



(12) PATENT

(19) NO

(11) 332166

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 9/51 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19996433	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.06.26 PCT/US1998/13272
(22)	Inng.dag	1999.12.23	(85)	Videreføringsdag	1999.12.23
(24)	Løpedag	1998.06.26	(30)	Prioritet	1997.06.27, US, 51021 1997.09.09, US, 926155
(41)	Alm.tilgj	2000.02.14			
(45)	Meddelt	2012.07.09			
(73)	Innehaver	Abraxis Bioscience LLC, 11755 Wilshire Boulevard, Suite 2100, US-CA90025 LOS ANGELES, USA Patrick Soon-Shiong, 11755 Chenault Street, US-CA90049 LOS ANGELES, USA Neil P Desai, 847 Alandale Avenue, Los Angeles, CA, USA Shlomo Magdassi, Jerusalem, Israel David C. Sahadevan, Whittier, CA, USA			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Formuleringer av paklitaksel			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 98/14174 A1, LANGER CJ et al. Paclitaxel by 24- or 1-hour infusion in combination with carboplatin in advanced non-small cell lung cancer. Seminars in oncology, 22. Aug 1995, nr 4, suppl 9, side 18-19, LANGER CJ et al. Combination paclitaxel (1-hour) and carboplatin (AUC 7.5) in advanced non-small cell lung cancer: a phase II study by the Fox Chase Cancer Center Network. Seminars in oncology, 23.des 1996, nr 6, suppl 16, side 35-41.			
(57)	Sammendrag				

Ifølge den foreliggende oppfinnelse er det frembrakt preparater og fremgangsmåter til in vivo tilførsel av idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler (slik som anticancervirkestoffet paklitaksel), hvori det farmakologisk aktive middel tilføres i form av suspenderte partikler som er belagt med protein (hvilket fungerer som et stabiliseringsmiddel). Nærmere bestemt underlegges protein og farmakologisk aktivt middel i et biokompatibelt dispergerende medium sterke skjærkrefter, i fravær av eventuelle konvensjonelle surfaktanter, og dessuten i fravær av eventuelt polymert kjernemateriale for partiklene. Prosedyren gir partikler med en diameter på mindre enn ca. 1 µm. Anvendelsen av spesifikke sammensetnings- og fremstillingsbetingelser (eksempelvis tilsats av et polart løsningsmiddel til den organiske fase), og omsorgsfull utvelgelse av den egnede organiske fase og fasefraksjon, muliggjør reproducerbar produksjon av uvanlig små nanopartikler på mindre enn 200 nm diameter, hvilke kan sterilfiltreres. Det partikkel- system som frembringes ifølge oppfinnelsen kan konverteres til et redispergerbart tørt pulver som omfatter nanopartikler av vannuløselig virkestoff som er belagt med et pro- tein, og fritt protein til hvilket molekyler av det farmakologiske middel er bundet. Dette resulterer i et unikt tilførselssystem, hvori en del av det farmakologisk aktive middel er enkelt biotilgjengelig (i form av molekyler som er bundet til proteinet), og en del av midlet foreligger innen partikler uten noen polymer matrise deri.

Foreliggende oppfinnelse vedrører formulering av paklitaksel som omfatter nanopartikler omfattende paklitaksel som har et proteinbelegg. Formuleringen muliggjør at høyere doser av paklitaksel kan avleveres over et kortere tidsrom. Formulering som omfatter nanopartikler omfattende paklitaksel som har et proteinbelegg som muliggjør en administrering av paklitaksel med redusert infusjonsvolum er også en del av foreliggende oppfinnelse.

Det er videre mulig å anvende fremgangsmåter for fremstilling av partikkelformede bærere til intravenøs administrering av farmakologisk aktive midler, såvel som nye preparater fremstilt derved. Spesielt er fremgangsmåter for *in vivo* tilførsel mulig av i det vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler, (eksempelvis anticancer-virkestoffet Taxol®). Videre kan det frembringes dispergerbare kolloidale systemer som inneholder vannuløselige farmakologisk aktive midler. De suspenderte partikler kan dannes av 100% aktivt middel, eller kan innesluttet i et polymert skall som har formulert fra en biokompatibel polymer, og har en diameter på mindre enn ca. 1 µm. Kolloidale systemer ifølge oppfinnelsen fremstilles uten anvendelse av konvensjonell surfaktant eller noen polymer kjernematriks. Det er også mulig å frembringe en fremgangsmåte til fremstilling av ekstremt små partikler som kan sterilfiltreres. Det polymere skallet inneholder partikler av farmakologisk aktivt middel, og valgfritt et biokompatibelt dispergeringsmiddel hvori farmakologisk aktivt middel kan enten oppløses eller suspenderes. Således, frembringes et virkestofftilførselssystem i enten flytende form eller i form av et redispergerbart pulver. Begge former frembringer både umiddelbart biotilgjengelige virkestoffmolekyler (dvs. virkestoffmolekyler som er molekylært bundet til et protein), og rene virkestoffpartikler som er belagt med et protein.

En fremgangsmåte til anvendelse og fremstilling av preparater (formuleringer) av virkestoffer slik som anti-cancermidlet paklitaksel er også mulig å anvende. Formuleringen av paklitaksel, kjent som Capxol, er signifikant mindre giftig og mer effektiv enn Taxol®, en kommersielt tilgjengelig formulering av paklitaksel. I et annet aspekt, lokaliseres den nye formulering Capxol, i bestemte vev etter parenteral administrering, noe som øker effektiviteten for behandling av kreft som henger sammen med slike vev.

35 BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Intravenøs virkestofftilførsel tillater hurtig og direkte innstilling av likevekt med blodstrømmen som bringer medisineren til resten av kroppen. For å unngå de topper

av serumnivåer som oppnås innen kort tid etter intravaskulær injeksjon, ville administrering av virkestoffer som bæres innen stabile bærere tillate gradvis frigjøring av virkestoffene inne i det intravaskulære kompartment etter en intravenøs bolusinjeksjon av de terapeutiske nanopartikler.

5

Injiserbare nanopartikler med styrt frigjøring kan for virkningen frembringe en forprogrammert varighet, som spenner fra dager til uker til måneder fra en enkeltstående injeksjon. De kan også tilby flere betydelige fordeler sammenlignet med konvensjonelt administrerte medikamenter, inklusiv automatisk sikring av pasientens oppfølging av doseregimet, såvel som målretting av virkestoff til spesifikke vev eller organer (Tica og Gilley, *Journal of Controlled Release* 2:343-352 (1985)).

Mikropartikler og fremmedlegemer som er tilstede i blodet klareres generelt bort fra sirkulasjonen ved hjelp av de "blodfiltrerende organer", nemlig milten, lungene og leveren. Det partikkelformede stoff som rommes i normalt fullblod omfatter røde blodceller (typisk 8 μm i diameter), hvite blodceller (typisk 6-8 μm i diameter), og blodplater (typisk 1-3 μm i diameter). Mikrosirkuleringen av de fleste organer og vev tillater fri passasje for disse blodceller. Når mikrotromber (blodpropper) av størrelse over 10-15 μm foreligger i sirkulasjon, medfører dette en risiko for infarkt eller blokkering av kapillærene, noe som fører til ischemi eller oksygenmangel og mulig vevsdød. Derfor må injeksjonen av partikler på over 10-15 μm i diameter inn i sirkulasjonen unngås. En suspensjon av partikler som er mindre enn 7-8 μm er imidlertid forholdsvis trygg og har vært benyttet for tilførsel av farmakologisk aktive midler i form av liposomer og emulsjoner, næringsmidler, og kontrastmedier for anvendelser innen "imaging".

Størrelsen på partikler og deres tilførselsmodus bestemmer deres biologiske adferd. Strand et al. (i *Microspheres-Biomedical Applications*, ed. A. Rembaum, s. 193-227, CRC Press (1988)) har beskrevet skjebnen for partikler som å være avhengig av deres størrelse. Partikler i størrelsesområdet noen få nm til 100 nm ankommer de lymfatiske kapillærer etter interstitiell injeksjon, og fagocytose kan opptre innen lymfeknutene. Etter intravenøs/intra-arteriell injeksjon, vil partikler på mindre enn ca. 2 μm hurtig klareres fra blodstrømmen ved hjelp av det retikuloendoteliale system (RES), også kjent som det mononukleære fagocyttsystem (MPS). Partikler som er større enn ca. 7 μm vil, etter intravenøs injeksjon, fanges inn i lungekapillærene. Etter intra-arteriell injeksjon, fanges partikler inn i det første kapillære leiet som nås. Inhalledte partikler innfanges av de alveolære makrofager.

Farmasøytiske produkter som er vannuløselige eller svakt vannløselige og følsomme overfor surt miljø i magen kan ikke administreres konvensjonelt (eksempelvis ved intravenøs injeksjon eller oral administrering). Den parenterale administrering av slike farmasøytiske produkter har vært oppnådd ved emulgering av det oljeløselige virkestoff med en vandig væske (slik som normalt saltvann) i nærvær av overflatemidler eller emulsjonsstabilisatorer til frembringelse av stabile mikroemulsjoner. Disse emulsjoner kan injiseres intravenøst, forutsatt at emulsjonens komponenter er farmakologisk inerte. U.S. patent nr. 4,073,943 beskriver administreringen av vannuløselige farmakologisk aktive midler som er oppløst i oljer og emulgert med vann i nærvær av slike overflatemidler som eggfosfatider, pluronics (kopolymerer av polypropylenglykol og polyetylglykol), polyglyserol-oleat, etc. Internasjonal PCT-publikasjon WO85/00011 beskriver farmasøytiske mikrodråper av et anestetikum som er belagt med et fosfolipid slik som dimyristylfosfatidylcholin med egnede dimensjoner for intradermal eller intravenøs injeksjon.

Et eksempel på vannuløselig virkestoff er Taxol® , et naturlig produkt som først ble isolert fra Stillehavsområdets barlindtre, *Taxus brevifolia*, av Wani et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 93:2325 (1971)). Blant de antimitotiske midlene, fremviser Taxol, som inneholder et diterpenformet karbonskjelett, en unik virkningsmodus overfor mikrotubul-proteiner, som er ansvarlige for dannelsen av den mitotiske spindel. I motsetning til andre antimitotiske midler, slik som vinblastin eller kolchicin, som forhindrer oppsamling av tubulin, er Taxol det eneste kjente planteprodukt som inhiberer prosessen med depolymerisering av tubulin, noe som forhindrer cellereplikasjonsprosessen.

Taxol, et naturlig forekommende diterpenoid, har vært vist å ha signifikante antineoplastiske og anticancer-effekter, på virkestoff-refraktorisk ovarialcancer. Taxol har fremstilt utmerket antitumoraktivitet i et bredt utvalg av tumormodeller slik som B16 melanom, L1210 leukemier, MX-1 mammalske tumorer, og CS-1 kolontumor-xenografter. Flere nylige pressemeldinger har betegnet Taxol som det nye vidunder-virkestoff overfor kreft. Faktisk, har Taxol nylig blitt godkjent av Federal Drug Administration for behandling av ovarialcancer. Den svake vandige løselighet av Taxol presenterer imidlertid et problem for human administrering. Faktisk kan tilførselen av virkestoffer som er iboende uløselige eller svakt løselige i et vandig medium i alvorlig grad svekkes dersom oral tilførsel ikke er effektiv. Dermed krever for tiden benyttede taxolformuleringer krever en emulgator (emulgator) for å solubilisere virkestoffet. Det humane kliniske doseområdet er 200-500 mg. Denne dose oppløses i en 1:1 løsning av

etanol:emulgator og fortynnes med saltvann til ca. 300 til 1000 ml fluid som gis intravenøst. Den emulgator som for tiden benyttes er polyetoksyliert lakserolje. Tilstedeværelsen av emulgator i denne formuleringen har vært knyttet til alvorlige hypersensitivitetsreaksjoner i dyr (Lorenz et al., *Agents Actions* 7:63-67 (1987)) og menneske (Weiss et al., *J. Clin. Oncol.* 8:1263-68 (1990)) og krever dermed premedisiering av pasienter med kortikosteroider (deksametason) og antihistaminer. Den store fortynning resulterer i store volumer for infusjon (typisk dose 175 mg/m², eller opp til 1 liter) og infusjonstider som spenner fra 3 timer til 24 timer. Således foreligger det et behov for en alternativ mindre giftig formulering for paklitaksel.

10

I kliniske prøver av fase I, fremviste Taxol® i seg selv ikke spesielt store giftige effekter, men alvorlige allergiske reaksjoner ble forårsaket av de emulgatorer som ble benyttet for å solubilisere virkestoffet. For tiden, involverer regimet for administrering behandling av pasienten med antihistaminer og steroider forut for injisering av virkestoffet for å redusere de allergiske bivirkninger av emulgatoren (cremaphor).

15

I et forsøk på å forbedre vannløseligheten av Taxol, har flere forskere modifisert dets kjemiske struktur med funksjonelle grupper som tildeler forbedret vannløselighet. Blant disse er de sulfonerte derivater (Kingston et al., U.S. patent 5,059,699 (1991)), og aminosyreestere (Mathew et al., *J. Med. Chem.* 35:145-151 (1992)) som fremviser signifikant biologisk aktivitet. Modifikasjoner for å frembringe et vannløselig derivat letter den intravenøse tilførsel av Taxol som er oppløst i en injeksjonsbærer slik som normalt saltvann. Slike modifikasjoner øker imidlertid kostnaden ved virkestoffpreparering, kan indusere uønskede bivirkninger og/eller allergiske reaksjoner, og/eller kan minske virkestoffets effektivitet.

25

Proteinmikrokuler har i litteraturen vært rapportert som bærere av farmakologiske eller diagnostiske midler. Mikrokuler av albumin har vært fremstilt enten ved varmedenaturering eller kjemisk tverrbinding. Varmedenaturerte mikrokuler fremstilles fra en emulgert blanding (f.eksempelvis albumin, det middel som skal inkorporeres, og en egnet olje) ved temperaturer mellom 100°C og 150°C. Mikrokulene blir deretter vasket med et egnet løsningsmiddel og lagret. Leucuta et al. (*International Journal of Pharmaceutics*, 41:213-217 (1988)) beskriver fremgangsmåten for fremstilling av varmedenaturerte mikrokuler.

35

Prosedyren for å fremstille kjemisk tverrbundne mikrokuler involverer behandling av emulsjonen med glutaraldehyd for å tverrbinde proteinet, fulgt av vasking og lagring.

Lee et al. (*Science*, 213:233-235 (1981)) og U.S. patent nr. 4,671,954 anviser denne fremgangsmåte til fremstilling.

De ovenstående teknikker for fremstilling av proteinmikrokuler som bærere av
 5 farmakologiske virksomme midler er, selv om de er egnet for tilførsel av vannløselige midler, ute av stand til å fange inn vannuløselige sådanne. Denne begrensning er iboende i de teknikker for fremstilling som hviler på tverrbinding eller varmedenaturering av proteinkomponenten i den vandige fase av en vann-i-oljeemulsjon. Et hvert vannløselig middel som er oppløst i den proteinholdige vandige
 10 fase kan fanges inn i den resulterende tverrbundne eller varmedenaturerte proteinmatriks, men en i liten grad vannløselig eller et oljeløselig middel kan ikke inkorporeres i en proteinmatriks som dannes ved disse teknikker.

En konvensjonell fremgangsmåte for å fremstille virkestoffholdige nanopartikler
 15 omfatter oppløsning av polymelkesyre (eller andre biokompatible, vannuløselige polymerer) i et vannuløselig løsningsmiddel (slik som metylenklorid eller annet klorert, alifatisk eller aromatisk løsningsmiddel), oppløsning av det farmasøytisk aktive middel i polymerløsningen, tilsats av en surfaktant til oljefasen eller den vandige fase, dannelse av en emulsjon olje-i-vann ved egnet tiltak, og inndamping av emulsjonen langsomt
 20 under vakuum. Dersom oljedråpene er tilstrekkelig små og stabile under inndamping, oppnås det en suspensjon av polymeren i vann. Siden virkestoffet innledningsvis foreligger i polymerløsningen, er det ved denne fremgangsmåte mulig å oppnå et preparat hvori virkestoffmolekylene innfanges i partikler som består av en polymermatriks. Dannelsen av mikrokuler og nanopartikler ved anvendelse av
 25 fremgangsmåten med løsningsmiddelinnndamping har vært rapportert av flere forskere (se eksempelvis Tice og Gilley, i *Journal of Controlled Release*, 2:343-352 (1985); Bodmeier og McGinity, i *Int. J. Pharmaceutics*, 43:179 (1988); Cavalier et al., i *J. Pharm. Pharmacol.*, 38:249 (1985); og D'Souza et al., WO94/10980) under anvendelse av ulike virkestoffer.

30 Bazile et al., i *Biomaterials*, 13:1093 (1992), og Spenlehauer et al., i fransk patent 2 660 556, har rapportert dannelse av nanopartikler ved anvendelse av to biokompatible polymerer, en (f.eksempelvis polylaktid) oppløses i den organiske fase, sammen med en aktiv komponent slik som et virkestoff, og den annen polymer, slik som albumin,
 35 benyttes som det overflateaktive middel. Etter emulgering og fjerning av løsningsmidlet, dannes det nanopartikler, hvori virkestoffet foreligger inne i polylaktidpartiklenes polymere matriks.

Egenskapene til den polymerløsning fra hvilken den polymere matriks dannes er meget viktig for å oppnå egnet emulgering i det første trinn. Eksempelvis har polylaktid (den polymer som vanligvis anvendes ved fremstilling av injiserbare nanopartikler), en
 5 overflateaktivitet som forårsaker hurtig adsorpsjon derav i grenseflaten diklormetan/vann, noe som forårsaker redusert grenseflatespenning (se eksempelvis Boury et al., i *Langmuir*, 11:1636 (1995)), noe som i sin tur forbedrer emulgeringsprosessen. Dessuten har de samme forskere funnet at storfe serumalbumin (BSA) samvirker med polylaktidet, og trenger inn i det polylaktid-monolag som
 10 foreligger i grenseflaten olje/vann. Derfor er det, basert på den ovenstående referanse, forventet at emulgering i løpet av den konvensjonelle fremgangsmåte med løsningsmiddelfordampning i stor grad favoriseres av tilstedeværelsen av den overflateaktive polymer (polylaktid) i den ikke-vandige organiske fase. Faktisk er tilstedeværelsen av polylaktid ikke bare en tilstrekkelig betingelse, men den er faktisk
 15 nødvendig for dannelsen av nanopartikler av egnet størrelse.

En annen prosess som er basert på fremgangsmåten med inndamping av løsningsmiddel omfatter oppløsning av virkestoffet i et hydrofobt løsningsmiddel (eksempelvis toluen eller cykloheksan), uten noen polymer oppløst i det organiske løsningsmiddel, tilsats av
 20 en konvensjonell surfaktant til blandingen som en emulgator, dannelse av en emulsjon olje-i-vann ved anvendelse av sonikering på høytskjærende utstyr, og deretter inndamping av løsningsmidlet for å oppnå tørre partikler av virkestoffet (se eksempelvis, Sjøstrøm et al., i *J. Dispersion Science and Technology*, 15:89-117 (1994)). Ved fjerning av det ikke polare løsningsmiddel, opptrer det utfelling av
 25 virkestoffet inne i løsningsmiddeldråpene, og det oppnås submikron-partikler.

Det er funnet at størrelsen på partiklene hovedsakelig styres av den innledningsvise størrelse av emulsjonsdråpene. Dessuten er det interessant å bemerke at den endelige partikkelstørrelse rapporteres å skulle minske med en minskning i
 30 virkestoffkonsentrasjonen i den organiske fase. Dette funn er i motsetning til de resultater som rapporteres heri, hvori ingen konvensjonell surfaktant benyttes for fremstillingen av nanopartikler (i samme utførelsesformer av oppfinnelsen). Dessuten er det av forfatterne til Sjøstrøm-dokumentet bemerket at det virkestoff som ble benyttet, kolesterylacetat, er overflateaktivt i toluen, og dermed kan være orientert ved
 35 grenseflaten olje/vann; derfor er konsentrasjonen av virkestoffet høyere ved grenseflaten, noe som øker potensialet for utfelling.

Dannelsen av submikronpartikler har også vært oppnådd ved hjelp av en utfellingsprosess, som beskrevet av Calvo et al., i *J. Pharm. Sci.*, 85:530 (1996).

Proessen er basert på oppløsning av virkestoffet (eksempelvis indometacin) og polymeren (poly-kaprolakton) i metylenklorid og aceton, og deretter tømme løsningen

- 5 over i en vandig fase som inneholder en surfaktant (Poloxamer 188), for å gi partikler av submikronstørrelse (216 nm). Imidlertid, utføres fremgangsmåten ved løsningsmiddelkonsentrasjoner ved hvilken det ikke dannes noen emulsjon.

Taxol er en naturlig forekommende forbindelse som har vist seg løfterik som et anti-
 10 cancervirkestoff. Eksempelvis har Taxol vært funnet å være et aktivt middel overfor virkestoff-refraktorisk ovarialcancer av McGuire et al., se "Taxol: A Unique Anti-Neoplastic Agent With Significant Activity Against Advanced Ovarian Epithelial Neoplasms." *Ann. Int. Med.*, 111:273-279 (1989).

- 15 Uheldigvis har Taxol ekstremt lav løselighet i vann, noe som gjør det vanskelig å frembringe en egnet doseringsform. I fase I kliniske utprøvinger, ble alvorlige allergiske reaksjoner forårsaket av emulgatorer som ble administrert i samband med Taxol for å kompensere for taxols lave vannløselighet; idet minste en pasients død ble forårsaket av en allergisk reaksjon som ble induert av emulgatorene. Dosebegrensende giftighet
 20 inkluderer neutropenia, perifer neuropati, og hypersensitivitetsreaksjoner.

Brown et al., i "A Phase I Trial of Taxol Given by A 6-Hour Intravenous Infusion", *J. Clin. Oncol.*, 9(7):1261-67 (juli, 1991), rapporterer angående en fase I utprøving hvori taksol ble tilveiebragt som en 6 timers IV infusjon hver 21. dag uten premedisinering.

- 25 31 pasienter mottok 64 målbare forløp med taksol. En pasient hadde en alvorlig (eller akutt) hypersensitivitetsreaksjon, som krevde diskontinuering av infusjonen og umiddelbar behandling for å redde pasientens liv. En annen pasient opplevde en hypersensitivitetsreaksjon, men det var ikke så alvorlig at det var nødvendig å avslutte infusjonen. Myelosuppresjon var dosebegrensende, med to dødelige utganger på grunn
 30 av sepsis. Ikke-hematologisk giftighet var av grad 1 og 2, bortsett fra for en pasient med grad 3 mucositis og to pasienter med grad 3 neuropati. Neuropatien besto av reversible smertefulle parestesier, noe som krevde diskontinuering av taksol hos to pasienter. Fire partielle responser ble sett (3 i pasienter med lungekreft av typen "non-small-cell", og i en pasient med adenokarsinom av ukjent opphav). Den maksimalt tolererte dose som ble
 35 rapportert var 275 mg/m², og den anbefalte fase II startdose var 225 mg/m².

Forekomsten av hypersensitivitetsreaksjon var rapportert å være planavhengig, idet 6 til 24 timers infusjoner av virkestoff hadde 0% til 8% forekomst av

hypersensitivitetsreaksjoner. Det ble også rapportert at hypersensitivitetsreaksjoner er vedholdende med eller uten premedisinering trass i forlengelse av infusjonstider. Siden disse fase I studier ble utført på terminalt syke pasienter som led av et utvalg cancere, kunne effektiviteten av taksolbehandlingene ikke bestemmes.

