v. adagolt mitoxantron maximálisan tűrhető adagjának nagyságát (MTA), az adag nagyságát korlátozó toxicitását és a vérben a farmakokinetikáját határoztuk meg. Vizsgáltuk a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény tumor elleni hatását is.

A betegeket 3 hetente i.v. liposzómás mitoxantronnal kezeltük, amíg a betegség progresszióját vagy a toxicitás kifejlődését nem észleltük, ami szükségessé tette a kezelés

korai befejezését. Meghatároztuk a kezelés biztonságosságát és tűrhetőségét is. A kezelés első periódusában megvizsgáltuk a farmakokinetikai jellemzőket. A szív állapotát minden második periódusban ellenőriztük. A betegség állapotát minden második kezelési periódus után a megfelelő eljárással meghatároztuk. Hat adagolási szintet vizsgáltunk.

A vizsgálatban a kereskedelmi forgalomban kapható Novantrone® gyógyszerkészítményt használtuk. A mitoxantron liposzómás gyógyszerkészítményt a 7. példában leírt eljárással állítottuk elő. A liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítményt i.v. adtuk 45 percen át. Az adagokat a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat

adagolási szint	liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény adagja (mg/m^2)
1	9
2	12
3	15
4	20
5	25
6	30

Minden adagolási szintet 3 betegnél próbáltuk ki. A hatóanyagot 3 hetente adtuk, hacsak a betegség súlyosbodása vagy tűrhetetlen toxicitás nem jelentkezett. A mellékhatásokat az NCI/CTC előírásoknak megfelelően osztályoztuk. A hatóanyag adagjának nagyságát korlátozó toxicitást (DLT) úgy

határoztuk meg, mint tűrhetetlen toxicitás jelentkezését az első kezelési periódusban (azaz 21 nap alatt), ami lehet 3-as vagy 4-es fokozatú nem hematológiai toxicitás, beleértve a hányingeren, hányáson vagy hajhulláson kívüli túlérzékenységi reakciókat, vagy 4-es fokozatú hematológiai toxicitás, ami nem neutropénia, vagy 4-es fokozatú és több, mint 3 napig fennálló neutropénia, vagy lázzal járó neutropénia, amelyet 3-as vagy 4-es fokozatú, 38,5 °C-nél magasabb lázzal járó neutropéniának minősítünk, vagy 4-es fokozatú hányás, vagy 4-es fokozatú máj transzamináz szint emelkedés (AST vagy ALT), vagy 2-es (vagy nagyobb) fokozatú csökkenés a LVEF-ben MUGA tesztelés után.

Maximálisan tűrhető adagnak (MTA) azt a legnagyobb adagot nevezzük, amely egy adott adagolási szinten a 6 beteg közül legfeljebb egynél okoz az adag nagyságát korlátozó toxicitást (DLT). Ha a kezdeti 3 beteg közül egynél sem tapasztalunk egy adott adagolási szinten az adag nagyságát korlátozó toxicitást, tovább emelhetjük az adagot. Ha a kezdeti 3 beteg közül egynél az adag nagyságát korlátozó toxicitás jelentkezik, akkor az adott adagolási szinten további 3 beteget vonunk be a vizsgálatba. Ha ezen újonnan bevont betegek közül egynél sem tapasztalunk az adag nagyságát korlátozó toxicitást, akkor tovább emelhetjük az adagot. Ha az újonnan bevont betegek közül az adott adagolási szinten egynél vagy többnél jelentkezik az adag nagyságát korlátozó toxicitás, akkor nem emeljük tovább az adagot. Ha a kezdeti három beteg közül kettőnél vagy háromnál jelentkezik az adag nagyságát korlátozó toxicitás, akkor az adag nagyságát nem

emeljük tovább. Hat beteget vizsgálunk egy lehetséges MTA-val ahhoz, hogy megbizonyosodjuk arról, hogy az adott adagolási szint megfelel az MTA kritériumainak.

Egy további kezelési periódust is alkalmazhatunk 21 vagy több nappal a liposzómás mitoxantron gyógyszerkészítmény előző adagja után akkor, ha az abszolút neutrofil granulocita szám (ANC) 1.500/mm^3 vagy több, a vérlemezke szám 100.000/mm^3 és minden egyéb, a kezeléssel kapcsolatos toxikus tünet (kivéve a hajhullást) visszafejlődött az alap fokozatra vagy az 1-esnél kisebb fokozatra (amelyik kevésbé korlátozó).