5

I en studie av Kris et al., ble Taxol som var formulert med Cremaphor EL i dehydrert alkohol gitt som en 3 timers IV infusjon hver 21. dag, idet den administrerte dose varierte fra 15 til 230 mg/m² i ni forhøyningstrinn. Kris et al. konkluderte at "med alvorlighetsgraden og uforutsigbarheten av hypersensitivitetsreaksjonene, er fortsatt
10 anvendelse av taksol med denne virkestoffformulering med denne administreringsplanen ikke indikert. Se *Cancer Treat, Rep.*, bind 70, nr. 5, mai 1986.

Siden tidlige utprøvinger ved anvendelse av en bolusinjeksjon eller korte (1-3 timers) infusjoner induserte anafylaktiske reaksjoner eller andre hypersensitivitetsresponser, ble
15 det utført ytterligere studier hvori taksol ble administrert bare etter premedisinering med steroider (slik som deksametason), antihistaminer (slik som defenhydramin), og H₂-antagonister (slik som cimetidin eller ranitidin), og infusjonstiden ble forlenget til 24 timer i et forsøk på å eliminere de alvorligste reaksjoner. Forskjellige fase I og fase II studieresultater har vært publisert etter anvendelse av 24 timers infusjoner av taksol med
20 maksimale totale doseringer på 250 mg/m², generelt med forløpet gjentatt hver 3. uke. Pasienter ble forbehandlet med deksametason, difenhydramin, og cimetidin for å forskyve allergiske reaksjoner. Se Einzig, et al., "Phase II Trial of Taxol in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma", *Cancer Investigation*, 9(2) 133-136 (1991), og A.B. Miller et al., "Reporting Results of Cancer Treatment", *Cancer*, 47:207-214 (19819).

25

Koeller et al., i "A Phase I Pharmacokinetic Study of Taxol Given By a Prolonged INfusion Without Premedication", *Proceedings of ASCO*, bind 8 (mars 1989), anbefaler rutinemessig premedisinering for å unngå det signifikante antall allergiske reaksjoner som antas å forårsakes av den emulgatorbærer (polyetoksylert lakserolje) som benyttes
30 for taxolinfusjoner. Pasienter mottok doseringer som varierte fra 175 mg/m² til 275 mg/m².

Wiernik et al., i "Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of Taxol", *Cancer Research*, 47:2486-93 (1. mai 1987), rapporterte også administrering av Taxol i en
35 emulgatorbærer ved IV infusjon i løpet av en 6 timers periode i en fase I studie. Hypersensitivitetsreaksjoner av grad 3-4 opptrådte i 4 av 13 forløp. Startdosen for studien var 15 mg/m² (en tredjedel av den laveste giftige dose hos hunder). Dosene ble

eskalert, og et minimum på 3 pasienter ble behandlet ved hvert dosenivå inntil giftighet ble identifisert, og deretter ble 4 til 6 pasienter behandlet ved hvert påfølgende nivå. Studien konkluderte at neurotoksisitet og leukopeni var dosebegrensende, og den anbefalte dose for fase II utprøving var 250 mg/m² med premedisinering.

5

Andre eksempelvis studier på Taxol inkluderer:

Legha et al., "Phase II Trial of Taxol in Metastatic Melanoma", 65:2478-81 (juni 1990);

Rowinsky et al., "Phase I and Pharmacodynamic Study of Taxol in Refractory Acute Leukemias", *Cancer Research*, 49:4640-47 (15. august 1989);

10 Grem et al., "Phase I Study of Taxol Administered as a Short IV Infusion Daily For 5 Days", *Cancer Treatment Reports*, bind 71, nr. 12 (desember 1987);

Donehower et al., "Phase I Trial of Taxol in Patients With Advanced Cancer", *Cancer Treatment Reports*, bind 71, nr. 12, (desember 1987);

15 Holmes et al., "Phase II Study of Taxol in Patients (PT) with Metastatic Breast Cancer (MBC)", *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 10:60 (mars 1991).

Se også Suffnes, "Development of Antitumor Natural Products at the National Cancer Institute", *Gann Monograph or Cancer Research*, 31:21-44 (1989) (som anbefaler at Taxol utelukkende gis som en 24 timers infusjon.

20 Weiss et al., i "Hypersensitivity Reactions from Taxol", *Journal of Clinical Oncology*, 8(7):1263-68 (juli 1990) rapporterte at det var vanskelig å bestemme en pålitelig samlet forekomst av hypersensitivitetsreaksjoner (HSRer) på grunn av de brede variasjonene i Taxol doser og planer som ble benyttet, og den ukjente grad av innflytelse som endring av infusjonsplanen og anvendelse av premedisinering har på HSR-forekomster.

25 Eksempelvis av fem pasienter som mottok taksol i en i 3 timers infusjon på over 190 mg/m² uten premedisinering, hadde tre reaksjoner, mens bare en av 30 pasienter, som ble administrert med enda høyere doser i løpet av en 6 timers infusjon uten premedisinering, fikk en reaksjon. Derfor antyder dette at forlengelse av infusjonen utover 6 timer er tilstrekkelig til å redusere HSR-forekomster. Ikke desto mindre fant

30 Weiss et al. at pasienter som mottok 250 mg/m² av taksol som ble administrert via en 24 timers infusjon fremdeles hadde definitive HSR'er. Altså, selv om det å forlenge virkestoffinfusjonen til 6 eller 24 timer kan redusere risikoen for en akutt reaksjon, kan denne konklusjonen ikke bekreftes, siden 78% av HSR-reaksjonen opptrådte innen 10 minutter fra igangsettingen av taksolinfusjonen, noe som indikerer at lengden av det
35 tidsrom som var planlagt for den totale infusjonen ikke ville ha noen betydning. Videre er det mulig at konsentrasjonen av Taxol i infusjonen heller ikke er av betydning siden vesentlige antall pasienter fikk reaksjoner overfor ulike små taksoldoser. Endelig, er

ikke bare mekanismen for taksol HSR ukjent, det er også ikke klart hvorvidt Taxol i seg selv induserer HSR'er eller om HSR'ene skyldes eksipiensen (Cremaphor EL; Badische Anilin und Soda Fabrik AG (BASF), Ludwigshafen, Tyskland). Trass i usikkerheten angående hvorvidt eller ikke premedisinering hadde noen inflytelse på reduksjonen av alvorlighetsgraden eller antallet HSR, ble profylaktisk terapi anbefalt, siden det ikke foreligger noen kjent fare fra anvendelsen av denne.

De motsigende anbefalinger i kjent teknikk angående hvorvidt premedisinering burde anvendes for å unngå hypersensitivitetsreaksjoner ved anvendelse av forlengede infusjonsvarigheter, og mangelen på effektivitetsdata angående infusjoner som ble utført i løpet av en 6 timers periode har ført til anvendelsen av en 24 timers infusjon ved høye doser (over 170 mg/m²) Taxol i en Cremaphor EL-emulsjon som en akseptert cancerbehandlingsprotokoll.

Selv om det synes mulig å minimalisere bivirkningene av å administrere Taxol i en emulsjon ved anvendelse av en lang varighet for infusjonen, er den lange infusjonsvarighet ubekvem for pasienter, og er kostbar på grunn av behovet for å overvåke pasientene i løpet av hele den 6 til 24 timers infusjonsvarighet. Videre krever den lange infusjonsvarighet at pasienter tilbringer idet minste en natt i et sykehus eller en behandlingsklinikk.

Høyere doser av paklitaksel har også vært beskrevet i litteraturen. For å bestemme den maksimalt tolererte dose (MTD) av paklitaksel i kombinasjon med høy dose av cyklofosfamid og cisplatin fulgt av autolog hematopoetisk stamcellestøtte (AHPCS), Stemmer et al. ("High-dose paclitaxel, cyclophosphamid, and cisplatin with autologous hematopoietic progenitorcell support: A phase I trial", *J. Clin. Oncol.*, 14:1463-1472 (1996)) har gjennomført en fase I utprøving i 49 pasienter som med dårlig prognose hadde brystcancer, ikke-Hodgkin's lymfom (NHL) eller ovarialcancer med opptrappende doser av paklitaksel infusert i løpet av 24 timer, fulgt av cyklofosfamid (5,625 mg/m²) og cisplatin (165 mg/m²) og AHPCS. Dosebegrensende giftighet ble møtt hos to pasienter ved 825 mg/m² paklitaksel; en pasient døde av multipl organsvikt og den annen utviklet respiratorisk grad 3, CNS, og renal toksisitet, noe som svant. Polyneuropati og CNS-toksitet av grad 4 ble også observert. MTD for denne kombinasjonen ble fastlagt å være paklitaksel (775 mg/m²), cyklofosfamid (5,625 mg/m²) og cisplatin (165 mg/m²), fulgt av AHPCS. Sensorisk polyneuropati og mucositis var prominente toksisiteter, men begge var reversible og tolerable. 18 av 33 pasienter (54%) med brystkreft oppnådde en delvis respons. Responser ble også

observert i pasienter med NHL (fire av fem pasienter) og ovarialcancer (to av to pasienter).

US patent 5,641,803 rapporterer anvendelsen av taksol i doser på 175 og 135 mg/m²
 5 administrert i en 3 timers infusjon. Infusjonsprotokollene krever anvendelse av premedisinering og rapporterer tilfeller av hypersensitivitetsreaksjoner i 35% av pasientene. Neurotoksisitet ble rapportert i 51% av pasientene, idet 66% av pasientene opplevde neurotoksisitet i den høye dosegruppe og 37% i den lave dosegruppe. Videre ble det bemerkt at 48% av pasientene erfarte neurotoksisitet ved lengre infusjonstider
 10 på 24 timer, mens 54% av pasientene opplevde neurotoksisitet for den kortere 3 timers infusjon.

I litteraturen foreligger det indikasjoner på at høyere doser med paklitaksel resulterer i en høyere responshyppighet. De optimale doser og planer for paklitaksel er fremdeles
 15 under undersøkelse. For å fastsette muligheten for at paklitakseldoseintensitet kan være viktig i induksjonen av sykdomsrespons analyserte Reed et al., fra NCI (Reed, E., Bitton, R., Sarosy, G., og Kohn, E., "Paclitaxel dose intensity", *Journal of Infusional Chemotherapy*, 6:59-63 (1996)) de tilgjengelige utprøvningsdata av fase II i behandlingen av ovarialcancer og brystkreft. Deres resultater antyder at relasjonen mellom objektiv
 20 sykdomsrespons og paklitakseldoseintensitet i gjenopptredende ovarialcancer er i høy grad statistisk signifikant med tosidig p-verdi på 0,022. Relasjonen i brystkreft er enda sterker, med en tosidig p-verdi på 0,004. Ved 135 mg/m²/21 dager, var den objektive responshyppighet 13,2%; og ved 250 mg/m²/21 dager, var den objektive responshyppighet 35,9%. Den responshyppighet som ses ved den mellomliggende dose
 25 på 175 mg/m² var lineær i forhold til 135 mg/m² og 250 mg/m² resultatene og den lineære regressjonsanalysen viser en korrelasjonskoeffisient for disse data på 0,946 (Reed et al., 1996).

I en studie av Holmes et al. ("Phase II trial of Taxol, an active drug in the treatment of
 30 metastatic breast cancer", *J. Natl. Cancer Inst.*, 83:1797-1805, (1991)), og ved MSKCC (Reichman BS et al., "Paclitaxel and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as initial chemotherapy for metastatic breast cancer", *J. Clin. Oncol.*, 11:1943-1951 (1993)), ble det vist at høyere doser av Taxol, opp til 250 mg/m², frembrakte større responser (60%) enn dosen på 175 mg/m² (26%), som for tiden er
 35 godkjent for Taxol. Disse resultater har imidlertid ikke bli reproduisert på grunn av høyere giftighet ved disse høye dosene. Disse studier innebærer imidlertid bevis angående den potensielle økning i responshyppighet ved økede doser av paklitaksel.

Siden premedisinering er påkrevet for taksol, noe som ofte nødvendiggjør opphold over natten for pasienten på sykehuset, er det i høy grad ønskelig å utvikle en formulering av paklitaksel som unngår behovet for premedisinering.

5

Siden premedisinering kreves for taksol, på grunn av HSR som henger sammen med administreringen av virkestoffet, er det i høy grad ønskelig å utvikle en formulering av paklitaksel som ikke forårsaker hypersensitivitetsreaksjoner. Det er også ønskelig å utvikle en formulering av paklitaksel som ikke forårsaker neurotoksisitet.

10

Siden taksolinfusjoner generelt foregripes av premedisinering, og etter infusjon krever overvåking og registrering, noe som ofte nødvendiggjør opphold over natten for pasienten ved sykehuset, er det i høy grad ønskelig å utvikle en formulering av paklitaksel som ville muliggjøre at mottakerne behandles på polyklinisk basis.

15

Siden det har vært demonstrert at høyere doser med taksol oppnår forbedrede kliniske responser, dog med høyere giftighet, er det ønskelig å utvikle en formulering av paklitaksel som kan oppnå disse doser uten denne giftighet.

20

Siden det har vært demonstrert at den dosebegrensende giftighet for taksol er cerebral- og neurotoksisitet, er det ønskelig å utvikle en formulering av paklitaksel som minsker slik toksisitet.

Det er også ønskelig å eliminere premedisinering siden dette øker pasientubehag og øker
25 kostnaden og varigheten av behandlingen.

Det er også ønskelig å forkorte varigheten av infusjon av Taxol, som for tiden administreres i løpet av 3 timer til 24 timer, for å minimalisere pasientopphold ved sykehuset eller klinikken.

30

Siden taksol for tiden er godkjent for administrering i konsentrasjoner mellom 0,6 til 1,2 mg/ml, og en typisk dose i mennesker er ca. 250 til 350 mg, resulterer dette i infusjonsvolumer som typisk er større enn 300 ml. Det er ønskelig å redusere disse infusjonsvolumer, ved å utvikle formuleringer av paklitaksel som er stabile ved høyere
35 konsentrasjoner, slik at tiden for administrering reduseres.

Siden infusjon av Taksol er begrenset til anvendelsen av spesielle I.V. slanger og poser eller flasker på grunn av utluting av mykgjørere ved hjelp av emulgatoren i taksolformuleringen, er det ønskelig å utvikle en formulering av paklitaksel som ikke har emulgator og ikke løser ut potensielt giftige materialer fra de konvensjonelt
 5 anvendte plastslanger eller poser som benyttes for intravenøs infusjon.

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse omfatter formulering av paklitaksel som er egnet til administrering av paklitaksel til et individ som har behov derav, kjennetegnet ved at den
 10 omfatter nanopartikler omfattende paklitaksel som har et proteinbelegg, der nevnte nanopartikler har en gjennomsnittlig diameter som ikke er større enn ca. 200 nm, der mengden paklitaksel avleveres ved en dose på minst 135 mg/m² i løpet av en administreringsperiode som ikke varer lengre enn 2 timer.

15 Foreliggende oppfinnelse omfatter også formulering av paklitaksel, kjennetegnet ved at den omfatter nanopartikler omfattende paklitaksel som har et proteinbelegg, der nevnte nanopartikler har en gjennomsnittlig diameter som ikke er større enn 200 nm, og der konsentrasjonen av paklitaksel i formuleringen er minst 2.0 mg/ml og hvor konsentrasjonen av paklitaksel i formuleringen ikke er 20 mg/ml.

20 Det er et mål ifølge den foreliggende oppfinnelse å tilføre farmakologisk aktive midler (som kan være Taxol, Taksan, Taksoter og lignende) i umodifisert form i et preparat som ikke forårsaker allergiske reaksjoner på grunn av tilstedeværelsen av tilsatte emulgatorer og solubiliseringmidler, i likhet med de som for tiden benyttes i
 25 virkestofftilførselen.

Det er et ytterligere mål for den foreliggende oppfinnelse å tilføre farmakologisk aktive midler i et preparat av mikropartikler eller nanopartikler, valgfritt suspendert i en egnet biokompatibel væske.

30 Det er også mulig å frembringe fremgangsmåter for å danne submikronpartikler (nanopartikler) av farmakologisk aktive midler ved hjelp av en løsningsmiddel-fordampningsteknikk fra en emulsjon olje-i-vann. Noen fremgangsmåter benytter proteiner som stabiliseringsmidler. Noen fremgangsmåter gjennomføres i fravær av
 35 eventuelle konvensjonelle surfaktanter, og i fravær av eventuelt polymert kjernemateriale.

Målene for oppfinnelsen som nevnt, vil sammen med andre mål komme frem under gjennomgang av beskrivelsen og kravene.

Ifølge den foreliggende oppfinnelse er det oppdaget at idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler kan tilføres i form av mikropartikler eller nanopartikler som er egnet for parenteral administrering i vandige suspensjoner. Denne modus for tilførsel unngår nødvendigheten av å administrere idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler (eksempelvis Taxol) i en emulsjon som eksempelvis inneholder etanol og polyetoksyliert lakserolje, fortynnet i normalt saltvann (se f.eksempelvis Norton et al., i *Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus*, 23.-24. desember 1992). En ulempe ved slike kjente preparater er deres tilbøyelighet til å frembringe allergiske bivirkninger.

Altså, er det mulig å frembringe fremgangsmåter til dannelse av nanopartikler av farmakologisk aktive midler ved en løsningsmiddelfordampningsteknikk fra en emulsjon olje-i-vann som er fremstilt under et utvalg betingelser. Eksempelvis kan store skjærkrefter (eksempelvis sonikering, høytrykkshomogenisering eller lignende), benyttes i fravær av eventuelle konvensjonelle surfaktanter, og uten anvendelse av noe polymert kjernemateriale til dannelse av nanopartikkelens matrils. I stedet benyttes proteiner (eksempelvis humant serumalbumin) som et stabiliserende middel. I en alternativ fremgangsmåte, kan nanopartikler dannes uten behov for eventuelle store skjærkrefter ("shear" "forces"), ganske enkelt ved å velge materialer som spontant danner mikroemulsjoner.

Videre er det mulig å frembringe en fremgangsmåte for reproducerbar dannelse av uvanlig små nanopartikler (mindre enn 200 nm diameter), som kan sterilfiltreres gjennom et 0,22 µm filter. Dette oppnås ved tilsats av et vannløselig løsningsmiddel (for eksempelvis etanol) til den organiske fase og ved omsorgsfullt utvalg av typen organisk fase, fasefraksjonen, og virkestoffkonsentrasjonen i den organiske fase. Evnen til å danne nanopartikler av en størrelse som er filtrerbar ved hjelp av 0,22 µm filtre er av stor betydning og signifikans, siden formuleringer som inneholder en signifikant mengde av et eller annet protein (for eksempel albumin), ikke kan steriliseres ved hjelp av konvensjonelle fremgangsmåter slik som autoklaving, på grunn av varmekoagulering av proteinet.

Det er også mulig å utvikle preparater som er egnet for *in vivo* tilførsel av idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler. Preparatet omfatter idet vesentlige

vannuløselige farmakologisk aktive midler (i form av et fast stoff eller en væske) som rommes innen et polymert skall. Det polymere skall er en tverrbundet biokompatibel polymer. Det polymere skall, som rommer idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler deri, kan suspenderes i en biokompatibel vandig væske for administrering.

5

Videre er det mulig å frembringe et virkestofftilførselssystem hvori en del av molekylerne av farmakologisk aktivt middel er bundet til proteinet (f.eksempelvis human serumalbumin), og derfor er umiddelbart biotilgjengelige ved administrering til et pattedyr. Det andre parti av det farmakologisk aktive midlet rommes innen nanopartikler som er belagt med protein. De nanopartiklene som rommer det farmakologisk aktive midlet foreligger i form av en ren aktiv komponent, uten fortynning ved hjelp av eventuell polymer matriks.

Et stort antall konvensjonelle farmakologisk aktive midler sirkulerer i blodstrømmen bundet til bærer proteiner (ved hjelp av hydrofobe eller ioniske interaksjoner) hvorav det mest vanlige eksempel er serumalbumin. Fremgangsmåter og preparater som produseres derved besørger et farmakologisk aktivt middel som er "pre-bundet" til et protein (ved hjelp av hydrofobe eller ioniske interaksjoner) forut for administrering.

Den foreliggende beskrivelse demonstrerer begge de i det foregående beskrevne modi for biotilgjengelighet av Taxol (paklitaksel), et anticancervirkestoff som er i stand til å bindes til humant serumalbumin (se eksempelvis Kumar et al., i *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 80:337 (1993)). Den høye konsentrasjonen av albumin i partikler ifølge oppfinnelsen, sammenlignet med Taxol frembringer en signifikant mengde av virkestoffet i form av molekyler som er bundet til albumin, hvilket også er den naturlige bærer for virkestoffet i blodstrømmen.

Dessuten dras det fordel av humant serumalbumins evne til å binde Taxol, såvel som andre virkestoffer, noe som forbedrer Taxols evne til å absorberes på overflaten av partiklene. Siden albumin foreligger på de kolloidale virkestoffpartikler (som dannes ved fjerning av det organiske løsningsmiddel), lettes dannelse av en kolloidal dispersjon som er stabil over lange tidsrom, på grunn av en kombinasjon av elektrisk frastøting og sterisk stabilisering.

I samband med den foreliggende oppfinnelse er det også frembrakt submikronpartikler i pulverform, hvilke med letthet kan rekonstitueres i vann eller saltvann. Pulveret oppnås etter fjerning av vann ved lyofilisering. Humant serumalbumin tjener som den strukturelle komponent for noen nanopartikler ifølge oppfinnelsen, og dessuten som et

35

hjelpemiddel for frysebeskyttelse og rekonstituering. Fremstillingen av partikler som er filtrerbare gjennom et 0,22 µm filter som beskrevet heri, fulgt av tørking eller lyofilisering, frembringer en steril fast formulering som er egnet for intravenøs injeksjon.

5

I et særskilt aspekt frembringer oppfinnelsen et preparat med anticancervirkestoff, eksempelvis Taxol, i form av nanopartikler i en flytende dispersjon eller som et fast stoff som med letthet kan rekonstitueres for administrering. På grunn av spesifikke egenskaper til visse virkestoffer, eksempelvis taxol, kan slike preparater ikke oppnås ved konvensjonelle løsningsmiddelinn dampningsmetoder som bygger på anvendelsen av surfaktanter. I nærvær av forskjellige surfaktanter, dannes meget store virkestoffkrystaller (eksempelvis størrelse på ca. 5 µm til flere hundre µm) innen noen få minutters lagringstid, etter fremstillingsprosessen. Størrelsen av slike krystaller er typisk mye større enn den tillatte størrelse for intravenøs injeksjon.

15

Selv om det erkjennes at partikler som fremstilles enten kan være krystallinske, amorfe eller en blanding derav, foretrekkes det generelt at virkestoffet i formuleringen foreligger i en amorf form. Dette ville føre til en mer lett gjennomførbar oppløsning og absorpsjon, noe som resulterer i bedre biotilgjengelighet.

20

Anticancermidlet paklitaksel (Taxol, Bristol Myers Squibb, BMS) har bemerkelsesverdig klinisk aktivitet i et antall humane cancere inklusive cancere i eggstokk-, bryst-, lunge-, øsofagus-, hode- og nakke/halsregionen, blære og lymfom. Det er for tiden godkjent for behandling av ovarial karsinom hvor det benyttes i kombinasjon med cisplatin og for metastatisk brystkreft som har feilet i tidligere behandling med et kombinert kjemoterapiregime. Hovedbegrensningene med taxol er dets dårlige løselighet og dermed inneholder BMS-formuleringen 50% Cremaphor EL og 50% etanol som den solubilisierende bærer. Hvert glass med denne formulering inneholder 30 mg paklitaksel som er oppløst i en konsentrasjon på 6 mg/ml. Forut for intravenøs administrering, må formuleringen fortynnes 1:10 i saltvann til en endelig doseringsløsning som inneholder 0,6 mg/ml paklitaksel. Denne formuleringen har vært forbundet med alvorlige hypersensitivitetsreaksjoner i pattedyr (Lorenz et al., *Agents Actions*, 7:63-67 (1987)) og hos mennesker (Weiss et al., *J. Clin. Oncol.*, 8:1263-68 (1990)) og krever dermed premedisinering av pasienter med kortikosteroider (eksempelvis deksametason) og antihistaminer. Den store fortynning resulterer i store volumer for infusjon (typisk dose 175 mg/m² opp til 1 liter) og infusjonstider som

35

spenner fra 3 timer til 24 timer. Således, er det et behov for en alternativ mindre giftig formulering for paklitaksel.

Capxol™ er en ny, emulgatorfri formulering av anticancervirkestoffet paklitaksel.

- 5 Oppfinnerne tror, på basis av dyrestudier, at en emulgatorfri formulering vil være signifikant mindre giftig og ikke vil kreve premedisinering av pasienter. Premedisinering er nødvendig for å redusere den hypersensitivitet og anafylakse som opptrer som et resultat av emulgator i den for tiden godkjente og markedsførte BMS (Bristol Myers Squibb)- formulering av paklitaksel. Capxol™ er et frysetørrete pulver
- 10 for rekonstituering og intravenøs administrering. Når det rekonstitueres med et egnet vandig medium slik som 0,9% natriumklorid-injeksjon eller 5% dekstroseinjeksjon, danner Capxol™ en stabil kolloidal løsning av paklitaksel. Størrelsen av den kolloidale suspensjonen kan spenne fra 20 nm til 8 µm med et foretrukket variasjonsområde på ca. 20-400 nm. De to hovedkomponenter i Capxol™ er umodifisert paklitaksel og humant
- 15 serumalbumin (HSA). Siden HSA er fritt løselig i vann, kan Capxol™ rekonstitueres til en hver ønsket konsentrasjon av paklitaksel, utelukkende begrenset av løselighetsgrensene for HSA. Således kan Capxol™ rekonstitueres innen et vidt område av konsentrasjoner som spenner fra fortynnet (0,1 mg/ml paklitaksel) til konsentrert (20 mg/ml paklitaksel). Dette kan resultere i forholdsvis små volumer for administrering.
- 20 I samsvar med den foreliggende oppfinnelse, er det frembragt preparater som er egnet for *in vivo* tilførsel av biovirkestoff, i form av nanopartikler som er egnet for parenteral administrering i vandig suspensjon. Preparatene ifølge oppfinnelsen stabiliseres ved hjelp av en polymer. Polymeren er et biokompatibelt materiale, slik som proteinet albumin. Anvendelsen av preparatet ifølge oppfinnelsen for tilførsel av biovirkestoff
- 25 unngår nødvendigheten av å administrere biovirkestoff i giftige fortynningsmidler av bærere, eksempelvis etanol og polyetoksyliert lakserolje, fortynnet i normalt saltvann (se eksempelvis, Norton et al., i *Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus*, 23.-24. september 1992). En ulempe med slike kjente preparater er deres tilbøyelighet til å frembringe alvorlige allergiske og andre bivirkninger.

30

- Det er kjent at tilførselen av biovirkestoff i form av en partikkelformet suspensjon tillater målretting mot organer slik som leveren, lungene, milten, lymfatisk sirkulasjon og lignende, på grunn av at partiklene i disse organer tas opp av cellenes retikuloendoteliale (RES) system. Det å målrette mot RES-holdige organer kan styres
- 35 ved hjelp av anvendelsen av partikler av varierende størrelse, og ved hjelp av administrering via ulike ruter. Men ved administrering til rotter, ble Capxol uventet og overraskende funnet å akkumulere i vev utover de som inneholdt RES slik som prostata,

bukspyttkjertelen, testikkelen, seminiferøs tubulus, ben, etc., til et signifikant større nivå enn Taxol ved lignende doser.

Således er det meget overraskende at formuleringen ifølge oppfinnelsen av paklitaksel, Capxol, en nanopartikkelformulering, konsentrerer i vev slik som prostata, bukspyttkjertel, testikkel, seminiferøs tubulus, ben, etc., dvs. i organer som ikke inneholder RES, i et signifikant høyere nivå enn en ikke partikkelformet formulering av paklitaksel slik som taxol. Således kan Capxol benyttes til å behandle cancere i disse vev med en høyere effektivitet enn taxol. Imidlertid er fordelingen til mange andre vev lignende for Capxol og Taxol, derfor forventes Capxol å opprettholde anticanceraktivitet idet minste svarende til den for Taxol i andre vev.

Basis for lokaliseringen innen prostata kunne være et resultat av formuleringens partikkelstørrelse (20-400 nm), eller tilstedeværelsen av proteinet albumin i formuleringen, noe som kan forårsake lokalisering i det prostatiske vev ved hjelp av spesifikke membranreseptorer (gp 60, gp 18, gp 13 og lignende). Det er også trolig at andre biokompatible, biodegraderbare polymerer utover albumin kan fremvis spesifisitet overfor bestemt vev slik som prostata, noe som resulterer i høy lokal konsentrasjon av paklitaksel i disse vev som et resultat av de i de foregående beskrevne egenskapene. Slike biokompatible materialer anses å være innenfor rekkevidden av denne oppfinnelse. Et preparat til oppnåelse av høye lokale konsentrasjoner av paklitaksel i prostata er en formulering som inneholder paklitaksel og albumin med en partikkelstørrelse i området 20-400 nm, og fri for emulgator. Denne formen har også vært demonstrert å resultere i konsentrasjoner på høyere nivåer av paklitaksel i bukspyttkjertel, nyre, lunge, hjerte, ben og milt ved sammenligning med Taxol ved tilsvarende doser. Disse egenskaper frembringer nye anvendelsesområder for denne formulering av paklitaksel inklusive fremgangsmåter for å senke testosteronnivåer, oppnå medisinsk orkidektomi og frembringe høye lokale konsentrasjoner til koronar vaskulatur for behandling av restenose.

Det er også meget overraskende at paklitaksel metaboliseres til sine metabolitter i en mye langsommere hastighet enn Taxol, ved administrering i form av Capxol. Dette representerer økt anticanceraktivitet i lengre perioder med lignende doser av paklitaksel.

Det er også meget overraskende at når Capxol og Taxol administreres til rotter i ekvivalente doser av paklitaksel, fremkommer det en meget høyere grad av myelosuppressjon for Taxol-gruppen sammenlignet med Capxol-gruppen. Dette kan

resultere i lavere forekomster av infeksjoner og færre episoder (eksempel febril neutropeni). Det kan også redusere syklustiden mellom behandlinger, som for tiden er 21 dager. Således kan anvendelsen av Capxol frembringe vesentlig fordel sammenlignet med Taxol.

5

Det ble overraskende funnet at taxolbæreren cremophor/etanol fortynnet i saltvann alene forårsaket sterk myelosuppressjon og forårsaket alvorlige hypersensitivetsreaksjoner og død i flere dosegrupper av mus. Ingen slike reaksjoner ble observert for capxol-gruppene ved ekvivalente og høyere doser. Således er capxol en formulering av

10

paklitaksel som er fri for taxolbæreren, av vesentlig fordel.

Det er også meget overraskende at når capxol og taxol administreres til rotter med ekvivalente doser med paklitaksel, ses en meget lavere giftighet for capxol sammenlignet med taxol, noe som fremkommer ved signifikant høyere LD₅₀-verdier.

15

Dette kan muliggjøre at høyere, mer terapeutisk virksomme doser av paklitaksel administreres til pasienter. Det er også i litteraturen tegn som viser øket responshyppighet for høyere doser med paklitaksel. Capxol-formuleringen kan muliggjøre administrering av disse høyere doser på grunn av lavere giftighet og derved utnytte det fulle potensialet av dette virkestoff.

20

Det er også overraskende at capxol, en formulering av det idet vesentlige vannuløselige virkestoff paklitaksel, er stabilt når det rekonstitueres i et vandig medium ved flere ulike konsentrasjoner som spenner fra, men ikke er begrenset til 0,1 til 20 mg/ml. Dette tilbyr vesentlig fordel sammenlignet med taxol i løpet av administrering av virkestoffet, idet det resulterer i mindre infusjonsvolumer, overvinner ustabilitetsproblemer som er

25

kjent for taxol (slik som utfelling), og unngår anvendelsen av et tilkoblet filter i infusjonsslangen. Således forenkler og forbedrer capxol i stor grad administreringen av paklitaksel til pasienter.

30

Det er også overraskende at capxol ved administrering til rotter i ekvivalente doser av paklitaksel sammenlignet med taxol, ikke fremviser noe tegn på neurotoksisitet, selv om taxol, endog ved lave doser, fremviser neurotoksiske effekter.

35

Formuleringen ifølge oppfinnelsen tillater videre administreringen av paklitaksel, og andre idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler, ved anvendelse av et meget mindre volum av væske og ved å kreve i stor grad reduserte

administreringstidsom sammenlignet med administreringsvolumer og tidsrom som kreves av kjent teknikks tilførselssystemer.

I kombinasjon med en biokompatibel polymermatriks, tillater formuleringen ifølge oppfinnelsen (capxol) lokal langvarig tilførsel av paklitaksel med lavere giftighet og forlenget aktivitet.

De ovenstående overraskende funn angående capxol tilbyr det potensialet og med det vesentlige forbedre livskvaliteten for pasienter som mottar paklitaksel.

10

Potensielle fordeler av Capxol™ formulering i forhold til Paclitaxel

Capxol™ er et lyofilisert pulver som utelukkende inneholder paklitaksel og humant serumalbumin. På grunn av egenskapene til den kolloidale løsning som dannes ved rekonstituering av det lyofiliserte pulver kreves ikke giftige emulgatorer slik som cremophor (i BMS-formuleringen av paklitaksel) eller polysorbat 80 (som i Rhone Poulenc-formuleringen av docetaksel) og løsningsmidler slik som etanol for å solubilisere virkestoffet. Fjerning av giftige emulgatorer vil redusere forekomsten av alvorlig hypersensitivitet og anafylaktiske reaksjoner som er kjent for å opptre i TAXOL-produktene.

20

Dessuten forventes ingen premedisinering med steroider og antihistaminer forut for administrering av virkestoffet.

På grunn av redusert toksisitet, noe som ses av LD₁₀/LD₅₀-studiene, kan høyere doser benyttes for å oppnå større effekt.

Reduksjonen i myelosuppressjon (sammenlignet med BMS-formuleringen) forventes å redusere perioden for behandlingssyklusen (for tiden 3 uker) og forbedre de terapeutiske resultater.

30

Capxol™ kan administreres ved meget høye konsentrasjoner (opp til 20 mg/ml) sammenlignet med BMS-formuleringen (0,6 mg/ml), noe som tillater infusjoner med meget lavere volum, og administrering i form av en intravenøs bolus.

35

Taxol kan infunderes med nitroglyserin-polyolefin-infusjonssett på grunn av utluting ("leaching") av mykgjørere fra vanlige infusjonsslanger inn i formuleringen. Capxol

fremviser ingen utluting og kan benyttes sammen med hvilke som helst vanlige infusjonsslangere. Dessuten skal bare glass- eller polyolefin-beholdere benyttes for lagring av alle emulgatorholdige løsninger. Capxol formuleringen har ingen slike begrensninger.

5

Et erkjent problem med taxolformuleringer er utfellingen av paklitaksel i innlagte katetere. Dette resulterer i uregelmessig og dårlig kontrollert dosering. På grunn av den iboende stabilitet til den kolloidale løsning av den nye formulering, Capxol, avbøtes problemet med utfelling.

10

Administrering av taxol krever anvendelse av filtre i slangene for å fjerne bunnfall og annet partikulært materiale. Capxol har ingen slike krav grunnet sin iboende stabilitet.

Litteraturen antyder at partikler i størrelsesområdet noen få hundre nanometer
15 fortrinnsvis partisjoneres inn i tumorer gjennom lekke blodkar ved tumorstedet. De kolloidale partikler av paklitaksel i Capxol™-formuleringen kan derfor fremvise en måleinnretningseffekt som er å foretrekke, noe som i stor grad reduserer bivirkningene av paklitaksel som administreres i BMS-formuleringen.

20 Derfor er det et primært mål for den foreliggende oppfinnelse å frembringe en ny formulering av paklitaksel som besørger de i det foregående ønskelige kjennetegn.

Det er et annet mål ifølge den foreliggende oppfinnelse å frembringe en ny formulering av paklitaksel som lokaliseres paklitaksel i visse vev, slik at høyere anticanceraktivitet
25 frembringes på disse steder.

Det er annet mål ifølge oppfinnelsen å administrere paklitaksel i konsentrasjoner som er større enn ca. 2 mg/ml med sikte på å redusere infusjonsvolumene.

30 Det er også et mål ifølge oppfinnelsen å frembringe en formulering av paklitaksel som er fri for taxolbæreren.

Det er nok et annet mål ifølge oppfinnelsen å frembringe en formulering av paklitaksel som forbedrer livskvaliteten for pasienter som mottar taxol for behandling av cancer.

35

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 viser resultatene av intravenøs administrering av paklitaksel-nanopartikler til tumorbærende mus (n=5 i hver gruppe), og viser en fullstendig regresjon av tumor i behandlingsgruppen (■), sammenlignet med en kontrollgruppe som mottok saltvann (O). Faktisk helt ukontrollert tumorvekst ses i kontrollgruppen. Dose for
5 behandlingsgruppen er 20 mg/kg paklitaksel administrert i form av en intravenøs bolus i løpet av fem påfølgende dager.

Figur 2 presenterer resultatene av intraperitoneal administrering av
10 paklitakselnanopartikler i rotter som har utviklet artritt i deres poter som følge av intradermal injeksjon av kollagen. Potevolumer er målt og indikerer alvorlighetsgraden av sykdommen. Potevolumene er normalisert til 100% ved begynnelsen av behandlingen. Dag 0 representerer innledningen av behandlingen. Det foreligger 3 grupper - kontrollgruppe som mottar saltvann (n=2, vist som en tynn linje og merket i
15 figuren som "ikke behandlet"), en første behandlet som mottar paklitakselnanopartikler i form av en dose på 1 mg/kg (n=4, vist som en fet linje og merket i figuren som "paklitakselnanopartikler 1,0 mg/kg"), og en andre behandlet gruppe som mottok kombinasjonsterapi med paklitakselnanopartikler ved en dose på 0,5 mg/kg og prednison ved en dose på 0,2 mg/kg (n=4, vist som en fet linje og merket i figuren som
20 "prednison 0,2 mg/kg + paklitakselnanopartikler 0,5 mg/kg"). De to behandlede grupper viser en dramatisk reduksjon i potevolum med tid, noe som indikerer en regresjon av artritt, mens kontrollgruppen viste en økning i potevolum i løpet av den samme periode.

Figur 4 viser en pilotstudie med Capxol™ for å bestemme områder for måldoser samt effektivitet. Musene (n=10) ble subkutant implantert med MX-1 pattedyrtumor og behandlingen ble initiert når tumoren nådde en størrelse på ca. 150-300 mg. Dette opptrådte ved dag 12 og behandlingen ble initiert på dag 13 etter initial siding. Capxol™ ble rekonstituert i saltvann til oppnåelse av en kolloidal løsning av
30 nanopartikler med paklitaksel. De tumorbærende mus (n=5) ble behandlet med rekonstituert Capxol™ ved en dose på 20 mg/kg (betegnet med VIV-1), gitt med bolus-haleveineinjeksjon hver dag i løpet av 5 påfølgende dager. Den tumorbærende kontrollgruppe (n=5) mottok bare salin på den samme plan. Tumorenes størrelse ble overvåket som en funksjon av tid. Kontrollgruppen viste en veldig økning i tumorvekt
35 til en median på over 4500 mg og alle dyr i denne gruppe ble avlivet mellom dag 28 og dag 39. På den annen side fremviste den behandlede gruppe bemerkelsesverdig effektivitet og alle dyr hadde ingen målbare tumorer ved dag 25. Dyrene i denne gruppe

ble alle avlivet på dag 39 på hvilket tidspunkt de ikke fremviste noe tegn på tilbakefall og intet tegn på tumor.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

- 5 Foreliggende oppfinnelse vedrører formulering av paklitaksel som omfatter nanopartikler omfattende paklitaksel som har et proteinbelegg . Formuleringen muliggjør at høyere doser av paklitaksel kan avleveres over et kortere tidstrom. Formulering som omfatter nanopartikler omfattende paklitaksel som har et proteinbelegg som muliggjør en administrering av paklitaksel med redusert
- 10 infusjonvolum er også en del av foreliggende oppfinnelse.

- Det er også mulig å frembringe fremgangsmåter til reduksjon av den hematologiske toksisitet av paklitaksel i et subjekt som gjennomgår behandling med paklitaksel, idet fremgangsmåten omfatter systematisk administrering av paklitaksel til subjektet i en
- 15 farmasøytisk akseptabel formulering i en dose på minst 175 mg/m² i løpet av en administreringsperiode på ikke mer enn 2 timer.

- Videre kan det også frembringes fremgangsmåter til fremstilling av idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler for *in vivo* tilførsel, idet fremgangsmåten
- 20 omfatter:

a) kombiner

- i) et organisk løsningsmiddel med det aktive middel oppløst deri;
 - ii) vann eller en vandig løsning;
 - 25 iii) en surfaktant; og
 - iv) en kosurfaktant
- som spontant danner en mikroemulsjon; og

- b) fjerne det organiske løsningsmiddel for å gi en suspensjon av nanopartikler av det
- 30 aktive middel i vannet.

- Videre kan det frembringes et virkestofftilførselsessystem som omfatter partikler av et fast stoff eller en væske, idet vesentlige vannuløselig farmakologisk aktivt middel, belagt med et protein, hvori proteinbelegget har et fritt protein assosiert dermed,
- 35 hvori et parti av det farmakologisk aktive middel rommes innen proteinbelegget og et parti av det farmakologisk aktive middel er assosiert med det frie protein, og

hvor den gjennomsnittlige diameter for partiklene ikke er større enn ca. 1 μm .

Preparater som fremstilles ved hjelp av de i de foregående beskrevne fremgangsmåter er
5 særskilt fordelaktige idet de har vært observert å frembringe en meget liten giftig form
av et utvalg av farmakologisk aktive midler. Også beskrevet heri er andre
fremgangsmåter til fremstilling av lite giftige former av farmakologisk aktive midler,
eksempelvis paklitaksel.

10 I en foretrukken utførelsesform, er den gjennomsnittlige diameter av de i de foregående
beskrevne partikler ikke større enn ca. 200 nm. Slike partikler er særskilt fordelaktige,
idet de kan underlegges steril filtrering, slik at behovet for mer kraftig behandling til
oppnåelse av sterilisering av løsninger som inneholder det ønskede farmakologisk aktive
middel unngås.

15

Ved anvendelse heri, uten at det motsatte er spesifisert, omfatter termen "paklitaksel"
alle former, modifikasjoner og derivater av paklitaksel, eksempelvis takoter og lignende.

Capxol™ er varemerket for den paklitakselformulering som skal markedsføres av
20 søkerens assignatarer. Ved anvendelse heri, er Capxol™ utelukkende et kortfattet
middel for henvisning til proteinbelagte paklitakselnanopartikler som er produsert ved
hjelp av fremgangsmåten fra eksempel 1. Capxol™ er en varemerkebeskyttet ny
cremaphor-fri formulering av anticancervirkestoffet paklitaksel. Oppfinnerne antar, på
basis av dyrestudier, at en cremaphor-fri formulering vil være signifikant mindre giftig
25 og vil ikke kreve premedisinering av pasienter. Premedisinering er nødvendig for å
reducere den hypersensitivitet og anafylakse som opptrer som et resultat av cremaphor
(emulgator) i den for tiden godkjente og markedsførte BMS-formulering av paklitaksel.
Capxol™ er et lyofilisert pulver for rekonstituering og intravenøs administrering. Hvert
glass med Capxol® inneholder 30 mg paklitaksel og ca. 400 mg humant serumalbumin.
30 Ved rekonstituering med et egnet vandig medium slik 0,9% natriumkloridinjeksjon eller
5% dekstroseinjeksjon, danner Capxol™ en stabil kolloidal løsning av paklitaksel.
Størrelsen på de kolloidale nanopartikler er typisk mindre enn 400 nm. Nanopartiklene
fremstilles ved høytrykkshomogenisering av en løsning av USP human serumalbumin
og en løsning av paklitaksel i et organisk løsningsmiddel. Løsningsmidlet fjernes
35 deretter til dannelsen av den kolloidale suspensjon eller løsning av paklitaksel i human
albumin. Suspensjonen filtreres sterilt og lyofiliseres til oppnåelse av Capxol™.
Formuleringen inneholder ingen andre tilsatte eksipienser eller stabilisatorer. Produktets

sterilitet sikres ved hjelp av en aseptisk produksjonsprosess og/eller ved steril filtrering. De to hovedkomponenter i Capxol™ er umodifisert paklitaksel og humant serumalbumin (HSA). Siden HSA er fritt løselig i vann, kan Capxol™ rekonstitueres til en hvilken som helst ønsket konsentrasjon av paklitaksel utelukkende begrenset av
 5 løselighetsgrensene for HSA. Således kan Capxol™ rekonstitueres innen et bredt område av konsentrasjoner som spenner fra fortynnet (0,1 mg/ml paklitaksel) til konsentrert (20 mg/ml paklitaksel). Dette kan resultere i ganske små volumer for administrering.

10 Ved anvendelse heri viser termen “*in vivo* tilførsel” til tilførsel av et farmakologisk aktivt middel ved slike ruter for administrering som oral, intravenøs, subkutan, intraperitoneal, intratekal, intramuskulær, inhalasjon, topisk, transdermal, suppositorisk (rektal), pessar (vaginal), intrauretral, intraportal, intrahepatisk, intra-arteriell, intrahumoral, og lignende.

15

Ved anvendelse heri, viser termen “ μm ” til en måleenhet på en tusendel av en millimeter.

Ved anvendelse heri beskriver termen “biokompatibel” en substans som ikke merkbart
 20 endrer eller påvirker, på noen skadelig måte, det biologiske system inn i hvilket det introduseres.