A kezelést késleltetni kell 1 hétig, hogy a toxikus jelenségek megszűnjenek. Ha a toxikus jelenségek nem szűnnek meg az egy hetes késleltetés után, akkor a kezelést további 1 hétig késlelteni kell, ugyanolyan adagcsökkentéssel, mint amit az 1 hetes késleltetéskor alkalmaznánk. Ha a kezelést 2 hétnél tovább kell késleltetni, akkor a beteget ki kell vonni a vizsgálatból.

2709

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás emlős betegségek gyógyítására, amely eljárásban az emlősnek egy, a mitoxantron hatásos mennyiségét és a kardiolipint liposzómás gyógyszerformában, gyógyszerészetileg elfogadható segédanyagokkal együtt tartalmazó gyógyszerkészítmény adagolása történik.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelyben az emlős ember.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelyben a liposzómás gyógyszerkészítmény foszfolipidet is tartalmaz.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelyben a liposzómás gyógyszerkészítmény tokoferolt is tartalmaz.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelyben a liposzómás gyógyszerkészítmény foszfatidil-kolint, koleszterint és egy tokoferolt is tartalmaz.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelyben a kardiolipin természetes vagy szintetikus kardiolipin lehet.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelyben a liposzómák töltése negatív.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelyben a liposzómák töltése pozitív.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mitoxantron legalább 90 %-a liposzómákhoz kötődik.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelyben a mitoxantron koncentrációja a körülbelül 0,5 mg/ml-től a körülbelül 2 mg/ml-ig terjedő tartományban van.

2709

11. Terápiásan hatékony mitoxantron gyógyszerkészítmény, amely mitoxantront tartalmazó liposzómákat és egy lipid összetevőt tartalmaz, amely lipidben kardiolipin van.

12. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben a mitoxantron és a lipid mólaránya a körülbelül 1:10-től a körülbelül 1:20 tartományban van.

13. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben a liposzómákba zárt mitoxantron körülbelül 5 μm nagyságú vagy ennél kisebb vezikulumokat alkot.

14. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben az említett liposzómákba zárt mitoxantron körülbelül 1 μm nagyságú vagy ennél kisebb vezikulumokat alkot.

15. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben az említett liposzómákba zárt mitoxantron körülbelül 0,5 μm nagyságú vagy ennél kisebb vezikulumokat alkot.

16. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben a liposzómákba zárt mitoxantron körülbelül 0,1 μm nagyságú vagy ennél kisebb vezikulumokat alkot.

17. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben a lipid alkotórész tartalmaz még foszfatidil-kolint, koleszterint, α-tokoferolt, dipalmitoil-foszfatidil-kolint és foszfatidil-szerint is.

18. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben az említett kardiolipin természetes vagy szintetikus kardiolipin lehet.

19. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben a liposzómák töltése negatív.

20. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben a liposzómák töltése pozitív.

21. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben a liposzómák töltése semleges.

22. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben az említett liposzóma többrétegű és egyrétegű vezikulumok keverékéből áll.

23. Egy lipid alkotórészt és mitoxantront tartalmazó, terápiásan hatékony gyógyszerkészítmény, amelyben a mitoxantron és a lipid mólaránya a körülbelül 1:10-től a körülbelül 1:20-ig terjedő tartományban van.

24. A 23. igénypont szerinti terápiásan hatékony mitoxantron gyógyszerkészítmény, amelyben a lipid alkotórész foszfolipidet tartalmaz.

25. A 23. igénypont szerinti terápiásan hatékony mitoxantron gyógyszerkészítmény, amelyben a lipid alkotórész foszfatidil-kolint tartalmaz.

26. A 23. igénypont szerinti terápiásan hatékony mitoxantron gyógyszerkészítmény, amelyben a lipid alkotórész tojásból származó foszfatidil-kolint tartalmaz.

27. A 23. igénypont szerinti terápiásan hatékony mitoxantron gyógyszerkészítmény, amelyben a lipid alkotórész koleszterint tartalmaz.