Idet vesentlige vannuløselige, farmakologisk aktive midler som tilsiktes for anvendelse i gjennomføringen av den foreliggende oppfinnelse kan det inkluderes farmasøytisk
 25 aktive midler, diagnostiske midler, midler av næringsverdi, og lignende. Eksempler på farmasøytisk aktive midler inkluderer:

analgetika/antipyretika (eksempelvis aspirin, acetaminofen, ibuprofen, naproksennatrium, buprenorfinhydroklorid, propoksyfenhydroklorid,
 30 propoksyfennapsylat, meperidinhydroklorid, hydromorfonhydroklorid, morfinsulfat, oksykodonhydroklorid, kodeinfosfat, dihydrokodeinbitartrat, pentazocinhydroklorid, hydrokodonbitartrat, levorfanoltartrat, diflunisal, trolaminsalicylat, nalbufinhydroklorid, mefenaminsyre, butorfanoltartrat, kolinsalicylat, butalbital, fenyltoloksaminsitrat, difenhydraminsitrat, metotrimeprazin, cinnamedrinhydroklorid, meprobamat, og
 35 lignende);
 anestetika (eksempelvis cyklopropan, enfluran, halotan, isofluran, metoksyfluran, nitrogenoksid, propofol, og lignende);

antiaastmatika (eksempelvis Azelastin, Ketotifen, Traxanox, Amlexanox, Cromolyn, Ibudilast, Montelukast, Nedocromil, Oxatomid, Pranlukast, Seratrodist, Suplatastosylat, Tiaramid, Zafirlukast, Zileuton, Beclometason, Budesonid, deksametason, Flunisolid,
 5 Trimcinolonacetamid, og lignende);

antibiotika (eksempelvis neomycin, streptomycin, kloramfenikol, cefalosporin, ampicillin, penicillin, tetracyklin, og lignende);

10 antidepressiva (eksempelvis nefopam, oksypertin, doksepinhydroklorid, amoksapin, trazodonhydroklorid, amitriptylinhydroklorid, maprotilinhydroklorid, fenelzinsulfat, desipraminhydroklorid, nortriptylinhydroklorid, tranlycyprominsulfat, fluoksetinhydroklorid, imipraminamot, nortriptylin, amitriptylinhydroklorid, isokarboksamid, desipraminhydroklorid, trimipraminmaleat, protriptylinhydroklorid, og
 15 lignende);

antidiabetika (eksempelvis biguanider, hormoner, sulfonylureaderivater, og lignende);

antifungale midler (eksempelvis griseofulvin, kelokonazol, amfotericin B, nystatin,
 20 candidin, og lignende);

antihypertensive midler (eksempelvis propanolol, propafenon, oksyprenolol, nifedipin, reserpin, trimetafankamsylat, fenoksybenzaminhydroklorid, pargylinhydroklorid, deserpidin, diazoksid, guanidinmonosulfat, minoksidil, rescinnamin,
 25 natriumnitroprussid, nauwolfia serpentina, alseroksylon, fentolaminmesylat, reserpin, og lignende);

anti-inflammatorier (eksempelvis (ikke-steroidal) indometacin, naproksen, ibuprofen, ramifenazon, piroksikam (steroidal) kortison, deksametason, fluazakort, hydrokortison,
 30 prednisolon, prednison, og lignende);

antineoplastika (eksempelvis adriamycin, cyklofosamid, aktinomycin, bleomycin, duanorubicin, doksorubicin, epirubicin, mitomycin, metotreksat, fluoruracil, karboplatin, karmustin (BCNU), metyl-CCNU, cisplatin, etoposid, interferoner,
 35 kamftotecin og derivater derav, fenesterin, taxol og derivater derav, taksoter og derivater derav, vinblastin, vinkristin, tamoksifen, etoposid, piposulfan og lignende);

beroligende midler (eksempelvis lorazepam, buspironhydroklorid, prazepam, klordiazepoksidhydroklorid, oksazepam, klorazepatdikalium, diazepam, hydroksyzinpamoat, hydroksyzinhydroklorid, alprazolam, droperidol, halazepam, klormezanon, dantrolen og lignende);

5

immunosuppressive midler (eksempelvis cyklosporin, azatioprin, mizoribin, FK506 (takrolimus) og lignende);

antimigrerende midler (eksempelvis ergotamintartrat, propanololhydroklorid, isometheptenmukat, diklorfenazon, og lignende);

10

sedativer/hypnotika (eksempelvis barbiturater (eksempelvis pentobarbital, pentobarbitalnatrium, sekobarbitalnatrium), benzodiazepiner (eksempelvis flurazepamhydroklorid, triazolam, tomazepam, midazolamhydroklorid, og lignende);

15

antianginale midler (eksempelvis beta-adrenergiske blokkere, kalsiumkanalblokkere (eksempelvis nifedipin, diltiazemhydroklorid, og lignende), nitrater (eksempelvis nitroglycerin, isosorbiddinitrat, pentaerytritoltetranitrat, erytrityltetranitrat, og lignende);

Antipsykotiske midler (eksempelvis haloperidol, loksapinsuksinat, loksapinhydroklorid, tioridazin, tioridazinhydroklorid, tiotiksen, flufenazinhydroklorid, flufenazindekanoat, flufenazinenantat, trifluoperazinhydroklorid, litiumsitrat, proklorperazin og lignende);

20

antimaniske midler (eksempelvis litiumkarbonat);

25

antiarytmika (eksempelvis bretyliumtosylat, esmololhydroklorid, verapamilhydroklorid, amiodaron, enkainidhydroklorid, digoksin, digitoksin, meksiletinhydroklorid, diisopyramidfosfat, prokainamidhydroklorid, kinidinsulfat, kinidinglukonat, kinidinpolygalakturonat, flekainidacetat, tokainidhydroklorid, lidokainhydroklorid, og lignende);

30

antiartrittiske midler (eksempelvis fenylbutazon, sulindak, penicillamin, salsalat, pioksikam, azatioprin, indometacin, meklofenamatnatrium, gullnatriumtiomalat, ketoprofen, auranofin, aurotioglukose, tolmetinnatrium, og lignende);

35

giktmidler (eksempelvis kolchicin, allopurinol, og lignende);

antikoagulanter (eksempelvis heparin, heparinnatrium, warfarinnatrium, og lignende);
rombolyttiske midler (eksempelvis urokinase, streptokinase, altoplase, og lignende);

antifibrinolyttiske midler (eksempelvis aminokaprønsyre);

5

hemoreologiske midler (eksempelvis pentoksifyllin);

antiblodplatemidler (eksempelvis aspirin, empirin, askriptin, og lignende);

10 antikonvulsanter (eksempelvis valproinsyre, divalproatnatrium, fenytoin, fenytoinnatrium, klonazepam, primidon, fenobarbital, fenobarbitolnatrium, karbamazepin, amobarbitalnatrium, metsuksimid, metarbitol, mefobarbital, mefenytoin, fensuksimid, parametadion, etotoin, fenacemid, sekobarbitolnatrium, klorazepat, dikalium, trimetadion, og lignende);

15

antiparkinsonmidler (eksempelvis etosuksimid, og lignende);

antihistaminer/antiopruritika (eksempelvis hydroksyzinhydroklorid, difenhydraminhydroklorid, klorfeniraminmaleat, bromfeniraminmaleat,
20 cyproheptadinhydroklorid, terfenadin, klemastinfumarat, triprolidinhydroklorid, karbinoksaminmaleat, difenylpyralinhydroklorid, fenidamintartrat, azatadinmaleat, tripelennaminhydroklorid, deksklorfeniraminmaleat, metdilazinhydroklorid, trimprazintartrat, og lignende);

25 midler et til kalsiumregulering (eksempelvis kalsitonin, paratyroidhormon, og lignende);

antibakterielle midler (eksempelvis amikacinsulfat, aztreonam, kloramfenikol, kloramfenikolpalmitat, kloramfenikolnatriumsuksinat, ciprofloksasinhydroklorid, klindamycinhydroklorid, klindamycinpalmitat, klindamycinfosfat, metronidazol,
30 metronidazolhydroklorid, gentamicinsulfat, linkomycinhydroklorid, tobramycinulfat, vankomycinhydroklorid, polymyxin B sulfat, kolistimetatnatrium, kolistinsulfat, og lignende);

antivirale midler (eksempelvis interferon gamma, zidovudin, amantadinhydroklorid,

35 ribavirin, aciklovir, og lignende);

antimikrobielle midler (eksempelvis cefalosporiner (eksempelvis cefazolinnatrium, cefradin, cefaklor, cefapirinnatrium, ceftizoksimnatrium, cefoperazonnatrium, cefotetandinatrium, cefutoksimazotil, cefotaksimnatrium, cefadroksilmonohydrat, ceftazidim, cefaleksin, cefalotinnatrium, cefaleksinhydroklorid monohydrat, cefamandolnaftat, cefoksitinnatrium, cefonicidnatrium, ceforanid, ceftriaksonnatrium, ceftazidim, cefadroksil, cefradin, cefuroksimnatrium, og lignende), penicillin G benzatin, cyklacillin, ampicillinnatrium, penicillin G kalium, penicillin V kalium, piperacillinnatrium, oksacillinnatrium, bakampicillinhydroklorid, kloksacillinnatrium, tikarcillindinatrium, azlocillinnatrium, karbenicillinindanylnatrium, penicillin G kalium, penicillin G prokain, meticillinnatrium, nafcillinnatrium, og lignende), erytromyciner (eksempelvis erytromycinetylsuksinat, erytromycin, erytromycinestolat, erytromycinlaktobionat, erytromycinsiearat, erytromycinetylsuksinat, og lignende), tetracykliner (eksempelvis tetracyklinhydroklorid, doksycyklinhyklat, minocyklinhydroklorid, og lignende), og lignende);

15

anti-infektiva (eksempelvis GM-CSF);

bronkodialaterende midler (eksempelvis sympatomimetika (eksempelvis epinefrinhydroklorid, metaproterenolsulfat, terbutalinsulfat, isoetarin, isoetarinmesylat, isoetarinhydroklorid, albuterolsulfat, albuterol, bitolterol, mesylatisoproterenolhydroklorid, terbutalinsulfat, epinefinbitartrat, metaproterenolsulfat, epinefrin, epinefrinbitartrat), antikolinergiske midler (eksempelvis ipratropiumbromid), xantinderivater (eksempelvis aminofyllin, dyfyllin, metaproterenolsulfat, aminofyllin), mastcellestabilisatorer (eksempelvis kromolynnatrium), inhalante kortikosteroider (eksempelvis flurisolidebeklometasondipropionat, beklometasondipropionat monohydrat), salbutamol, beklometasondipropionat monohydrat), salbutamol, beklometasondipropionat (BDP), ipratropiumbromid, budesonid, ketotifen, salmeterol, xinafoat, terbutalinsulfat, triamkinolon, teofyllin, nedokromilnatrium, metaproterenolsulfat, albuterol, flunisolid, og lignende);

hormoner (eksempelvis androgener (eksempelvis danazol, testosteroncypionat, fluoksymesteron, etyltestosteron, testosteronenanihat, metyltestosteron, fluoksymesteron, testosteroncypionat), østrogener (eksempelvis østradiol, østropipat, konjugerte østrogener), progestiner (eksempelvis metoksyprogesteronacetat, noretindronacetat), kortikosteroider (eksempelvis triamcinolon, betametason, betametasonnatriumfosfat, deksametason, deksametasonnatriumfosfat,

35

- deksametasonacetat, prednison, metylprednisolonacetatsuspensjon, triamcinolonacetamid, metylprednisolon, prednisolonnatriumfosfat, metylprednisolonnatriumsuksinat, hydrokortisonnatriumsuksinat, metylprednisolonnatriumsuksinat, triamcinolonheksaketonid, hydrokortison, 5 hydrokortisoncypionat, prednisolon, fluorkortisonacetat, parametasonacetat, prednisolontebulat, prednisolonacetat, prednisolonnatriumfosfat, hydrokortisonnatriumsuksinat, og lignende), tyreoider hormoner (eksempelvis levotyroksinnatrium) og lignende), og lignende);
- 10 hypoglykemiske midler (eksempelvis humant insulin, renset storfekjøttinsulin, renset svinekjøttinsulin, gliburid, klorpropamid, glipizid, tolbutamid, tolazamid, og lignende);
- hypolipidemiske midler (eksempelvis klofibrat, dekstrotyroksinnatrium, probukol, lovastatin, niacin, og lignende);
- 15 proteiner (eksempelvis DNase, alginase, superoksiddismutase, lipase, og lignende);
- nukleinsyrer (eksempelvis sens- eller antisensnukleinsyrer som koder for et evt. terapeutisk nyttig protein, inklusive et av de proteinene som er beskrevet heri, og 20 lignende);
- midler egnet til erytropoiesestimulering (eksempelvis erythropoietin);
- antiulcus/antirefluksmidler (eksempelvis famotidin, cimetidin, ranitidinhydroklorid, og 25 lignende);
- antikvalmemidler/antiemetika (eksempelvis meklizinhydroklorid, nabilon, proklorperazin, dimenhydrinat, prometazinhydroklorid, dimenhydrinat, prometazinhydroklorid, tietylperazin, skopolamin, og lignende);
- 30 oljeløselige vitaminer (eksempelvis vitaminene A, B, E, K, og lignende); og
- så vel som andre virkestoffer slik som mitotan, visadin, halonitrosoureas, antrocykliner, ellipticin og lignende.
- 35 Eksempler på diagnostiske midler inkluderer ultralyd-kontrastmidler, radiokontrastmidler (eksempelvis jodoktaner, halokarboner, renografin, og lignende),

magnetiske kontrastmidler (eksempelvis fluorkarboner, lipidløselige paramagnetiske forbindelser, og lignende), såvel som andre diagnostiske midler som ikke uten videre kan tilføres uten en eller annen fysisk og/eller kjemisk modifikasjon for å avhjelpe den idet vesentlige vannuløselige natur derav.

5

Eksempler på midler av næringsverdi som kan anvendes er aminosyrer, sukre, proteiner, karbohydrater, fettløselige vitaminer (eksempelvis vitaminene A, D, E, K og lignende), eller fett eller kombinasjoner av to eller flere derav.

10 **A. DANNEELSE AV NANOPARTIKLER VED ANVENDELSE AV STERKT SKJÆRENDE HOMOGENISERING**

Hovedforskjeller mellom de farmakologisk aktive midler som rommes i et polymert skall ifølge oppfinnelsen og proteinmikrokuler av kjent teknikk ligger i typen dannelse
 15 og den fine tilstand av proteinet etter dannelsen av partikkelen, og i dens evne til å bære lite vannløselige, eller idet vesentlige vannuløselige midler. I samsvar med den foreliggende oppfinnelse kan polymeren (eksempelvis et protein) tverrbindes som et resultat av eksponering overfor sterkt skjærende betingelser i en høytrykkshomogenisator. Sterkt skjær benyttes for å dispergere et dispergeringsmiddel
 20 som inneholder oppløst eller suspendert farmakologisk aktivt middel inn i en vandig løsning av en biokompatibel polymer, som valgfritt bærer sulfhydryl- eller disulfidgrupper (eksempelvis albumin) hvorved et skall av tverrbundet polymer dannes rundt fine dråper av et ikke vandig medium. Betingelsene med sterkt skjær frembringer kavitering i væsken og denne forårsaker voldsom lokal oppvarming og resulterer i
 25 dannelsen av superoksidioner som er i stand til å tverrbinde polymeren, eksempelvis ved å oksidere sulfhydrylrestene (og/eller rive opp eksisterende disulfidbindinger) til dannelse av nye, tverrbindende disulfidbindinger.

I kontrast til prosessen, er kjent teknikks fremgangsmåte med glutaraldehyd-
 30 tverrbinding ikke spesifikk og idet vesentlige reaktive med en hver nukleofil gruppe som foreligger i proteinstrukturen (eksempelvis aminer og hydroksyler). Varmedenaturering som anvist i kjent teknikk endrer signifikant og irreversibelt proteinstrukturen. Derimot vil disulfiddannelse som tilsiktet ved den foreliggende oppfinnelse idet vesentlige ikke denaturere proteinet. Dessuten adskiller partikler av idet
 35 vesentlige vannuløselig farmakologisk aktive midler som rommes innen et skall seg fra tverrbundne eller varmedenaturerte proteinmikrokuler av kjent teknikk, fordi det polymere skall som frembringes ved prosessen er relativt tynt sammenlignet med

diameteren av den belagte partikkel. Det er fastlagt (ved transmissjonselektronmikroskopi) at "skalltykkelsen" av det polymere belegg er ca. 25 nm for en belagt partikkel med en diameter på 1 μ m (1000 nm). Derimot har mikrokuler av kjent teknikk ikke proteinskall, men har derimot protein dispergert gjennom hele
5 mikrokulens volum.

Et farmakologisk aktivt middel oppløst i et egnet løsningsmiddel (eksempelvis kloroform, metylenklorid, etylacetat, etanol, tetrahydrofuran, dioksan, butanol, butylacetat, acetonitril, aceton, dimetylsulfoksid, dimetylformamid, metylpyrrolidon,
10 eller lignende, såvel som blandinger av hvilke som helst to eller flere derav). Ytterligere løsningsmiddel som tilsiktes for anvendelse ved gjennomføringen av den foreliggende oppfinnelse kan være soyaolje, kokosolje, olivenolje, safrantistelolje, bomullsfrøolje, sesamolje, appelsinolje, limonenolje, C1-C20-alkoholer, C2-C20-estere, C3-C20-ketoner, polyetylenglykoler, alifatiske hydrokarboner, aromatiske hydrokarboner,
15 halogenerte hydrokarboner og kombinasjoner derav.

I motsetning til konvensjonelle fremgangsmåter for dannelse av nanopartikler, blir en polymer (eksempelvis polymelkesyre) ikke oppløst i løsningsmidlet. Den oljefase som benyttes ved fremstillingen av preparatene ifølge oppfinnelsen inneholder typisk
20 utelukkende det farmakologisk aktive middel oppløst i løsningsmiddel.

Deretter blir et protein (eksempelvis humant serumalbumin) tilsatt (inn i den vandige fase) for å virke som et stabiliseringsmiddel til dannelse av stabile nanodråper. Protein tilsettes i en konsentrasjon innen området ca. 0,05 til 25% (vekt/volum), eller heller i
25 området ca. 0,5% til 5% (vekt/volum). I motsetning til konvensjonelle fremgangsmåter for dannelse av nanopartikler, tilsettes ingen surfaktant (eksempelvis natriumlaurylsulfat, lecitin, Tween 80, pluronic F-68, og lignende) til blandingen.

Deretter dannes det en emulsjon ved homogenisering under høyt trykk og store
30 skjærkrefter. Slik homogenisering utføres bekvemt i en høytrykkshomogenisator, som typisk opereres ved trykk innen området ca. 20000 opp til 410000 kPa. Fortrinnsvis utføres slike prosesser ved trykk innen området ca. 40000 opp til 280000 kPa. Den resulterende emulsjonen omfatter meget små nanodråper av det ikke-vandige løsningsmiddel (som inneholder det oppløste farmakologisk virksomme middel) og
35 meget små nanodråper av det proteinformede stabiliseringsmiddel. Akseptable fremgangsmåter for homogenisering inkluderer prosesser som tildeler sterkt skjær og

kavitering slik som høytrykkshomogenisering, sterktstjærende mikserer, sonikering, sterktstjærende løpehjul og lignende.

Endelig, inndampes løsningsmidlet under redusert trykk for å gi et kolloidalt system
5 som består av proteinbelagte nanopartikler av farmakologisk aktivt middel og protein. Akseptable fremgangsmåter for inndamping inkluderer anvendelse av rotasjonsfordampere, fallende filmfordampere, sprøytetørkere, frysetørkere og lignende. Ultrafiltrering kan også benyttes til løsningsmiddelfjerning.

10 Etter inndamping av løsningsmidlet, kan den flytende suspensjonen tørkes til oppnåelse av et pulver som inneholder det farmakologisk aktive middel og protein. Det resulterende pulver kan redispergeres på et hvert passende tidspunkt i et egnet vandig medium slik som saltvann, bufret saltvann, vann, bufrede vandige medier, løsninger av aminosyrer, løsninger av vitaminer, løsninger av karbohydrater eller lignende, såvel som
15 kombinasjoner av hvilke som helst to eller flere derav, til oppnåelse av en suspensjon som kan administreres til pattedyr. Fremgangsmåter som tilsiktes for oppnåelse av dette pulver inkluderer frysetørring, sprøytetørring og lignende.

Det kan også frembringes en alternativ fremgangsmåte til dannelse av uvanlig små
20 submikronpartikler (nanopartikler), dvs. partikler som er mindre enn 200 nm i diameter. Slike partikler er i stand til å sterilfiltreres før anvendelse i form av en flytende suspensjon. Evnen til å sterilfiltrere sluttproduktet av formuleringsprosessen ifølge oppfinnelsen (dvs. virkestoffpartiklene) er av stor betydning siden det er umulig å sterilisere dispersjoner som inneholder høye konsentrasjoner av protein (eksempelvis
25 serumalbumin) ved konvensjonelle fremgangsmåter slik som autoklaving.

For å kunne oppnå sterilfiltrerbare partikler (dvs. partikler <200 nm), blir det farmakologisk aktive middel innledningsvis oppløst i et idet vesentlige vannuløselig organisk løsningsmiddel (eksempelvis et løsningsmiddel med mindre enn ca. 5%
30 løselighet i vann, slik som eksempelvis kloroform) ved høy konsentrasjon, slik at det dannes en oljefase som inneholder det farmakologisk aktive middel. Egnede løsningsmidler er frembragt i det foregående. I motsetning til konvensjonelle fremgangsmåter for nanopartikkeldannelse, blir en polymer (eksempelvis polymelkesyre) ikke oppløst i løsningsmidlet. Den oljefase som benyttes i prosessen
35 ifølge den foreliggende oppfinnelse, inneholder utelukkende det farmakologisk aktive middel oppløst i løsningsmiddel.

Deretter, blir et vannløselig organisk løsningsmiddel (eksempelvis et løsningsmiddel med mer enn ca. 10% løselighet i vann, slik som eksempelvis etanol) tilsatt til oljefasen ved en endelig konsentrasjon innen området ca. 1%-99% volum/volum, eller innen området ca. 5%-25% volum/volum, av den samlede organiske fase. Det vannløselige organiske løsningsmiddel kan utvelges fra slike løsningsmidler, som etylacetat, etanol, tetrahydrofuran, dioksan, acetonitril, butanol, aceton, propylenglykol, glyserol, dimetylsulfoksid, dimetylformamid, metylpyrrolidon og lignende. Alternativt, prepareres blandingen av vannuløselig løsningsmiddel med det vannløslige løsningsmiddel først, fulgt av oppløsning av det farmasøytisk aktive middel i blandingen.

Deretter blir humant serumalbumin eller et annet egnet stabiliseringsmiddel som beskrevet i det foregående oppløst i vandig medium. Denne komponent fungerer som et stabiliseringsmiddel for dannelsen av stabile nanodråper. Valgfritt blir en tilstrekkelig mengde av det første organiske løsningsmiddel (eksempelvis kloroform) oppløst i den vandige fase for å bringe den nær til metningskonsentrasjon. En separat, målt mengde av den organiske fase (som nå inneholder det farmakologisk aktive middel, det første organiske løsningsmiddel og det andre organiske løsningsmiddel) tilsettes til den mettede vandige fase, slik at fasefraksjonen av den organiske fase er mellom ca. 0,5%-15% volum/volum, og enda heller mellom 1% og 8% volum/volum.

Deretter dannes en blanding som består av mikro- og nanodråper ved hjelp av homogenisering ved små skjærkrefter. Dette kan oppnås på et utvalg måter, hvilke med letthet kan identifiseres av fagfolk, eksempelvis ved anvendelse av en vanlig laboratorie-homogenisator som opererer innen området ca. 2000 opp til ca. 15000 omdreininger pr. minutt. Dette følges av homogenisering under høyt trykk (dvs. innen området ca. 20000 opp til 410000 kPa). Den resulterende blanding omfatter en vandig proteinløsning (eksempelvis humant serumalbumin), det vannuløselige farmakologisk aktive middel, det første løsningsmiddel og det andre løsningsmiddel. Endelig, inndampes løsningsmiddel hurtig under vakuum for å gi et kolloidalt dispersjonssystem (farmakologisk aktivt middel og protein) i form av ekstremt små nanopartikler (dvs. partikler innen området ca. 10 nm - 200 nm diameter) som kan sterilfiltreres. Det foretrukne størrelsesområdet for partiklene er mellom ca. 50 nm - 170 nm, avhengig av formuleringen og driftsparameterene.

Kolloidale systemer som fremstilles kan videre konverteres til pulverform ved fjerning av vannet derfra, dvs. ved lyofilisering eller sprøytetørking ved en egnet

temperatur/tidsprofil. Proteinet (eksempelvis humant serumalbumin) fungerer i seg selv som en kryobeskytter eller lyobeskytter, og pulveret rekonstitueres med letthet ved tilsats av vann, saltvann eller buffer, uten behov for å benytte slike konvensjonelle kryobeskyttere som mannitol, sukrose, glysin og lignende. Selv om det ikke er påkrevet, skal dette selvfølgelig oppfattes dithen at konvensjonelle kryobeskyttere kan tilsettes til formuleringene ifølge oppfinnelsen dersom dette ønskes.

Det kolloidale system av farmakologisk aktivt middel muliggjør tilførselen av høye doser av det farmakologisk aktive middel i relativt små volumer. Dette minimaliseres pasientens ubekvemhet ved mottak av store volumer væske og minimaliseres sykehusopphold. Dessuten er veggene i det polymere skall eller belegg generelt fullstendig degraderbart *in vivo* ved proteolytiske enzymer (eksempelvis, når polymeren er et protein), noe som resulterer idet vesentlige ingen bivirkninger fra tilførselssystemet, noe som står i sterk motsetning til de signifikante bivirkninger som forårsakes av tidligere formuleringer.

Et antall biokompatible polymerer kan benyttes ved gjennomføringen av den foreliggende oppfinnelse for dannelsen av det polymere skall som omgir de idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler. Essensielt en hvilken som helst polymer, naturlig eller syntetisk, som valgfritt bærer sulfhydrylgrupper eller disulfidbindinger innen sin struktur, kan benyttes til fremstillingen av et disulfid-tverrbundet skall rundt partikler av idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler. Sulfhydrylgruppene eller disulfidbindingene kan eksistere på forhånd innen den polymere struktur eller de kan introduseres ved en egnet kjemisk modifikasjon. Eksempelvis er naturlige polymerer slik som proteiner, peptider, polynukleinsyrer, polysakkarider (eksempelvis stivelse, cellulose, dekstraner, alginater, chitosan, pektin, hyaluronsyre, og lignende), proteoglykaner, lipoproteiner osv. kandidater for slik modifisering.

Proteiner som tilsiktes for anvendelse som stabiliseringsmidler i samsvar med den foreliggende oppfinnelse inkluderer albuminer (som inneholder 35 cysteinrester), videre kan immunglobuliner, kaseiner, insuliner (som inneholder 6 cysteiner), hemoglobiner (som inneholder 6 cysteinrester pr. $\alpha_2\beta_2$ -enheter), lysozymer (som inneholder 8 cysteinrester), immunoglobuliner, alfa-2-makroglobulin, fibronektiner, vitronektiner, fibrinogener, lipaser, og lignende anvendes. Proteiner, peptider, enzymer, antistoffer og kombinasjoner derav er generelle klasser av stabilisatorer som er mulig å anvende i den foreliggende oppfinnelse.

Et for tiden foretrukket protein til anvendelse som et stabiliseringsmiddel er albumin. Valgfritt kan proteiner slik som alfa-2-makroglobulin, et kjent opsonin, benyttes for å forbedre opptak av de skallinnkapslede partikler av idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler ved hjelp av makrofagliggende celler, eller for å forbedre opptaket av de skallinnkapslede partikler inn i lever og milt. Spesifikke antistoffer kan også benyttes for å sikte inn nanopartiklene mot spesifikke lokaliseringer. Andre funksjonelle proteiner, slik som antistoffer eller enzymer, som kunne lette målrettingen av biovirkestoff mot et ønsket punkt, kan også benyttes som komponenter i det stabiliserende protein.

På lignende måte er syntetiske polymerer også gode kandidater for dannelse av partikler med et polymert skall. Dessuten er polyalkylenglykoler (eksempelvis lineær eller forgrenet kjede), polyvinylalkohol, polyakrylater, polyhydroksyetylenmetakrylat, polyakrylsyre, polyetyloksazolin, polyakrylamider, polyisopropylakrylamider, polyvinylpyrrolidon, polymelkesyre/glykolid og lignende, og kombinasjoner derav, gode kandidater for den biokompatible polymer i formuleringen ifølge oppfinnelsen.

På lignende måte er syntetiske polypeptider også gode kandidater til stabiliseringsmidler for de idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive midler. Dessuten, kan slike materialer som syntetiske polyaminosyrer som inneholder cysteinrester og/eller disulfidgrupper; polyvinylalkohol som er modifisert for å inneholde frie sulfhydrylgrupper og/eller disulfidgrupper; polyhydroksyetylmakrylat som er modifisert til å inneholde frie sulfhydrylgrupper og/eller disulfidgrupper; polyakrylsyre som er modifisert for å inneholde frie sulfhydrylgrupper og/eller disulfidgrupper; polyetyloksazolin som er modifisert for å inneholde frie sulfhydrylgrupper og/eller disulfidgrupper; polyakrylamid som er modifisert for å inneholde frie sulfhydrylgrupper og/eller disulfidgrupper; polyvinylpyrrolidon som er modifisert for å inneholde frie sulfhydrylgrupper og/eller disulfidgrupper; polyalkylenglykoler som er modifisert for å inneholde frie sulfhydrylgrupper og/eller disulfidgrupper; polylaktider, polyglykolider, polykaprolaktoner, eller kopolymerer derav, som er modifisert for å inneholde frie sulfhydrylgrupper og/eller disulfidgrupper; såvel som blandinger av hvilke som helst to eller flere derav anvendes.

Ved fremstilling av preparatene ifølge oppfinnelsen, kan et bredt utvalg organiske medier benyttes for å suspendere eller oppløse det idet vesentlige vannuløselige farmakologisk aktive middel. Organiske medier som tilsiktes for anvendelse ved

gjennomføring av den foreliggende oppfinnelse kan inkludere en hver ikke vandig væske som er i stand til å suspendere eller oppløse det farmakologisk aktive middel, og som ikke kjemisk reagerer med hverken den polymer som benyttes for å produsere skallet, eller det farmakologisk aktive middel i seg selv. Eksempler inkluderer

5 vegetabiliske oljer (eksempelvis soyaolje, olivenolje og lignende), kokosolje, safrantistelolje, bomullsfrøolje, sesamolje, appelsinolje, limonenolje, alifatiske, cykloalifatiske eller aromatiske hydrokarboner med 4 til 30 karbonatomer (eksempelvis n-dodekan, n-dekan, n-heksan, cykloheksan, toluen, benzen, og lignende), alifatiske eller aromatiske alkoholer med 2-30 karbonatomer (eksempelvis oktanol og lignende),

10 alifatiske eller aromatiske estere med 2-30 karbonatomer (eksempelvis etylkaprylat (oktanoat), og lignende), alkyl, aryl eller cykliske etere med 2-30 karbonatomer (eksempelvis dietyleter, tetrahydrofuran og lignende), alkyl- eller arylhalider med 1-30 karbonatomer (og valgfritt mer enn en halogensubstituent, eksempelvis CH_3Cl , CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}-\text{CH}_2\text{Cl}$, og lignende), ketoner med 3-30 karbonatomer (eksempelvis aceton,

15 metyletylketon og lignende), polyalkylenglykoler (eksempelvis polyetylenglykol, og lignende), eller kombinasjoner av hvilke som helst to eller flere derav.

Særsilt foretrukne kombinasjoner av organiske medier som tilsiktes for anvendelse i gjennomføringen av den foreliggende oppfinnelse har typisk et kokepunkt på ikke over

20 ca. 200°C , og inkluderer flyktige væsker som slik diklormetan, kloroform, etylacetat, benzen, etanol, butanol, butylacetat og lignende (dvs. løsningsmidler som har en høy grad av løselighet for det farmakologisk aktive middel, og er løselige i det andre organiske medium som benyttes), sammen med et organisk medium av høyere molekylvekt (mindre flyktig). Når de tilsettes til det andre organiske medium, hjelper

25 disse flyktige additiver til å drive løseligheten av det farmakologisk aktive middel inn i det organiske medium. Dette er ønskelig siden dette trinn vanligvis er tidsforbrukende. Etter oppløsningen, kan den flyktige komponent fjernes ved inndamping (valgfritt under vakuum).

30 Partikler av farmakologisk aktivt middel som er knyttet til et polymert skall, fremstilt som beskrevet i det foregående, tilføres som en suspensjon i en biokompatibel vandig væske. Denne væske kan velges fra vann, saltvann, en løsning som inneholder egnede buffere, en løsning som inneholder næringsmidler slik som aminosyrer, sukker, proteiner, karbohydrater, vitaminer eller fett og lignende.

35

Disse biokompatible materialer kan også benyttes i flere fysiske former slik som geler, tverrbundne eller ikke tverrbundne, til frembringelse av matrikser fra hvilke den

- farmakologisk aktive bestanddel, eksempelvis paklitaksel, kan frigjøres ved diffusjon og/eller degradering av matriksen. Temperaturfølsomme materialer kan også benyttes som dispergeringsmatriksen for formuleringen ifølge oppfinnelsen. Således kan eksempelvis Capxol™ injiseres i en væskeformulering av det temperaturfølsomme
- 5 materialet (eksempelvis kopolymerer av polyakrylamider eller kopolymerer av polyalkylenglykoler og polymelkesyre/glykolider) som geler ved tumorpunktet og frembringer langsam frigjøring av Capxol™. Capxol™-formuleringen kan dispergeres i en matriks av de idet foregående nevnte biokompatible polymerer til frembringelse av en formulering av paklitaksel med styrt frigjøring, hvilken på grunn av egenskapene til
- 10 Capxol™-formuleringen (albumin som er assosiert med paklitaksel) resulterer i lavere giftighet for hjernevev såvel som lavere systemisk giftighet som diskutert i det følgende. Denne kombinasjonen av Capxol™ eller andre kjemoterapeutiske midler som er formulert i likhet med Capxol™, sammen med en biokompatibel polymermatriks, kan være egnet til styrt lokal tilførsel av kjemoterapeutiske midler for behandling av faste
- 15 tumorer i hjernen og peritoneum (ovarialcancer), og i lokale anvendelser overfor andre faste tumorer. Disse kombinasjonsformuleringer er ikke begrenset til anvendelsen av paklitaksel og kan benyttes sammen med et bredt utvalg farmakologisk aktive bestanddeler inklusive anti-infektiva, immunosuppressiva, og andre kjemoterapeutika og lignende.
- 20
- Kolloidale partikler som idet vesentlige fullstendig rommes innen et polymert stabiliseringslag, eller er assosiert dermed fremstilt som beskrevet heri, tilføres ublandet, eller valgfritt som en suspensjon i et biokompatibelt medium. Dette medium kan utvelges fra vann, bufrede vandige medier, saltvann, bufret saltvann, valgfritt bufrede
- 25 løsninger av aminosyrer, valgfritt bufrede løsninger av proteiner, valgfritt bufrede løsninger av sukkerer, valgfritt bufrede løsninger av karbohydrater, valgfritt bufrede løsninger av vitaminer, valgfritt bufrede løsninger av syntetiske polymerer, lipidholdige emulsjoner og lignende.
- 30
- Dessuten kan de kolloidale partikler valgfritt modifiseres ved hjelp av et egnet middel, hvori midlet er knyttet sammen med det polymere lag ved hjelp av en valgfri kovalent binding. Kovalente bindinger som tilsiktes for slike sammenkjedinger inkluderer ester, eter, uretan, diester, amid, sekundær eller tertiær amin, fosfater, sulfater og lignende. Egnede midler som tilsiktes for denne valgfrie modifikasjonen av det
- 35 polymere skall inkluderer syntetiske polymerer (polyalkylenglykoler (eksempelvis lineær eller forgrenet polyetylenglykol), polyvinylalkohol, polyhydroksyetylmetakrylat, polyakrylsyre, polyetyloksazolin, polyakrylamid, polyvinylpyrrolidon og lignende),

fosfolipider (slik som fosfatidylcholin (PC), fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylinositol (PI), sfingomyelin og lignende), proteiner (slik som enzymer, antibiotika og lignende), polysakkarider (slik som stivelse, cellulose, dekstraner, alginater, chitosan, pektin, hyaluronsyre, og lignende), kjemisk modifierende midler (slik som pyridoksal-5'-
 5 fosfat, derivater av pyridoksal, dialdehyder, diaspirinestere og lignende), eller kombinasjoner av hvilke som helst to eller flere derav.

Variasjoner i det generelle tema for stabiliserte kolloidale partikler er mulig. En suspensjon av fine partikler av farmakologisk middel i et biokompatibelt
 10 dispergeringsmiddel kunne benyttes (istedet for et biokompatibelt dispergeringsmiddel som inneholder oppløst biovirkestoff) til frembringelse av et polymert skall som inneholder dispergeringsmiddelsuspenderte partikler av biovirkestoff. Med andre ord, kunne det polymere skall inneholde en mettet løsning av biovirkestoff i dispergeringsmiddel. En annen variant er en polymert skall som inneholder en fast
 15 kjerne av biovirkestoff som er produsert ved innledningsvis oppløsning av biovirkestoffet i et flyktig organisk løsningsmiddel (eksempelvis benzen), dannelsen av det polymere skall og inndamping av det flyktige løsningsmiddel under vakuum, eksempelvis i en inndamper, sprøytetørking, eller frysetørking av hele suspensjonen. Dette resulterer i en struktur med en fast kjerne av biovirkestoff omgitt av et
 20 polymerbelegg. Denne sistnevnte fremgangsmåte er særskilt fordelaktig for tilførsel av høye doser av biovirkestoff i et forholdsvis lite volum. I noen tilfeller kunne det biokompatible materialet som danner skallet rundt kjernen i seg selv være et terapeutisk eller et diagnostisk middel, eksempelvis i tilfellet med insulin, som kunne tilføres som en del av et polymert skall som dannes i den prosess som er beskrevet i det foregående. I
 25 andre tilfeller, kunne den polymer som danner skallet delta i tilførselen av et biovirkestoff, eksempelvis i tilfellet med antistoffer som benyttes for målretting, eller i tilfellet med hemoglobin, som kan tilføres som en del av et polymert skall som dannes i den ultrasoniske bestrålingsprosess som er beskrevet i det foregående, noe som frembringer et blodsubstitut med høy bindingskapasitet for oksygen.

30

Fagfolk vil erkjenne at flere varianter er mulig innen rekkevidden og ideen for dette aspekt av oppfinnelsen. Det organiske medium innen det polymere skall kan varieres, et stort utvalg av farmakologisk aktive midler kan benyttes, og et bredt utvalg av proteiner såvel som andre naturlige og syntetiske polymerer kan benyttes i dannelsen av det
 35 polymere skalls vegger. Anvendelsesområder spenner også ganske vidt. Utover biomedisinske anvendelser slik som tilførselen av virkestoffer, diagnostiske midler (i imaging-anvendelser), kunstig blod, og parenterale næringsmidler, kan den polymere

skallstruktur ifølge oppfinnelsen inkorporeres i kosmetiske anvendelser slik som hudkremer eller hårpleieprodukter, i parfymieranvendelser, i trykkfølsomme farger (inks), og lignende.

- 5 Dette aspekt ved oppfinnelsen skal nå beskrives mer detaljert under henvisning til de følgende eksempler.

Eksempel 1

10 Fremstilling av nanopartikler ved høytrykkshomogenisering

30 mg paklitaksel oppløses i 3,0 ml metylenklorid. Løsningen ble tilsatt til 27,0 ml humant serumalbumin-løsning (1% vekt/volum). Blandingen ble homogenisert i 5 minutter ved lav omdreiningshastighet (Vitris homogenisator, modell: Tempest I.Q.) med sikte på å danne en grovemulsjon, og deretter overført til en

- 15 høytrykkshomogenisator (Avestin). Emulgeringen ble utført ved 62000-276000 kPa under resyklring av emulsjonen i løpet av minst 5 sykluser. Det resulterende system ble overført til en rotasjonsinndamper, og metylenklorid ble hurtig fjernet ved 40°C, ved redusert trykk (30 mm Hg), i løpet av 20-30 minutter. Den resulterende dispersjonen var gjennomskinnelig, og den typiske diameter for de resulterende paklitakselpartikler var
20 160-220 nm (Z-gjennomsnitt, Malvern Zetasizer).

Dispersjonen ble videre frysetørret i 48 timer uten tilsats av noe kryobeskyttet. Den resulterende kake kunne med letthet rekonstitueres til den opprinnelige dispersjonen ved tilsats av sterilt vann eller saltvann. Partikkelstørrelsen etter rekonstituering var den
25 samme som før lyofilisering.

Eksempel 2

Anvendelse av konvensjonelle surfaktanter og proteiner resulterer i dannelse av store 30 krystaller

Det følgende eksempel demonstrerer effekten av å tilsette surfaktanter som benyttes i den konvensjonelle fremgangsmåte med løsningsmiddelindamping. En serie forsøk ble utført ved anvendelse av en lignende prosedyre som den som er beskrevet i eksempel 1, men en surfaktant slik som Tween 80 (1% til 10%) ble tilsatt til det organiske
35 løsningsmiddel. Det ble funnet at etter fjerning av metylenklorid, ble det oppnådd store antall paklitakselkrystaller med en gjennomsnittlig størrelse på 1-2 µm, som sett ved hjelp av lysmikroskopi og under polarisert lys. Krystallene vokser i løpet av noen få

timer til dannelse av meget store nålelignende krystaller, med en størrelse i området ca. 5-15 μm . Et lignende fenomen observeres med andre vanlig benyttede surfaktanter, slik som Pluronic F-68, Pluronic F-127, Cremophor EL og Brij 58.

- 5 Fra disse resultater kan det konkluderes at den konvensjonelle fremgangsmåte med løsningsmiddelinnedamping som benytter konvensjonelle surfaktanter i kombinasjon med et protein slik som albumin ikke er egnet for dannelsen av submikronvirkestoffpartikler (eksempelvis paklitaksel) uten en polymer kjerne, ved anvendelse av et polart løsningsmiddel (eksempelvis metylenklorid).

10

Eksempel 3

- 15 Anvendelse av konvensjonelle surfaktanter alene resulterer i dannelse av store krystaller
Dette eksempel demonstrerer at det ikke er mulig å danne nanopartikler ved anvendelse av konvensjonelle surfaktanter, uten et polymert kjernemateriale, med farmakologisk aktive midler som er løselige i polare, vannuløselige løsningsmidler (eksempelvis kloroform).

20

- 30 mg taxol oppløses i 0,55 ml kloroform og 0,05 ml etanol. Løsningen tilsettes til 29,4 ml Tween 80-løsning (1% vekt/volum), som på forhånd er mettet med 1% kloroform. Blandingen homogeniseres i 5 minutter ved lav omdreinings hastighet (Vitriss homogenizer, modell: Tempest I.Q.) med sikte på å danne en grov emulsjon, og
25 overføres deretter til en høytrykkshomogenisator (Avestin). Emulgeringen utføres ved 62000-276000 kPa mens emulsjonen resykleres idet minste i løpet av 6 sykluser. Det resulterende system ble overført til en rotasjonsinnedampner, og kloroformen ble hurtig fjernet ved 40°C, ved redusert trykk (30 mm Hg), i løpet av 15-30 minutter. Den resulterende dispersjon var opak, og inneholdt store nålelignende krystaller av
30 virkestoffet. Den innledningsvis størrelse av krystallene (observert også ved polarisert lys), var 0,7 til 5 μm . Lagring av dispersjonen i løpet av flere timer ved romtemperatur førte til ytterligere økning i krystallstørrelse, og endelig til utfelling.

Eksempel 4

35

Fremstilling av sterilfiltrerbare nanopartikler på mindre enn 200 nm

Dette eksempel beskriver en prosess ved hvilke sterilfiltrerbare virkestoffpartikler kan tilveiebringes. Således oppløses 30 mg taxol i 0,55 ml kloroform og 0,05 ml etanol. Løsningen tilsettes til 29,4 ml humant serumalbuminløsning (1% vekt/volum), som på forhånd er mettet med 1% kloroform. Blandingen homogeniseres i 5 minutter ved lav omdreiningshastighet (Vitrís homogenizer, modell: Tempest I.Q.) med sikte på å danne en grov emulsjon, og overføres deretter over i en høytrykkshomogenisator (Avestin). Emulgeringen utføres ved 62000-276000 kPa mens emulsjonen resykleres idet minste i løpet av 6 sykluser. Det resulterende system overføres til en rotasjonsinndamper, og kloroformen fjernes hurtig ved 40°C, ved redusert trykk (30 mm Hg), i løpet av 15 til 30 minutter. Den resulterende dispersjonen er gjennomskinnelig, og de resulterende taxolpartiklers diameter er typisk 140 til 160 nm (Z-gjennomsnitt, Malvern Zeta Sizer). Dispersjonen filtreres gjennom et 0,22 µm filter (Millipore) uten signifikant endring i turbiditet eller partikkelstørrelse. HPLC-analyse av taxolinnholdet viste at mer enn 97% av taxolet ble gjenvunnet etter filtrering, noe som frembragte en steril taxoldispersjon.

Den sterile dispersjonen ble videre lyofilisert i løpet av 48 timer uten tilsats av noen kryobeskytter. Den resulterende kake kunne med letthet rekonstitueres til den opprinnelige dispersjonen ved tilsats av sterilt vann eller saltvann. Partikkelstørrelsen etter rekonstituering var den samme som før lyofilisering.

Eksempel 5

Fremstilling av sterilfiltrerbare nanopartikler på mindre enn 200 nm

Dette eksempel beskriver en prosess ved hvilke sterilfiltrerbare virkestoffpartikler kan tilveiebringes. Således oppløses 225 mg taxol i 2,7 ml kloroform og 0,3 ml etanol. Løsningen tilsettes til 97 ml human serumalbuminløsning (3% vekt/volum). Blandingen homogeniseres i 5 minutter ved lav omdreiningshastighet (Vitrís homogenizer, modell: Tempest I.Q.) med sikte på å danne en grov emulsjon, og overføres deretter til en høytrykkshomogenisator (Avestin). Emulgeringen utføres ved 62000-276000 kPa mens emulsjonen resykleres i løpet av minst 6 sykluser. Det resulterende system overføres til en rotasjonsinndamper, og kloroform fjernes hurtig ved 40°C, ved redusert trykk (30 mm Hg), i løpet av 15-30 minutter. Den resulterende dispersjonen er gjennomskinnelig, og de resulterende taxolpartiklers typiske diameter er 140-160 nm (Z-gjennomsnitt, Malvern Zeta Sizer). Dispersjonen filtreres gjennom et 0,22 µm filter (Sartorius, sartobran 300), uten noen signifikant endring i turbiditet, eller partikkelstørrelse. HPLC-analyse av taxolinnholdet viste typisk at 70-100% av taxol kunne gjenvinnes etter

filtrering, avhengig av de betingelser som ble benyttet. Således fremkom en steril taxoldispersjon.

Den sterile dispersjonen ble aseptisk fylt over i sterile glassflasker og frysetørres uten
 5 tilsats av noen kryobeskytter. Den resulterende kake kunne med letthet konstrueres til den opprinnelige dispersjonen ved tilsats av sterilt vann eller saltvann.

Partikkelstørrelsen etter rekonstituering var den samme som før lyofilisering.

10 Eksempel 8

Nanopartikkeldannelse av et modellvirkestoff

30 mg isoreserpin (et modellvirkestoff) ble oppløst i 3,0 ml metylenklorid. Løsningen ble tilsatt til 27,0 ml humant serumalbuminløsning (1% vekt/volum). Blandingen ble
 15 homogenisert i 5 minutter ved lav omdreiningshastighet (Vitris homogenizer, modell: Tempes I.Q.) med sikte på å danne en grov emulsjon, og deretter overført til en høytrykkshomogenisator (Avestin). Emulgeringen ble utført ved 62000-164000 kPa under resyklring av emulsjonen i løpet av minst 5 sykluser. Det resulterende system overføres til en rotasjonsfordamper, og metylenklorid fjernes hurtig ved 40°C, ved et
 20 redusert trykk (30 mm Hg), i løpet av 20-30 minutter. Den resulterende dispersjonen er gjennomskinnelig, og de resulterende paklitaksel partiklers typiske diameter var 120-140 nm (Z-gjennomsnitt, Malvern Zetasizer). Dispersjonen ble filtrert gjennom et 0,22 µm filter (Millipore).

25 Den sterile dispersjonen ble videre lyofilisert i løpet av 48 timer uten tilsats av noen kryobeskytter. Den resulterende kake kunne med letthet rekonstitueres til den opprinnelige dispersjon ved tilsats av sterilt vann eller saltvann. Partikkelstørrelsen etter rekonstituering var den samme som før lyofilisering.