27709

28. A 23. igénypont szerinti terápiásan hatékony mitoxantron gyógyszerkészítmény, amelyben a lipid alkotórész még egy foszfolipidet, koleszterint, kardiolipint és tokoferolt is tartalmaz.

29. A 23. igénypont szerinti terápiásan hatékony mitoxantron gyógyszerkészítmény, amelyben a mitoxantron koncentrációja a körülbelül 0,5 mg/ml-től a körülbelül 2 mg/ml-ig terjedő tartományban van.

30. Eljárás mitoxantron tartalmú gyógyszerkészítmény előállítására, **azzal jellemezve,** hogy az eljárás az alábbi lépésekből áll: egy olyan palack előállítása, amelyben egy adag előformált, a mitoxantron megkötésére képes vegyületet tartalmazó liposzóma van; egy olyan palack előállítása, amely egy adag mitoxantront tartalmaz gyógyszerészetileg elfogadható segédanyagokkal együtt; a gyógyszerészetileg elfogadható segédanyagban lévő mitoxantron egy részének összekeverése a liposzómákkal, és a keverék nyugalomban hagyása, hogy a mitoxantron a liposzómákhoz kötődjék, és így kialakuljon a mitoxantron gyógyszerkészítmény.

31. A 30. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az előformált liposzómák liofilizált formában vannak.

32. Lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amely mitoxantront és egy vagy több lipidet tartalmaz, amelyben legalább az egyik lipid kardiolipin.

33. A 32. igénypont szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a mitoxantron a kardiolipinnel komplexet alkot.

27709

34. A 32. vagy a 33. igénypontok szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a mitoxantron és a lipid relatív mólaránya legalább 1:50.

35. A 32. vagy a 33. igénypontok szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a mitoxantron és a lipid relatív mólaránya legalább 1:40.

36. A 32. vagy a 33. igénypontok szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a mitoxantron és a lipid relatív mólaránya legalább 1:30.

37. A 32. vagy a 33. igénypontok szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a mitoxantron és a lipid relatív mólaránya legalább 1:20.

38. A 32. vagy a 33. igénypontok szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a mitoxantron és a lipid relatív mólaránya legalább 1:15.

39. A 32. vagy a 33. igénypontok szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a mitoxantron és a lipid relatív mólaránya legalább 1:10.

40. A 32. vagy a 33. igénypontok szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a mitoxantron és a lipid relatív mólaránya legalább 1:5.

41. A 32. vagy a 33. igénypontok szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a mitoxantron és a lipid relatív mólaránya legalább 1:1.

42. A 32. vagy a 33. igénypontok szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a mitoxantron és a lipid relatív mólaránya körülbelül 1:1.

27709

43. A 32-42. igénypontok bármelyike szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amely tartalmaz még foszfatidil-kolint vagy koleszterint is.

44. A 43. igénypont szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a kardiolipin, foszfatidil-kolin és a koleszterin relatív mólaránya a körülbelül 0,1-25 : 1-99 : 0,1--50 tartományban van.

45. A 43. igénypont szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a kardiolipin, foszfatidil-kolin és a koleszterin relatív mólaránya a körülbelül 0,2-10 : 2-50 : 1-25 tartományban van.

46. A 43. igénypont szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a kardiolipin, foszfatidil-kolin és a koleszterin relatív mólaránya a körülbelül 0,5-5 : 4-25 : 2-15 tartományban van.

47. A 43. igénypont szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a kardiolipin, foszfatidil-kolin és a koleszterin relatív mólaránya a körülbelül 0,75-2 : 5-15 : 4-10 tartományban van.

48. A 43. igénypont szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amelyben a kardiolipin, foszfatidil-kolin és a koleszterin relatív mólaránya körülbelül 1:10:6,8.

49. A 32-48. igénypontok bármelyike szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amely tartalmaz még egy antioxidánst is.

50. A 32-49. igénypontok bármelyike szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amely liofilizált.

27709

51. A 32-50. igénypontok bármelyike szerinti lipid gyógyszerkészítmény összetétel, amely liposzómás gyógyszerforma.

A meghatalmazott:
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

dr. Kiss Ildikó
szabadalmi ügyvivő