30 Eksempel 9

Dannelse av ekstremt små partikler med et modellvirkestoff

Effekten av etanoltilsats på reduksjon av partikkelstørrelsen demonstreres for isoreserpin. Således, oppløses 30 mg isoreserpin i 2,7 ml metylenklorid og 0,3 ml
 35 etanol. Løsningen tilsettes til 27,0 ml humant serumalbuminløsning (1% vekt/volum). Blandingen homogeniseres i 5 minutter ved lav omdreiningshastighet (Vitris homogenizer, modell: Tempest I.Q.), med sikte på å danne en grov emulsjon, og

overføres deretter til en høytrykkshomogenisator (Avestin). Emulgeringen ble utført ved 62000-276000 kPa under resykling av emulsjonen i løpet av minst 5 sykluser. Det resulterende system ble overført til en rotasjonsfordamper, og metylenkloridet ble hurtig fjernet ved 40°C, ved redusert trykk (30 mm Hg), i løpet av 20-30 minutter. Den

5 resulterende dispersjon var gjennomskinnelig, og de resulterende paklitaksel partiklers typiske diameter var 90-110 nm (Z-gjennomsnitt, Malvern Zetasizer). Dispersjonen ble filtrert gjennom et 0,22 µm filter (Millipore).

Den sterile dispersjonen ble videre lyofilisert i løpet av 48 timer uten tilsats av noen

10 kryobeskytter. Den resulterende kake kunne med letthet rekonstitueres til den opprinnelige dispersjon ved tilsats av sterilt vann eller saltvann. Partikkelstørrelsen etter rekonstituering var den samme som før lyofilisering.

Eksempel 10

15

Anvendelse av et vannløselig løsningsmiddel alene, supermettet med virkestoff - ikke egnet for prosessen ifølge oppfinnelsen

30 mg taxol dispergeres i 0,6 ml etanol. Ved denne konsentrasjon (50 mg/ml), er taxolet ikke fullstendig løselig og danner en supermettet dispersjon. Dispersjonen tilsettes til

20 29,4 ml humant serumalbuminløsning (1% vekt/volum). Blandingen homogeniseres i løpet av 5 minutter ved lav omdreiningshastighet (Vitris homogenizer, modell: Tempest I.Q.), med sikte på å danne en grov dispersjon, og overføres deretter inn i en høytrykkshomogenisator (Avestin). Emulgeringen utføres ved 62000-276000 kPa under resykling av emulsjonen i løpet av minst 6 sykluser. Det resulterende system overføres

25 til en rotasjonsinndamper, og etanolen fjernes hurtig ved 40°C, ved redusert trykk (30 mm Hg), i løpet av 15-30 minutter. Den resulterende dispersjonspartikkelstørrelse er ekstremt bred, og spenner fra ca. 250 nm til flere µm.

Observasjonen under mikroskopet viste tilstedeværelsen av store partikler og typiske

30 nålformede krystaller av taxol. Disse partikler var for store for intravenøs injeksjon. Dette forsøk viser at anvendelsen av løsningsmidler slik som etanol som er fritt blandbare i vann i prosessen resulterer i dannelse av store partikler med meget bred partikkelstørrelsesfordeling og disse kan som sådan ikke benyttes alene for prosessen ifølge oppfinnelsen. Således ekskluderer prosessen spesifikt anvendelsen av

35 vannløselige løsningsmidler når de brukes alene for å løse opp eller dispergere virkestoffkomponenten. Prosessen krever at slike løsningsmidler, når de benyttes, må

blandes med idet vesentlige vannuløselige løsningsmidler for å tillate produksjon av nanopartiklene ifølge oppfinnelsen.

5 Eksempel 12

Bestemmelse av fysisk tilstand for paklitaksel i nanopartikkelform ved hjelp av røntgenpulverdifraksjon

Paklitakselråmaterialet foreligger vanligvis som nålformede krystaller av varierende
 10 størrelser, typisk mellom 5-500 μm . Tilstedeværelsen av krystaller i en virkestoffformulering for intravenøs injeksjon er selvfølgelig skadelig dersom krystaller foreligger i størrelse over noen få μm på grunn av den potensielle blokkering av kapillærer. Dessuten ville løseligheten av virkestoffkrystaller generelt være lavere enn for amorft virkestoff, hvilket senker biotilgjengeligheten av virkestoffet etter intravenøs
 15 administrering. Det er også kjent at i det innlastingen av virkestoffet i formuleringen økes, økes også tendensen til krystallisering. Således er det fordelaktig om formuleringen inneholder virkestoffet idet vesentlige i amorf form.

Røntgenpulverdifraksjon ble benyttet for å bestemme krystallinsk eller ikke-krystallinsk
 20 natur av paklitaksel i den lyofiliserte pulverformulering. De følgende prøver ble analysert: Prøve 1 – paklitakselpulver; Prøve 2 - lyofilisert serumalbumin; Prøve 3 - en fysisk blanding av paklitaksel og albumin; og Prøve 4 - formulert paklitaksel. Hver prøve ble røntgenbelyst fra 2° til 70° 2-tetavinkler ved anvendelse av CuK α -bestråling, en aksellererende spenning på 40 KeV/30 mA, en trappetrinnstørrelse på $0,05^\circ$ for 2-
 25 teta, og en dataanskaffelsestid på 2,0 sekunder pr. trinn. Prøve 1 viste sterke topper som er typiske for en krystallinsk prøve. Den mest intense paklitakseltopp ble lokalisert ved $5,1^\circ$ 2-teta. Prøve 2 viste brede pukler som er typiske for amorft materiale. Prøve 3 viste i store trekk de brede pukler fra prøve 2, men dessuten var toppen ved $5,1^\circ$ 2-teta for paklitaksel synlig. I prøve 4 viste den formulerte paklitaksel intet tegn på krystallinitet
 30 som er kjennetegnende for paklitaksel, og syntes identisk med prøve 2, noe som viser tilstedeværelsen av idet vesentlige amorft farmakologisk aktivt middel i den formulerte prøve.

Den amorfe egenskapen av de nanopartikler som ble fremstilt ifølge oppfinnelsen står i
 35 direkte kontrast til de produkter som er fremstilt ved andre fremgangsmåter som er beskrevet innen faget fremstilling av nanopartikler. Eksempelvis frembringer anvendelsen av oppmalingsteknikker, som beskrevet i U.S. patent 5,145,684 (Liversidge

et al.), og som beskrevet av Liversidge-Merisko et al., *Pharmaceutical Research*, 13(2):272-278 (1996), et idet vesentlige krystallinsk produkt.

Eksempel 13

5

Fremstilling av nanopartikler av cyklosporin (Capsorin I.V.) ved høytrykkshomogenisering

30 mg cyklosporin oppløses i 3,0 ml metylenklorid. Løsningen tilsettes deretter inn i 27,0 ml humant serumalbuminløsning (1% vekt/volum). Blandingen homogeniseres i 5 minutter ved lav omdreiningshastighet (Vitris homogenizer, modell: Tempest I.Q.) med sikte på å danne en grov emulsjon, og overføres deretter inn i en høytrykkshomogenisator (Avestin). Emulgeringen ble utført ved 62000-276000 kPa under resirkulering av emulsjonen i løpet av minst 5 sykluser. Det resulterende system ble overført inn i en Rotavap og metylenklorid ble hurtig fjernet ved 40°C, ved redusert trykk (30 mm Hg), i løpet av 20-30 minutter. Den resulterende dispersjonen var gjennomskinnelig og den typiske diameter av de resulterende syklosporinpartikler var 160-220 nm (Z-gjennomsnitt, Malvern Zetasizer).

Dispersjonen ble videre frysetørret i løpet av 48 timer, uten tilsats av noen kryobeskytter. Den resulterende kake kunne med letthet rekonstitueres til den opprinnelige dispersjon ved tilsats av sterilt vann eller saltvann. Partikkelstørrelsen etter rekonstituering var den samme som før lyofilisering.

Eksempel 14

25

Fremstilling av nanodråper av cyklosporin (Capsorin Oral) ved høytrykkshomogenisering

30 mg cyklosporin oppløses i 3,0 ml av en egnet olje (sesamolje som inneholder 10% appelsinolje). Løsningen tilsettes deretter inn i 27,0 ml humant serumalbuminløsning (1% volum/vekt). Blandingen homogeniseres i løpet av 5 minutter ved lav omdreiningshastighet (Vitris homogenizer, modell: Tempest I.Q.) med sikte på å danne en grov emulsjon, og overføres deretter inn i en høytrykkshomogenisator (Avestin). Emulgeringen utføres ved 62000-276000 kPa mens emulsjonen resykleres i løpet av minst 5 sykluser. Den resulterende dispersjonen hadde en typisk diameter på 160-220 nm (Z-gjennomsnitt, Malvern Zetasizer).

Dispersjonen kunne benyttes direkte eller frysetørres i løpet av 48 timer ved valgfri tilsats av en egnet kryobeskytter. Den resulterende kake kunne med letthet rekonstitueres til den opprinnelige dispersjon ved tilsats av sterilt vann eller saltvann.

5 B dannelse av nanopartikler ved sonikering

På tilsvarende måte som anvendelse av høyskjærhomogenisering antas anvendelse av sonikering å danne proteinbelagte nanopartikler av vannuløselige farmakologisk aktive stoffer som virker ved å kryssbinde proteiner gjennom dannelse av intermolekylære disulfidbindinger. Mange av fordelene i forhold til kjent teknikk fremkommet ved
10 høyskjærhomogeniseringsteknikker beskrevet ovenfor gjelder på samme måte for sonikeringsmetodene beskrevet nedenfor.

Med hensyn på de organiske løsningsmidler, proteiner og ikke-protein polymerer som
15 kan anvendes i sonikeringsmetodene, henvises til de komponenter beskrevet ovenfor med hensyn på høyskjærhomogeniseringsmetoden. Alle de samme komponentene er forventet å virke like godt i begge metodene.

Dette aspektet ifølge oppfinnelsen vil nå bli beskrevet i større detalj med henvisning til
20 de følgende ikke-begrensede eksempler

Eksempel 15

Formulering for inhallasjon av anti-astmatisk virkestoff

25 Anti-astmatiske farmasøytika har vært fremstilt ved anvendelse av mikropartikkelteknikker for å gi virksomme formuleringer for tørrpulver-inhallatorer (DPI). Ved å starte med et steroidalt virkestoff (eksempelvis beklometason, beklometasondipropionat, budesonid, deksametason, flunisolid, triamcinolonacetamid, og lignende), fremstilles det en tørr formulering av egnet partikkelstørrelse og
30 frigjøringssegenskaper for å sikre effektiv tilførsel i luftveisystemet.

Formuleringen fremstilles ved anvendelse av sonikeringsteknikker, eller homogenisering, hvori det aktive virkestoff, oppløst i løsningsmiddel, dispergeres inn i en vandig proteinløsning til dannelse av en emulsjon av nanopartikler. Denne
35 emulsjonen inndampes deretter til fjerning av løsningsmidler, slik at det aktive virkestoff etterlates belagt med protein i løsningen. Denne flytende prøve som inneholder de kolloidale virkestoffpartikler måles ved Malvern Zetasizer og gir en Z-

gjennomsnittlig størrelse på 260 nm. I en foretrukken utførelsesform, er størrelsesområdet for disse kolloidale partikler ca. 50-1000 nm og helst ca. 70-400 nm.

I væske i denne form, kan andre eksipienser oppløses. Slike eksipienser inkluderer (men er ikke begrenset til) mannitol 0,5-15%, laktose 0,1-5%, og maltodekstrin. På dette trinn, kan den resulterende løsning av aktivt virkestoff, protein og eksipiens enten sprøytetørkes eller lyofiliseres og males for å gi et tørt pulver. Etter sprøytetørring, bestemmes den tørre partikkelstørrelse ved Malvern Mastersizer som D (v.0,5) på ca. 1-10 µm. Det foretrukne størrelsesområdet for disse partikler er 0,5-15 µm, med et mer foretrukket område på 0,7-8 µm.

Dette sprøytetørkede pulver ble deretter blandet med et eksipiensbærende pulver. Igjen er flere bærere tilgjengelige, inklusive laktose, trehalose, Pharmatose 325 M, sukrose, mannitol og lignende. Størrelsen på det bærende pulver er signifikant større enn det for de formulerte virkestoffpartikler (~63-90 µm for laktose, 40-100 µm for Pharmatose).

Effektiviteten av den tørre pulverformulering er demonstrert ved testing med en Andersen åttetrinns kaskadeimpaktor. Resultater av impaktorforsøk viser en fin partikkelfraksjon (FPF) på ~60%. Dette indikerer en i høy grad effektiv frigjøring av partikler, som har egnet størrelse for respiratorisk deponering. Denne FPF er overraskende høy og er et resultat av den formuleringssammensetning som inneholder kolloidale nanopartikler av virkestoffet innen større formuleringspartikler.

Denne formulering viser anvendeligheten av mikropartikkel- og sprøytetørringsteknikker i bearbeidingen i sammensetningen av tørre pulverformuleringer for aerosoltilførsel via DPI. De høye FPF-resultater som er vist indikerer en effektiv og løfterik tilnærming til DPI-formuleringer.

Eksempel 16

30

Oppsummering av den for tiden foretrukne fremstillingsprosess:

Oppstart med 1 g paklitaksel som BDS

Fremstill en 3% HSA-løsning. Til 51,7 ml 25% albutein tilsett 379,3 ml vann for injeksjon. Bland grundig og filtrer løsningen gjennom et 0,22 µm Nalgen engangsfilter.

35 Oppbevar ved 4°C frem til bruk.

Vei ut 1,0 g paklitaksel i en glassflaske. Kombiner CHCl_3 og etylalkohol i egnede proporsjoner i et hetteglass. Bland godt. Tilsett 13,33 ml av kloroform/etylalkoholblandingen til paklitaksel. Agiter for å sikre at all paklitaksel oppløses i løsningen. Filtrer løsningen gjennom et 0,22 μm sterilt Teflon-filter og samle
5 opp i en steril glassflaske.

Tilsett HSA-løsningen til den oppløste paklitakselløsning i glassflasken. Benytt SENTRY Microprocessor mikser for å mikse paklitaksel/HSA-løsningen. Når løsningen er mikset, tøm innholdet over i homogenisatorens kammer. Sykler blandingen gjennom
10 homogenisatoren et trykk inntil den ønskede partikkelstørrelse er oppnådd. Oppsamle den homogeniserte prøve i en steril Kontes rundkolbe.

Fest kolben med den endelige prøve til rotasjonsfordamperen. Sett på vakuomet og rotasjonen til maksimum i rotasjonsfordamperen, og damp inn det organiske
15 løsningsmiddel. Dette resulterer i den kolloidale løsning av paklitaksel i human albumin. Spar ~3 ml av denne rotasjonsinndampede prøve for analyse av partikkelstørrelse.

Filtrer under en steril hette den kolloidale løsning ved anvendelse av sterilt 0,45/0,2 μm filter og samle opp i et sterilt mottakende kar. Spar ~3 ml filtrert prøve for analyse ved
20 HPLC med hensyn til paklitakselkonsentrasjon.

Bestem fyllvolumet til oppnåelse av 30 mg (eller annen avledet mengde) paklitaksel pr. hetteglass. Fyll den sterile filtrerte prøve over på autoklaverte 30 ml Wheaton hetteglass med ca. 17 ml på hvert (basert på analyse). Lukk hetteglassene med autoklaverte
25 Wheaton serum hetteglasskorker. Hvert hetteglass bør inneholde ca. 30 mg paklitaksel.

Lyofiliser prøvene i FTS System Stoppering tray lyophilizer ved anvendelse av en forutbestemt lyofiliseringssyklus. Etter at prøvene har blitt lyofilisert, kort igjen
30 hetteglassene og tett hetteglassene ved å kreppe dem med 20 mm Wheaton aluminium avrivningshetter. Etiketter prøvene på egnet måte. Hele prosessen utføres i et miljø med rent rom under aseptiske betingelser.

De lyofiliserte prøver inneholder restløsning ved nivåer på <1000 ppm, og heller <500
35 ppm, eller endog <100 ppm.

Endelig sterilt produkt-filtrering: Etter fjerning av løsningsmidlet ved inndamping, sterilfiltreres den kolloidale løsning av paklitaksel i kolben gjennom en kombinasjon av 0,45/0,2 µm steriliseringsfilter. Den filtrerte løsning oppsamles i et sterilt beger og sterilfylles over i 30 ml hetteglass. Hetteglassene plasseres deretter i lyofilisatoren. Etter
5 fullføring av lyofiliseringssyklusen dekkes hetteglassene med tørr steril nitrogengass og korkes under nitrogenteppet.

Det skal bemerkes at høytrykkshomogeniseringsprosesser benyttes for å rive og drepe bakterier og andre celler for å ekstrahere deres innhold.

Eksempel 17Dannelse av proteinskall inneholdende olje

3 ml av et USP (United States Pharmacopia) 5% humant serumalbuminløsning (Alpha
 5 Therapeutic Corporation) ble tatt over i et sylinderisk kar som kunne festes til en
 sonikeringsprobe (Heat Systems, Model XL2020). Albuminløsningen ble overlagt med
 6,5 ml av USP-grad soyabønneolje (soyaolje). Tuppen av sonikatorproben ble bragt til
 grenseflaten mellom de to løsninger og dette oppsett ble opprettholdt i et kjølede bad
 ved 20°C. Systemet ble tillatt å komme i likevekt og sonikatorens ble slått på i 30
 10 sekunder. Kraftig miksing opptrådte og en hvit melkeaktig suspensjon fremkom.
 Suspensjonen ble fortynnet 1:5 med normalt saltvann. En partikkelteller (Particle Data
 Systems; Elzone, Modell 280 PC) ble benyttet for å bestemme størrelsesfordeling og
 konsentrasjon av oljeholdige proteinskall. De resulterende proteinskall ble bestemt å ha
 en maksimal tverrsnittsdimensjon på ca. $1,35 \pm 0,73 \mu\text{m}$, og den totale konsentrasjon ble
 15 bestemt til å være $\sim 10^9$ skall/ml i den opprinnelige løsning.

Som en kontroll, dannet de ovenstående komponenter, som var fraværende i proteinet,
 ikke en stabil mikroemulsjon når de ble underlagt ultrasonisk bestråling. Dette resultat
 antyder at proteinet er essensielt for dannelsen av mikrokuler. Dette bekreftes av
 20 scannende elektronfotografering og studier med transmissjons-elektronfotografering
 som beskrevet i det følgende.

Eksempel 1825 Fremstilling av polymere skall som inneholder oppløst paklitaksel

Paklitaksel ble oppløst i USP-grad soyaolje ved en konsentrasjon på 2 mg/ml. 3 ml av
 USP 5% humant serumalbuminløsning ble tatt over i et sylinderisk kar som kunne festes
 til en sonikeringsprobe. Albuminløsningen ble overlagt med 6,5 ml soyaolje/taxol-
 løsning. Tuppen på sonikatorproben ble bragt til grensesnittet mellom de to løsninger og
 30 oppsettet ble holdt i likevekt og sonikatorens slått på i 30 sekunder. Kraftig miksing
 opptrådte og stabil hvit melkeaktig suspensjon fremkom som inneholdt polymere skall
 med proteinvegger som innelukket olje/taxol-løsningen.

For å kunne oppnå en høyere innlastning av virkestoff inn i det tverrbundne proteinskall,
 35 kan et gjensidig løsningsmiddel for oljen og virkestoffet (hvor virkestoffet har en
 betydelig høyere løselighet) blandes med olje. Forutsatt at dette løsningsmiddel er
 forholdsvis ugiftig (eksempelvis etylacetat), kan det injiseres sammen med den

opprinnelige bærer. I andre tilfeller, kan den fjernes ved inndamping av væsken under vakuum etter fremstilling av de polymere skall.

Det erkjennes at flere ulike fremgangsmåter kan benyttes til oppnåelse av de fysikalske kjennetegn for formuleringen ifølge oppfinnelsen. De biologiske egenskaper som henger sammen med denne formulering med høyere lokale konsentrasjoner i spesifikke organpunkter (prostata, lunge, bukspyttkjertel, ben, nyre, hjerte) såvel som lavere giftigheter (øket LD₅₀, minsket myelosuppresjon, minsket cerebral giftighet) som henger sammen med høyere effektiviteter er uavhengig av fremgangsmåten for fremstilling.

10

Eksempel 19

Fremstilling av nanopartikler ved sonikering

20 ml paklitaksel oppløses i 1,0 ml metylenklorid. Løsningen tilsettes til 4,0 ml humant serumalbuminløsning (5% vekt/volum). Blandingen homogeniseres i 5 minutter ved lav omdreiningshastighet (Vitris homogenizer, modell: Tempest I.Q.) med sikte på å danne en grov emulsjon, og overføres deretter over i en 40 kHz sonikatorcelle. Sonikeringen utføres ved 60-90% effekt ved 0° i 1 minutt (550 Sonic Dismembrator). Blandingen overføres over i en rotasjonsfordamper, og metylenklorid fjernes hurtig ved 40°C, ved redusert trykk (30 mm Hg), i løpet av 20-30 minutter. Den typiske diameter på de resulterende paklitaksel-partikler var 350-420 nm (Z-gjennomsnitt, Malvern Zetasizer).

Dispersjonen ble videre lyofilisert i løpet av 48 timer uten tilsats av noen kryobeskytter. Den resulterende kake kunne med letthet rekonstitueres til den opprinnelige dispersjon ved tilsats av sterilt vann eller saltvann. Partikkelstørrelsen etter rekonstituering var den samme som før lyofilisering.

Eksempel 20

In vivo biodistribusjon av tverrbundne proteinskall inneholdende en fluorofor

For å bestemme opptaket og biodistribusjonen av væske som er fanget inne i polymere proteinskall etter intravenøs injeksjon, ble et fluorescerende fargestoff (rubren, tilgjengelig fra Aldrich) fanget inne sammen med et polymert humant serumalbumin (HSA) proteinskall og benyttet som en markør. Således ble rubren oppløst i toluen, og albuminskall som inneholdt toluen/rubren ble fremstilt som beskrevet i det foregående ved ultrasonisk bestråling. Den resulterende melkeaktige suspensjonen ble fortynnet 5 ganger i normalt saltvann. 2 ml av den fortynnede suspensjonen ble deretter injisert inn i

en rottes halevene i løpet av 10 minutter. Et dyr ble avlivet 1 time etter injeksjon, og et annet 24 timer etter injeksjon.

100 µm frosne snitt av lunge, lever, nyre, milt og benmarg ble undersøkt under et fluorescerende mikroskop med hensyn til tilstedeværelsen av polymert skallinnfanget fluorescerende fargestoff eller frigjort fargestoff. Etter 1 time syntes hoveddelen av de polymere skall å være intakte (dvs. fremkom som klart fluorescerende partikler på ca. 1 µm diameter) og var lokalisert i lungene og leveren. Etter 24 timer, ble fargestoffet observert i leveren, lungene, milten og benmargen. En generell farging av vevet ble også observert, noe som indikerer at de polymere skalls skallvegger hadde blitt fordøyet, og fargestoff frigjort fra innsiden. Dette resultat var konsistent med forventninger og viser den potensielle anvendelsen av preparater ifølge oppfinnelsen for forsinket eller kontrollert frigjøring av et innfanget farmasøytisk middel slik som taxol.

15 Eksempel 21

Giftighet av polymere skall som inneholder soyaolje (SBO)

Polymere skall som inneholdt soyaolje ble fremstilt som beskrevet i eksempel 15. Den resulterende suspensjonen ble fortynnet i normalt saltvann til frembringelse av to ulike løsninger, en som inneholdt 20% SBO og den annen inneholdt 30% SBO.

Intralipid, et kommersielt tilgjengelig TPN-middel, inneholder 20% SBO. LD₅₀ for intralipid i mus er 120 ml/kg, eller ca. 4 ml for en 30 g mus, når det injiseres 1 ml/min.

25 To grupper mus (tre mus i hver gruppe; hver mus veide ca. 30 g) ble behandlet med preparatet ifølge oppfinnelsen som inneholdt SBO som følger. Hver mus ble injisert med 4 ml av den preparerte suspensjonen av SBO-holdige polymere skall. Hvert medlem av en gruppe mottok den suspensjon som inneholdt 20% SBO, mens hvert medlem av den annen gruppe mottok den suspensjon som inneholdt 30% SBO.

30

Alle tre mus den mus som mottok den suspensjon som inneholdt 20% SBO overlevde slik behandling, og fremviste ingen omfattende giftighet i noen vev eller organer ved observasjon 1 uke etter SBO-behandling. Bare en av de tre mus i den gruppe som mottok suspensjonen inneholdende 30% SBO døde eller injeksjon. Disse resultater viser klart at olje som rommes innen polymere skall ifølge oppfinnelsen ikke er giftig ved dens LD₅₀-dose, som sammenlignet med en kommersielt tilgjengelig SBO-formulering (Intralipid). Denne effekt kan tillegges den langsomme frigjøring (dvs. blir

biotilgjengelig med kontrollert hastighet) av oljen fra inne i det polymere skall. Slik langsom frigjøring forhindrer oppnåelsen av en dødelig dose olje, i kontrast med de høye oljedoser som oppnås med kommersielt tilgjengelige emulsjoner.

5 Eksempel 22

In vivo biotilgjengelighet av soyaolje som frigjøres fra polymere skall

En test ble utført for å bestemme den langsomme eller vedholdende frigjøring av materialet lukket inne i polymert skall etter injeksjon av en suspensjon av polymere skall inn i rotters blodstrøm. Polymere skallvegger av tverrbundet protein (albumin) inneholdende soyaolje (SBO) ble fremstilt ved sonikering som beskrevet i det foregående. Den resulterende suspensjonen av oljeholdige polymere skall ble fortynnet i saltvann til en endelig suspensjon som inneholdt 20% olje. 5 ml av denne suspensjonen ble injisert inn i rotters kanylerete eksterne halsåre i løpet av en periode på 10 minutter.

15 Blod ble oppsamlet fra disse rotter ved flere tidspunkter etter injeksjonen og nivået av triglyserider (soyaolje er hovedsakelig triglyserid) i blodet ble bestemt ved rutineanalyse.

5 ml av en kommersielt tilgjengelig fettemulsjon (Intralipid, et vandig parenteralt næringsmiddel - som inneholdt 20% soyaolje, 1,2% eggeplomme-fosfolipider, og 2,25% glyserin) ble benyttet som en kontroll. Kontrollen benytter egg-fosfatid som emulgator for å stabilisere emulsjonen. En sammenligning av serumnivåene for triglyseridene i de to tilfeller vil gi en direkte sammenligning av biotilgjengeligheten av oljen som en funksjon av tid. I tillegg til suspensjonen av polymere skall som inneholdt 20% olje, ble

25 5 ml av en prøve av oljeholdige polymere skall i saltvann ved en sluttkonsentrasjon på 30% olje også injisert. 2 rotter ble benyttet i hver av de tre grupper. Blodnivåene for triglyserider i hvert tilfelle er tabulert i tabell 1, og oppgitt i enheter på mg/dl.

Tabell 1

30

GRUPPE	SERUMTRIGLYSERIDER (mg/dl)					
	Pre	1 time	4 timer	24 timer	48 timer	72 timer
Intralipidkontroll (20% SBO)	11,4	941,9	382,9	15,0	8,8	23,8
Polymere skall (20% SBO)	24,8	46,7	43,8	29,3	24,2	43,4
Polymere skall						

(30% SBO)	33,4	56,1	134,5	83,2	34,3	33,9
-----------	------	------	-------	------	------	------

Blodnivåer før injeksjon er vist i den kolonne som er markert "Pre". For intralipidkontrollen, er det klart at meget høye triglyseridnivåer kan ses å følge etter injeksjon. Triglyseridnivåer kan deretter ses å ta ca. 24 timer for å nå ned til nivåer før
 5 injeksjon. Således ses oljen å være umiddelbart tilgjengelig for metabolisering etter injeksjon.

Suspensjonen av oljeholdige polymere skall som inneholder den samme mengde total olje som intralipid (20%) viser en dramatisk forskjellig tilgjengelighet når det gjelder
 10 påvisbart triglyserid i serum. Nivået heves til omtrent to ganger dens normalverdi og holdes på dette nivå i mange timer, noe som indikerer en langsom eller vedholdende frigjøring av triglyserid inn i blodet ved nivåer som er forholdsvis nær til normalen. Den gruppe som mottar oljeholdige polymere skall med 30% olje viser et høyere nivå av triglyserider (ledsagende den høyere administrerte dose) som faller til normalt innen 48
 15 timer. En gang igjen ble blodnivåene av triglyserid ikke hevet astronomisk i denne gruppe, sammenlignet med den kontrollgruppe som mottok intralipid, Dette indikerer igjen den langsomme og vedholdende tilgjengelighet av oljen fra preparatet ifølge oppfinnelsen, hvilket har fordelene med å unngå farlig høye blodnivåer av materialet som rommes innen de polymere skall og tilgjengelighet ved akseptable nivåer i løpet av
 20 en forlenget periode. Det er klart at virkestoffer som leveres innen polymere skal ifølge den foreliggende oppfinnelse ville oppnå disse samme fordeler.

Et slikt system med soyaoljeholdige polymere skall kunne suspenderes i en vandig løsning av aminosyre, essensielle elektrolytter, vitaminer og sukker til dannelsen av et
 25 samlet parenteralt næringsmiddel (TPN). Et slikt TPN kan formuleres fra for tiden tilgjengelige fettemulsjoner (eksempelvis Intralipid) på grunn av emulsjonens ustabilitet i nærvær av elektrolytter.

Eksempel 23

30

Fremstilling av proteinveggede polymere skall inneholdende en fast kjerne av farmasøytisk aktivt middel

En annen fremgangsmåte for å tilføre et svakt vannløselig virkestoff slik som taxol innen et polymert skall er å fremstille et skall av polymert materiale rundt en fast
 35 virkestoffkjerne. En slik "proteinbelagt" virkestoffpartikkel kan oppnås som følger. Den prosedyre som beskrives i eksempel 16 gjentas ved anvendelse av et organisk

løsningsmiddel for å oppnå taxol i en forholdsvis høy konsentrasjon. Løsningsmidler som generelt benyttes er organiske, slik som benzen, toluen, heksan, etyleter, kloroform, alkohol og lignende. Polymere skall frembringes som beskrevet i eksempel 15. 5 ml av den melkeaktige suspensjonen av polymere skall som inneholder oppløst taxol fortynnes
 5 til 10 ml i normalt saltvann. Denne suspensjonen plasseres i en rotasjonsfordamper og det flyktige organiske stoff fjernes ved vakuum. Den resulterende suspensjonen undersøkes under et mikroskop for å vise opake kjerner, som indikerer fjerning av idet vesentlige alt organisk løsningsmiddel, og tilstedeværelsen av fast taxol. Suspensjonen kan fryses og lagres over ubestemt tid og benyttes direkte eller lyofiliseres på et senere
 10 tidspunkt.

Alternativt, frysetørres de polymere skall med kjerner av organisk løsningsmiddelholdige oppløst virkestoff til oppnåelse av et tørt smuldrende pulver som kan resuspenderes i saltvann (eller annen egnet væske) ved tidspunktet for anvendelse.
 15 Selv om det for tiden foretrukne protein for anvendelse i dannelsen av det polymere skall er albumin, kunne andre proteiner slik som α -2-makroglobulin, et kjent opsonin, benyttes for å forbedre opptak av de polymere skall ved hjelp av makrofagliggende celler. Alternativt, kunne molekyler i likhet med PEG inkorporeres i partiklene til frembringelse av et polymert skall med økt sirkulasjonstid *in vivo*.

20

C. Dannelse av nanopartikler ved spontan mikroemulsjon

Det er også mulig å danne nanopartikler uten anvendelse av sonikering, sterkt skjærende homogenisering eller annen høyenergiteknikk. Således er det mulig å danne en suspensjon (eller et tørt pulver) av idet vesentlige rent virkestoff om ønsket.

25

En mikroemulsjon er et termodynamisk stabilt emulsjonssystem som dannes spontant når alle dens komponenter bringes i kontakt, i fravær av anvendelsen av sterkt skjærende utstyr eller annen substansiell agitering. Mikroemulsjoner er idet vesentlige ikke opake, dvs. de er gjennomsiktige eller gjennomskinnelige. Mikroemulsjoner omfatter en
 30 dispergert fase, hvori den typiske dråpestørrelse er under 1000 Ångstrøm (Å), derav deres optiske gjennomsiktighet. Dråpene i mikroemulsjonen er typisk kuleformede, selv om andre strukturer slik som langstrakte sylindere er mulige. (For ytterligere diskusjon, se eksempelvis Rosof, *Progress in Surface and Membrane Science*, 12:405, Academic Press (1975), Friberg S., *Dispersion Science and Technology*, 6:317 (1985)).

35

Slik det skal vises i det følgende, benytter den foreliggende oppfinnelse de unike kjennetegn ved mikroemulsjonen som et første skritt henimot oppnåelse av ekstremt små nanopartikler, etter fjerning av oljefasen.

- 5 Som beskrevet tidligere, kan mikropartikler og nanopartikler dannes ved hjelp av forskjellige prosesser, deriblant løsningsmiddelinn dampingsmetoden. Denne metode er i prinsipp basert på dannelse av en enkel olje i vann-emulsjon, i nærvær av et overflateaktivt middel, ved påføring av sterke skjærkrefter ved hjelp av ulikt utstyr slik som rotor-statormiksere, sonikatorer, høytrykkshomogenisatorer, kolloidmøller, etc.
- 10 Etter dannelse av slik emulsjon, som inneholder en polymer og et virkestoff som er oppløst i de dispergerte oljedråper, fjernes oljefasen ved inndamping, typisk ved redusert trykk og forhøyet temperatur, og mikropartikler eller nanopartikler av det oppløste virkestoff og polymer dannes. Det er opplagt at størrelsen på partiklene er avhengig av emulsjonsdråpens størrelse; desto mindre dråper, desto mindre resulterende
- 15 partikler. Mindre emulsjonsdråper kan oppnås utelukkende ved å tilføre meget høy energi, og selv da, ved anvendelse av de mest avanserte høytrykkshomogenisatorer slik som Microfluidizer, er det praktisk ikke mulig å oppnå emulsjonsdråper på under 75 nm. Siden emulsjoner er iboende ustabile systemer, og gjennomgår prosesser slik som aggregering og dråpefortetning, kan løsningsmiddelinn dampingsprosessene for slike
- 20 emulsjoner resultere i større partikler.

Den nye metode, som overvinner problemene som henger sammen med anvendelse av løsningsmiddelinn dampingsmetoden i konvensjonelle emulsjoner, består av de følgende trinn:

- 25 a. Oppløsning av det vannuløselige virkestoff i et løsningsmiddel som har lav løselighet i vann, og har høyere damptrykk enn vann. Virkestoffet oppløses uten noe ytterligere polymert bindemiddel, selv om slikt bindemiddel i prinsipp kan foreligge.
- 30 b. Blanding av løsningsmidlet med en egnet surfaktant(er) og en vannløselig kosurfaktant(er).
- c. Tilsats av en egnet mengde vann eller vandig løsning til denne blanding, slik at det spontant dannes en mikroemulsjon olje i vann, uten anvendelse av noe sterkskjærende
- 35 utstyr. Den vandige løsning kan inneholde elektrolytter, aminosyrer eller annet additiv som kan påvirke dannelsen av mikroemulsjonen i løpet av det første fremstillingstrinn.

d. Valgfri tilsats av en proteinløsning til mikroemulsjonen.

e. Fjerning av løsningsmidlet ved inndamping under redusert trykk, slik at det forårsakes utfelling av virkestoffet i form av ekstremt små amorfe nanopartikler, med en typisk størrelse under 1000 Å. Partiklene er på dette stadium dispergert og stabilisert i et vandig medium som inneholder surfaktant, kosurfaktant og valgfritt beskyttende midler slik som proteiner, sukker etc. Akseptable fremgangsmåter for inndamping inkluderer anvendelse av rotasjonsfordampere, fallende film-fordampere, sprøytetørkere, frysetørkere, og annet vanlig forekommende inndampingsutstyr som typisk benyttes i industri.

f. Valgfritt kan man fjerne surfaktanten og kosurfaktanten ved dialyse, ultrafiltrering, adsorpsjon etc., for således å oppnå nanopartikler som er stabilisert av proteinet .

g. Etter inndamping av løsningsmidlet, kan den flytende dispersjonen av nanopartikler tørkes til oppnåelse av et pulver som inneholder det farmakologiske middel og valgfritt protein, hvilket kan redispergeres inn i et egnet vandig medium slik saltvann, buffer, vann og lignende, til oppnåelse av en suspensjon som kan administreres til et levende individ, med en partikkelstørrelse under 1000 Å. Akseptable fremgangsmåter til oppnåelse av dette pulver er ved frysetørring, sprøytetørring og lignende. Dersom konverteringen til en fast form utføres ved lyofilisering, kan forskjellige kryobeskyttere tilsettes, slik som mannitol, laktose, albumin, karboksymetylcellulose, polyvinylpyrrolidon, maltodekstrin og/eller polyetylen glykol.

Disse nanopartikler kan videre blandes med ytterligere eksipienser eller matriksdannende materialer, med sikte på å oppnå et virkestofftilførselssystem med høy biotilgjengelighet, egenskaper med kontrollert frigjøring, og beskyttelse i magesaft. Sluttproduktet kan introduseres til pattedyret i form av en tablett, kapsel, rekonstituert væske eller lignende.

Formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelse har signifikante fordeler sammenlignet med tidligere benyttede fremgangsmåter til fremstilling av nanopartikler og mikropartikler og anvendelsen av mikroemulsjoner eller "pre-mikroemulsjonskonsentrat".

Det oppnås mange fordeler ved anvendelse av prosessen ifølge oppfinnelsen. Mikroemulsjonen dannes spontant, dersom de egnede komponenter velges, og det

foreligger ikke noe behov for kostbart utstyr og energitilgang. Dråpestørrelsen er ca. en størrelsesorden mindre enn de minste emulsjonsdråper som oppnås ved sterkt skjærende utstyr, og derfor kan ekstremt små nanopartikler oppnås. Mikroemulsjonen er termodynamisk stabil, og derfor forhindres unngås de vanlige problemer som henger sammen med emulsjonsustabilitet (og således en tidsavhengighet når det gjelder størrelsen på de resulterende partikler). Prosessen er samlet sett meget enklere enn den konvensjonelle fremgangsmåte med inndamping av emulsjonens løsningsmiddel, og mindre følsom overfor ulike parametere. Siden utelukkende enkel miksing er involvert i prosessen, er oppskalering til store produksjonsvolumer meget enkel, sammenlignet med emulgering med utstyrt slik som en sterkt skjærende homogenisator. Siden den partikkelstørrelse som oppnås ved den nye prosess er så liten, en størrelsesorden mindre enn porestørrelsen for membraner som benyttes til sterilfiltrering, er steriliseringsprosessen meget effektiv, uten problemer som henger sammen med membranblokkering, slik som økt filtreringstrykk og høyt trykktap i løpet av filtreringsprosessen. Siden det ikke foreligger noen sterkt skjærende krefter i emulgeringsprosessen, er det ingen økning i temperatur i løpet av emulgeringen, og derfor kan selv temperaturfølsomme virkestoffer bearbeides ved hjelp av den nye fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Virkestoffet i den flytende formulering ifølge den foreliggende oppfinnelse har økt kjemisk stabilitet, på grunn av at det inneholder dispergerte nanopartikler sammenlignet med konvensjonelle mikroemulsjoner som inneholder dispergerte nanodråper, dvs. mer kjemiske reaksjoner kan finne sted i væsketilstand (mikrodråpe) versus fast tilstand (nanopartikkel). Den foreliggende oppfinnelse har økt kjemisk stabilitet som en tørr formulering sammenlignet med konvensjonelle mikroemulsjoner som er væsker som den kontinuerlige mikroemulsjonsfase. Den faste formulering muliggjør inklusjon av virkestoffet i forskjellige faste doseringsformer, slik som tabletter, granuler og kapsler, sammenlignet med konvensjonelle mikroemulsjoner eller "pre-mikroemulsjonskonsentrater", hvilke foreligger i en flytende form. Den meget smale størrelsesfordeling, kombinert med meget lav gjennomsnittlig partikkelstørrelse, sikrer økt adsorpsjon av virkestoffet, på en måte som er mer ensartet enn mikropartikler og nanopartikler som fremstilles ved konvensjonelle fremgangsmåter, således forventes økt biotilgjengelighet.

Selv om de eksempler som presenteres i det følgende avsnitt dreier seg om to vannuløselige molekyler, vil de farmakologiske midler som siktes mot å være egnede til fremstilling av nanopartikler inkludere men er ikke begrenset til virkestoffer, diagnostiske midler, midler av terapeutisk verdi, næringsmidler og lignende. En ikke begrensede liste over virkestoffkategorier og forbindelser inkluderer, men er ikke

begrenset til alle de forbindelser som er opplistet i det foregående for anvendelse i det sterkt skjærende homogeniseringsaspekt ifølge oppfinnelsen.

De løsningsmidler som er beskrevet i de følgende eksempler er toluen og butylacetat, imidlertid vil et hvert løsningsmiddel som er i stand til å oppløse det påkrevde virkestoff være egnet for anvendelse i prosessen ifølge oppfinnelsen, forutsatt at en egnet mikroemulsjon kan dannes forut for fjerning av løsningsmidlet. Slike løsningsmidler kan være kloroform, metylenklorid, etylacetat, butylacetat, isobutylacetat, propylacetat, tert-butylmetyleter, butanol, propylenglykol, heptan, anisol, kumen, etylformatetanol, propanol, tetrahydrofuran, dioksan, acetonitril, aceton, dimetylsulfoksid, dimetylformamid, metylpyrrolidinon, soyaolje, kokosolje, lakserolje, olivenolje, saflorolje, bomullsfrøolje, alkoholer C1-C20, estere C2-C20, ketoner C3-C20, polyetylenglykoler, alifatiske hydrokarbener, aromatiske hydrokarboner, halogenerte hydrokarboner, d-limonen, kombinasjoner derav, og lignende.

Proteinet (eller en blanding av flere proteiner) som benyttes i denne prosess bør være slike som ikke utfelles i løpet av den innledningsvise miksing eller i løpet av inndampingstrinnet. Det foreligger mange slike proteiner, inklusive albuminer (eksempelvis BSA, HSA, egg), gelatin, kollagen, IgG, forskjellige enzymer, laktoglobulin, kasein, soyaproteiner, og lignende.

De surfaktanter som benyttes i denne oppfinnelse bør være i stand til å spontant danne olje-i-vann-mikroemulsjoner, i nærvær av en egnet kosurfaktant og løsningsmiddel, uten å forårsake utfelling av virkestoffet eller proteinet (om det foreligger). Surfaktantene kan være nonioniske (Tween, Span, Triton, Pluronic, polyglyserolestere, og lignende), anioniske (SDS, kolater og deoksykolater, fettsyresåper, og lignende), kationiske (cetyltrimetylammoniumklorid, og lignende) eller zwitterioniske (lecitin, aminosyrer og lignende).

Kosurfaktanten bør ha evnen til spontant å danne mikroemulsjoner med de valgte surfaktanter, uten å forårsake utfelling av de oppløste virkestoffmolekyler (eller protein, om tilstede), og uten å indusere dannelse av stort krystallinsk materiale. Kosurfaktantene kan være enten vannløselige eller oljeløselige, slik som butanol, propylenglykol, benzylalkohol, propanol og lignende.

Konverteringen av den flytende dispersjon av nanopartiklene via lyofilisering kan kreve tilsats av kryobeskyttende midler, slik som mannitol, laktose, aminosyrer, proteiner, polysakkarider og lignende.

- 5 Det er klart at de prinsipper som er beskrevet i den foreliggende oppfinnelse kan benyttes i flere variasjoner av prosessen, eksempelvis:

1. Dannelsen av virkestoffpartiklene kan induseres ved fortynning av mikroemulsjonen i et egnet løsningsmiddel, hvori løsningsmidlet er ikke blandbart. Eksempelvis, dersom
10 løsningsmidlet har en lav løselighet i vann, ville det være mulig å fortynne mikroemulsjonen i en slik grad at løsningsmidlet ville befinne seg under sin løselighetsgrense i vann.

2. Løsningsmidlet og valgfritt surfaktanten og kosurfaktanten kan fjernes ved
15 anvendelse av en selektiv ekstraktant som ikke oppløser virkestoffet.

3. Surfaktanten og kosurfaktanten kan fjernes ved ultrafiltrering, ved anvendelse av filtere med en avskjæring under den for proteinets MW. Enkel dialyse er også en valgmulighet.
20

4. Formuleringen kan inneholde utelukkende komponenter som er akseptable for den tilsiktede anvendelse av den ferdige formulering (enten den er oral, IV, topisk, etc.), således foreligger det ikke noe behov for fjerning av disse.

25 5. På lignende måte, kan kosurfaktanter som kan forbli i det ferdige produkt, slik som glyserol, benzylalkohol, etc., benyttes.

6. Tilsatsen av forskjellige vannløselige molekyler som kan påvirke mikroemulsjonens fasediagram (elektrolytter, etanol etc.) er mulig, slik at forholdet mellom de forskjellige
30 komponenter styres til å gi den optimale virkestofflast.

7. Det spontane emulgeringstrinn kan utføres ved en temperatur utover romtemperaturen, med sikte på å virke fasediagrammet (og de komponentproporsjoner som fører til dannelse av en mikroemulsjon). Særsilt kunne det være mulig å benytte
35 temperatureffekten (i etoksylerte surfaktanter) for å endre systemet fra en olje-i-vann- til en vann-i-olje-mikroemulsjon.

8. Det er mulig å tilsette andre komponenter til løsningsmiddelfasen, med sikte på å påvirke virkestoffets biotilgjengelighet. Særsilt, foretrekkes tilsats av en olje slik som soyaolje, for å forbedre oral adsorpsjon, og å beskytte virkestoffet fra kjemisk og enzymatisk degradering.

5

9. På lignende måte, kan tilsatsen av en matriksdannende polymer (slik som PVP) til løsningsmidlet, sammen med virkestoffet, gjennomføres.

10. Egenskapene for stabilisering og fast form kan endres ved tilsatsen av en vannløselig polymer utover proteinet (CMC, gums og lignende) til mikroemulsjonens eksterne vandige fase.

11. Strømningsegenskapene for det resulterende pulver i fast form kan endres ved tilsats av kolloidale partikler (eksempelvis silika) som et fyllstoff, eller tilsats av hjelpemidler for rekonstituering/antiagglomerering.

12. De samme prinsipper som er beskrevet i den foreliggende oppfinnelse kan benyttes til dannelse av vannløselige partikler, idet emulgeringstrinnet gjennomføres i det sammensetningsområdet hvori en mikroemulsjon vann-i-olje dannes. Prosessen kan eksempelvis benyttes til dannelse av ekstremt små protein-nanopartikler.

Eksempel 22

Fremstilling av nanopartikler av cyklosporin A

25 115 mg cyklosporin A oppløses i 1 ml butylacetat, og mikses med 2 g 4:1 løsning av Triton X-100:n-butanol. Et klart system oppnås. 10 g vann tilsettes dråpevis, under svak risting. En klar mikroemulsjon olje-i-vann oppnås. 10 g av 1% kaseinløsning tilsettes, under svak risting. Systemet blir svakt turbid. Butylacetatet fjernes i en Rotavap, ved 40°C, 80 mm Hg. Systemet blir fullstendig klart.

30

Partikkelstørrelsen ble målt ved foton-korrelasjonsspektroskopi. Det ble funnet at Z-gjennomsnittsstørrelsen er 25-33 nm, mens størrelsen ved antall- eller volumfordeling er bare 9 nm. Ingen partikler ble observert under optisk mikroskop, heller ikke under polarisert lys. Dette resultat viser fraværet av krystallinske partikler.

35

Den flytende dispersjon av disse nanopartikler ble lyofilisert, etter tilsats av laktose (2% vekt/vekt).

Det ble oppnådd et hvitt, fast materiale, som ved rekonstituering i vann ga et klart system, i likhet med det forut for lyofilisering. Partikkelstørrelsen i denne rekonstituerte prøven var meget lik den for den opprinnelige formulering, Z-gjennomsnitt ca. 40 nm,
5 og diameter ved volum- og antallsfordeling mellom 10-12 nm.

Eksempel 25Fremstilling av nanopartikler av cyklosporin A

119 mg cyklosporin A oppløses i butylacetat, og mikses med 2 g 4:1 løsning av Triton
 5 X-100:propylenglykol. Et klart system oppnås. 7 g vann tilsettes dråpevis, under svak
 risting. En klar mikroemulsjon olje-i-vann oppnås. 7 g av 1% kaseinløsning tilsettes,
 under svak risting. Systemet blir svakt turbid. Prøven fortynnes 1:1 med vann, forut for
 løsningsmiddelinnndamping. Butylacetatet fjernes i en Rotavap, ved 40°C, 80 mm Hg.
 Systemet blir fullstendig klart. Denne prosess gir også ekstremt små nanopartikler: Z-
 10 gjennomsnitt 45 nm, og diameter ved volum- og antallsfordeling er 11 nm.

Den flytende dispersjonen av disse nanopartikler ble lyofilisert, etter tilsats av laktose
 (2% vekt/vekt).

15 Det ble oppnådd et hvitt, fast materiale, som etter rekonstituering i vann, ga et klart
 system, i likhet med det forut for lyofilisering. Partikkelstørrelsen i denne rekonstituerte
 prøve var nær den for den opprinnelige formulering, Z-gjennomsnitt ca. 25 nm, og
 diameter ved volum- og antallsfordelinger mellom 9-11 nm.

20 Eksempel 26Cyklosporin-nanopartikler

Mikroemulsjoner ble frembragt med de følgende sammensetninger: 50 mg cyklosporin,
 0,5 g butylacetat, 3,04 g Tween 80:propylenglykol (1:1), og 6,8 g vann.

25 Mikroemulsjonen ble inndampet for å gi en klar væske som inneholdt 5 mg/ml
 cyklosporin. I et kontrollforsøk, som ble utført med de ovenstående komponenter ved
 enkel blanding, men uten butylacetat, ble cyklosporin ikke oppløst, selv etter 17 timer.

Det foreligger flere muligheter for surfaktanter, inklusive polysorbater (Tween),
 30 sorbitanestere (span), sukroseestere, lecitin, monodiglyserider, polyetylen-
 polypropylenblokk-kopolymerer (pluromiks), såper (natriumstearat, etc.),
 natriumglykolat-gallesure salter, etoksylert lakserolje, natriumstearylaktylat, etoksylerte
 fettsyrer (myrj), etoksylerte fettalkoholer (Brij), natriumdodecylsulfat (SDS) og
 lignende. Også, generelt sett, kan biopolymerer slik som stivelse, gelatin,
 35 celluloderivater, etc. benyttes. For orale anvendelser kan også alle akseptable
 surfaktanter av næringsmiddeltype benyttes såvel som surfaktanter som presenteres i
 McCutcheon Handbook of Surfactants eller CTFA indeks. Mulige koløsningsmidler

eller kosurfaktanter for mikroemulsjonen inkluderer propylenglykol, etanol, glyserol, butanol, oljesyre og lignende.

Eksempel 27

5

Fremstilling av nanopartikler av BHT

110 mg butylert hydroksytoluen (BHT) oppløses i 1 ml toluen, og mikses med 2 ml av en 4:1 løsning av Triton X-100:n-butanol. 32 g 1% caseinløsning ble tilsatt, og en mikroemulsjon ble spontant dannet. Mikroemulsjonen ble inndampet under redusert trykk, 8 mm Hg, ved 40°C, inntil den ble klar. Størrelsen på de resulterende partikler er: Z-gjennomsnitt 30 nm, diameter ved volum- og antallsfordeling er hhv. 16 og 15 nm.

Eksempel 28

Fremstilling av nanopartikler av BHT

En prosess i likhet med den som er beskrevet i eksempel 24 ble gjennomført, ved anvendelse av vann i stedet for caseinløsning. Etter inndamping ved 40°C, 80 mm Hg, ble systemet klart, med en Z-gjennomsnittsstørrelse på ~10 nm.

Eksempel 29

Fremstilling av nanopartikler av paklitaksel

30 mg paklitaksel ble oppløst i 2 ml butylacetat, og tilsatt til 4 g 4:1 Triton X-100:propylenglykol. 40 ml vann ble tilsatt, og systemet ble svakt turbid. Etter inndamping, ble systemet fullstendig klart. Z-gjennomsnittstørrelse var 6 nm, størrelse ved volum- og antallsfordeling var 7-9 nm. Den samme størrelse ble målt etter en dag ved 4°C.

D. Forskjellige relevante eksempler på samtlige fremgnagsmåter for nanopartikkel fremstilling.

Eksempel 30

Identifisering av mikroemulsjonfasediagrammer

Preparater ble identifisert som kunne gi mikroemulsjoner, og som kan benyttes til oppnåelse av nanopartikler ved løsningsmiddel-inndampingsmetoden. Disse preparater burde inneholde et vannløselig løsningsmiddel som er i stand til å oppløse hydrofobe

molekyler, en vandig løsning slik som det kontinuerlige medium, surfaktanter og eventuelt kosurfaktanter.

Mikroemulsjoner av butylacetat i vann kan dannes i ulike sammensetninger som er
 5 beskrevet ved hjelp av fasediagrammer (butylacetat klassifiseres som løsningsmiddel med i høy grad akseptabel gjenværende konsentrasjon i sluttproduktet). Videre, benyttes både surfaktant og kosurfaktant i matvare- og farmasøytiske anvendelser: Tween 80 (etoksyliert sorbitanmonooleat) og propylenglykol. Preliminære forsøk ble gjennomført ved anvendelse av BHT som en modell for hydrofob molekyl, noe som ga dispersjoner
 10 av partikler i størrelsesområdet 20-50 nm. Etter filtrering ved 0,2 µm filtere, passerte ca. 100% av BHT gjennom membranen.

Fasediagrammer av ulike kombinasjoner av surfaktant/kosurfaktant ble oppnådd ved å virvle løsningsmidlet med en blanding av surfaktant/kosurfaktant (fremstilt forut for
 15 miksing med løsningsmidlet, i ulike forhold), fulgt av dråpevis tilsats av vann. Turbiditeten av de ulike sammensetninger langs "vannlinjen" ble observert og de sammensetninger som ga gjennomskinnelige systemer ble ytterligere analysert ved lysspredning. Ved anvendelse av ulike forhold mellom løsningsmiddel-surfaktant/kosurfaktant, ble de områder i fasediagrammene som ga mikroemulsjoner
 20 identifisert (utelukkende et lite antall av de valgte komponenter ga mikroemulsjoner). Den samme prosedyre ble benyttet for systemer hvori BHT ble oppløst i butylacetat forut for gjennomføring av fasediagram-forsøkene.

"Filtrerbarheten" av mikroemulsjonen og nanopartiklene som inneholdt BHT, ble
 25 evaluert ved sammenligning av UV-absorpsjonsspektra før og etter 0,2 µm filtrering. Nanopartiklene ble oppnådd ved vakuuminddamping av butylacetat (60 mm Hg, 40°C). Det bør understrekes at i løpet av hele prosessen ble det ikke benyttet noe sterkt skjærende utstyr.

30 De mikroemulsjonssystemer som kunne være egnet for oral tilførsel ble identifisert. n-butylacetat ble valgt som et løsningsmiddel. De følgende surfaktanter og kosurfaktanter ble evaluert i ulike forhold:

	Tween 80: glyserol	5:1
35	Tween 80: glyserol	5:1
	Tween 80: glyserol	3:1
	Tween 80: glyserol	2:1

- | | | |
|----|--|-------|
| | Tween 80:glyserol | 1:1 |
| | Span 80:glyserol | 4:1 |
| | Span 80:glyserol | 3:1 |
| 5 | Tween 80:propylenglykol | 4:1 |
| | Tween 80:propylenglykol | 3:1 |
| | Tween 80:propylenglykol | 2,5:1 |
| | Tween 80:propylenglykol | 1,5:1 |
| 10 | Tween 80:propylenglykol | 1:1 |
| | Tween 80:propylenglykol | 1:2 |
| | ((Tween 80 + Span 80) 7:1):propylenglykol | 3,5:1 |
| | ((Tween 80 + Span 80) 7:1):propylenglykol | 1:1 |
| 15 | ((Tween 80 + Span 80) 8:1):propylenglykol | 4:1 |
| | ((Tween 80 + Span 80) 5:1):propylenglykol | 1:1 |
| | Tween 80:((propylenglykol + glyserol) 1:1,2) | 2:1 |
- 20 En egnet sammensetning ble funnet å være som følger: Tween 80 som en surfaktant og propylenglykol som en kosurfaktant i forhold 1:1. Det fulle fasediagram ble evaluert med hensyn til systemet n-butylacetat, Tween 80:propylenglykol 1:1, vann. To ytterligere løsningsmidler ble testet: sek-butylacetat og tert-butylacetat. Fasediagrammene for disse systemer var det samme som for det med n-butylacetat.
- 25 Systemet n-butylacetat, Tween 80:propylenglykol 1:1, vann ble evaluert ytterligere.
- Målingen av partikkelstørrelse for prøven 7% butylacetat, 30% surfaktant/PG, 63% vann ble utført. Z-gjennomsnitt på ca. 20 nm ble funnet.
- Nanopartikkeldannelsesprosessen ble utført for et vannuløselig fargestoff, Sudan III, i
- 30 konsentrasjon på ca. 10 mg i 1 g butylacetat (5% butylacetat. 23% surfaktant/PG, 72% vann). Partikkelstørrelse på ca. 17 nm ble funnet. Prosessen for nanopartikkeldannelse ble også utført for BHT ved konsentrasjon 100 mg i 1 g butylacetat. Fasediagrammet for dette system ble bestemt. Partikkelstørrelse på ca. 20-50 nm ble funnet avhengig av sammensetningen.
- 35 Kontrollforsøk med Sudan III og BHT ble gjennomført. 14,4 g vann ble tilsatt til 10 mg Sudan III og 4,6 g surfaktant/PG ble tilsatt til blandingen. Prøven ble omrørt i 24 timer

med en magnetisk rører. Oppløsning av Sudan III ble observert. Imidlertid, når det samme forsøk ble utført med BHT (100 mg BHT i 9 g vann og 4,3 g surfaktant/PG) ble ingen oppløsning av BHT observert. På dette trinn ble inndamping utført (temperatur 40°C, trykk ca. 60 mm Hg). Målingen av partikkelstørrelse for prøvene ble utført før og etter inndamping. Z-gjennomsnitt på ca. 20-50 nm, og 30 nm ble funnet for prøvene hhv. forut for og etter inndamping.

Prøvene etter inndamping ble filtrert gjennom 0,2 µm filtere, og konsentrasjonen av BHT før og etter filtrering ble målt ved UV-absorpsjon. Det ble funnet at det ikke er noen forskjell mellom de to prøver. Dette resultat er opplagt en indikasjon på den meget lille partikkelstørrelse for BHT-nanopartiklene.

To prøver ble fremstilt (sammensetningen av disse prøvene: prøven nr. 1: 4% butylacetat; 14% surfaktant/PG; 80% vann; prøve nr. 2: BHT 123 mg/g butylacetat; 5% butylacetat; 18% surfaktant/PG; 77% vann).

Eksempel 31

Alternativer i valg av prosessutstyr

Prosessutstyr som benyttes for å produsere de aktuelle satser vil bli oppskalert for klinisk produksjon. Det foreligger flere alternativer som er tilgjengelige for valg av storskalautstyr for Capxol™-produksjon. Noen av disse alternativer er opplistet i det følgende:

Utstyrskategori	Utstyrvalg
Premikser	Bladmikser, rotostatormikser
Høytrykksutstyr	Høytrykkshomogenisatorer (Avestin, Microfluidics, Stansted), sonikatorer (Heat Systems)
Utstyr for løsningsmiddelfjerning	Rotasjonsfordampere, kontinuerlig strømfordampere, strøket filmfordampere, Flash-fordampere, resirkuleringskonsentratorer, ultrafiltrering
Dehydreringsutstyr	Lyofilisatorer, sprøytetørkere

Eksempel 32Intravenøse tilførselssystemer formulert fra et utvalg materialer

De materialer som benyttes for fremstillingen av intravenøse tilførselssystemer kan være polymere (eksempelvis polyetylen, polyvinyl, polypropylenslanger, og lignende), eller glass. Vanlige slanger av medisinsk type er kjent å inneholde hydrofobe enheter på de indre overflater derav. Disse enheter er således tilgjengelige for å komme i kontakt med injeksjonsløsningen. Faktisk er slike slanger spesifikt skreddersydd, i likhet med katetere, for å presentere hydrofobe enheter i kontakt med behandlingsløsningen for å redusere absorpsjonen av vandig materiale til slangene. Imidlertid, vil eventuelle hydrofobe enheter i behandlingsløsningen tendere til å bindes til både kateterslange og andre komponenter i tilførselssystemet. Som et resultat, kan et vesentlig parti av et hydrofobt farmakologisk virksomt middel bli bortgjemt i innerveggene på kateterslangen og tilførselskaret. Dermed kan doseringen av hydrofobe farmakologisk virksomme midler bli feilaktig, siden et vesentlig parti av det aktive middel kan bli absorbert til veggene på slangene. I kritiske terapeutiske behandlinger, hvor det hydrofobe farmakologisk aktive middel benyttes for å behandle en sykdom, kan en signifikant reduksjon i den virksomme dose av aktivt middel føre til terapeutisk svikt. Svikten er særskilt slående når det benyttes terapeutiske enheter som krever at det aktive middel foreligger et visst nivå, og at det terapeutiske vindu er smalt.

En ny fremgangsmåte for intravenøs introduksjon av et hydrofobt farmakologisk virksomt middel er nå utviklet. Ved å beskytte de hydrofobe enheter av det aktive middel, ved hjelp av assosiasjon med de hydrofobe enheter i et biokompatibelt belegg (eksempelvis albumin), reduseres dramatisk det aktive middels tendens til å bli festet til slangene. Således, muliggjør den e anvendelsen av i høy grad hydrofobe virkestoffer, i kombinasjon med polymerer av vanlig medisinsk kvalitet og hydrofobe glass, hvori virkestoffet beskyttes og derfor ikke absorberes til overflaten. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter det å plassere et beskyttende belegg av en biokompatibel polymer (eksempelvis albumin), rundt det hydrofobe virkestoff og plassere det resulterende preparat i et hydrofobt polymert tilførselssystem. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er derfor i stand til å forbedre tilførselen av et utvalg hydrofobe terapeutika.

Eksempel 33HPLC-analyse av paklitaksel

Kromatografisk system:

5

HPLC: Shimadzu LC-10AS Solvent Delivery System
 Shimadzu SIL-10A Auto Injector
 Shimadzu SCL-10A System Controller
 Shimadzu SPD-M10AV Diodearray Detector
 Shimadzu CTO-10A Column Oven

Kolonne: Curosil-PFP, 5 µm, 4,6 mm x 25 cm, Phenomenex; eller C-18

Mobil fase: vann/acetonitril 65:45

Strømningshastighet: isokratisk, 1,0 ml/min.

Påvisning: 228 nm

Identitet av Paklitaksel som virkestoffs substans i bulk (BDS).

- 10 Paklitaksel BDS og vanlig paklitaksel (99,9%, Hauser Chemical Research, Inc., Lot 1782-105-5) ble kvantitativt oppløst i acetonitril og injisert inn i HPLC separat. 10 µl 1,00 mg/ml paklitaksel BDS og 10 µl 2,07 mg/ml vanlig paklitaksel ble injisert. Retensjonstiden for den dominante topp av paklitaksel BDS passer med retensjonstiden for vanlig paklitaksel fra Hauser.

15

Potensiale for Paklitaksel BDS

- Paklitaksel BDS og vanlig paklitaksel ble injisert inn i HPLC som beskrevet i det foregående. Potensialet for paklitaksel ble avledet på basis av forholdet med topparealet for paklitaksel BDS sammenlignet med vanlig paklitaksel og det kjente potensiale for vanlig paklitaksel.
- 20

Urenhetsprofil for Paklitaksel BDS

- 25 Kromatografisystemet som er beskrevet i det foregående er kapabelt til å frembringe en høy oppløsning av taksaner. 10-20 µl 1,0 mg/ml paklitaksel BDS i acetonitril som faller

innenfor det lineære responsområdet for søkerens HPLC-system ble injisert inn i HPLC. Forurensningsprofilen ved hjelp av relative toppareal.

Assay for potensialet for paklitaksel i Capxol™

5

Standardløsningene (60, 100, 120, 140 og 160 µg/ml) ble fremstilt ved kvantitativ oppløsning av paklitaksel BDS i 3% HSA. Capxol™-prøvene ble fortynnet i saltvann til ~100 µg/ml i paklitakselkonsentrasjon. Standardløsningene og Capxol™-prøver ble spritet opp med cefalomannin som intern standard fulgt av fast faseekstraksjon eller
10 væskefaseekstraksjon (se nedenfor). Separat injiserte like volumer (20-30 µl) av standardpreparatene og preparater av Capxol™-prøve inn i HPLC til måling av toppresponsforholdet mellom paklitaksel og den interne standard cefalomannin. En kalibreringskurve ble generert ved den vanlige minste kvadraters regresjon og resultatene fra standardinjeksjonene. Potensialet av paklitaksel i Capxol™ bestemmes ved å
15 sammenligne topp responsforholdet for prøveinjeksjonene med standard injeksjonene.

Forurensningsprofil for paklitaksel i Capxol™

Capxol™ ble underlagt fast faseekstraksjon eller væskefaseekstraksjon (se nedenfor) før
20 injeksjon inn i HPLC. 30 µl ~1 mg/ml paklitaksel som var ekstrahert fra Capxol™ ble injisert for å undersøke forurensningsprofilen som i det foregående.

Fase faseekstraksjon

25 En Capxol™-prøve rekonstitueres til ca. 100 µg/ml i saltvann. En fast faseekstraksjonskolonne, Bond-Elut (C-18) kondisjoneres med vann. Kolonnen lastes med prøven som dras gjennom kolonnen ved anvendelse av et vakuum. Kolonnen blir deretter vasket med vann fulgt av eluering av paklitaksel med acetonitril. Eluatet som inneholder ekstrahert paklitaksel i acetonitril injiseres på HPLC.

30

Væskefaseekstraksjon

En Capxol™-prøve rekonstitueres til ca. 100 µg/ml i saltvann. Til ca. 200 µl av denne prøve tilsettes 800 µl acetonitril. Blandingen virvles i 30 sekunder og sentrifugeres
35 deretter ved 3000 g i 5 minutter. Supernatanten fjernes og samlet opp. Pelleten resuspenderes i 200 µl saltvann og ekstraksjonstrinnet gjentas. Den andre supernatanten

puljes med den første. Det puljede ekstrakt konsentreres ved inndamping fulgt av injeksjon på HPLC.

Eksempel 34

5

Partikkelstørrelsesfordeling ved fotonkorrelasjonsspektroskopi (PCS)

Partikkelstørrelsesfordelingen for rekonstituert Capxol™ ble analysert ved fotonkorrelasjonsspektroskopi (PCS) på en Malvern Zetasizer, Malvern Instruments Ltd. Denne Zetasizer ble kalibrert ved NIST-sporbare "Nanosphere" størrelsesstandarder, Duke Scientific Corporation. Prosedyren for og måle Capxol™ partikkelstørrelse på Malvern Zetasizer inkluderte innstilling av de følgende parametere:

10

Temperatur: 20,70 °C

Spredningsvinkel: 90°

15

Brytningsindeks dispersant: 1,33

Bølgelengde: 633 nm

Visk. (auto): 0,99

Sann brytningsindeks: 1,59

Imaginær brytningsindeks: 0

20

Etter å ha preparert Zetasizer, bestem deretter fortynningen av den prøve som behøves for en god størrelsesmåling fra avlesningene av kcts/sek. (aliquoter i starten 200 µl prøve inn i en kuvette, fortynn deretter med ca. 2 ml 0,22 µm filterfiltrert destillert vann. Plasser kuvetten over i kuvetteholderen på innsiden av Zetasizer'en og start måling.

25

Straks målingen starter, vil visningen for Correlator Control komme til syne. Fra menyen, velg display rate meter. Rate bør være innen det midtre området på 100-250 kcts/sek. Dersom rate er enten for høy eller for lav, preparer en annen prøve ved hhv. høyere eller lavere fortynning. Størrelsen på rekonstituert Capxol™ ble analysert, tatt gjennomsnitt av, og registrert ved multimodal analyse etter tre autokjøringer. Den

30

midlere partikkelstørrelse var 155 nm ± 23 nm for 25 satser med Capxol™.

Eksempel 35

Polymere skall som bærere for polynukleotidkonstrukter, enzymer og vaksiner

35

Idet genterapi blir mer bredt akseptert som en levedyktig terapeutisk valgmulighet (for tiden har over 40 forslag til overføring av humant gen blitt godkjent av NIH- og/eller FDA-granskingsutvalg), er en av barrierene for å lykkes i å ta i bruk denne terapeutiske

tilnærming motviljen mot å benytte virale vektorer for inkorporeringen av genetisk materiale inn i en celledens genom. Viruser er iboende giftige. Således er de risikoer som dras med i anvendelsen av virale vektorer i genterapi, særskilt for behandling av ikke dødelige, ikke genetiske sykdommer, uakseptable. Uheldigvis, blir plasmider som

5 overføres uten anvendelse av en viral vektor vanligvis ikke inkorporert i målcellens genom. Dessuten, som med konvensjonelle virkestoffer, har slike plasmider en endelig halveringstid i kroppen. Således har en generell begrensning for å ta i bruk genterapi (såvel som antisensterapi), hvilket er en reversert form for genterapi, hvor en nukleinsyre eller et oligonukleotid introduseres for å inhibere genekspressjon har vært

10 den manglende evne til effektivt å tilføre nukleinsyrer eller oligonukleotider som er for store for å trenge gjennom cellemembranen.

Innkapslingen av DNA, RNA, plasmider, oligonukleotider, enzymer og lignende, inn i mikrokapsler med proteinskall som beskrevet heri kan lette deres målrettede tilførsel til

15 leveren, lungene, milten, lymfen og benmargen. Således, i samsvar med den foreliggende oppfinnelse, kan slike biovirkestoffer tilføres til intracellulære steder uten den ledsagende risiko som henger sammen med anvendelsen av virale vektorer. Denne type formulering letter det uspesifikke opptak eller endocytosen av de polymere skall direkte fra blodstrømmen til cellene av RES, inn i muskelceller ved intramuskulær injeksjon,

20 eller ved direkte injeksjon inn i tumorer. Dessuten, kan monoklonale antistoffer mot nukleære reseptorer benyttes for å målrette det innkapslede produkt mot kjernen eller visse celletyper.

Sykdommer som kan siktes mot ved hjelp av slike konstrukter inkluderer diabetes,

25 hepatitis, hemofilia, cystisk fibrose, multipel sklerose, cancer generelt, influensa, AIDS, og lignende. Eksempelvis kan genet for insulinlignende vekstfaktor (IGF-1) innkapsles inn i proteinskall for tilførsel for behandling av diabetisk perifer neuropati og kakeksi. Gener som koder for faktor IX og faktor VIII (egnet til behandling av hemofilia) kan siktes inn mot leveren ved innkapsling inn i mikrokapsler med

30 proteinskall ifølge den foreliggende oppfinnelse. På lignende måte kan genet for lav tetthetslipoprotein (LDL) reseptor målrettes mot leveren for behandling av aterosklerose ved innkapsling inn i mikrokapsler med proteinskall ifølge den foreliggende oppfinnelse.

35 Andre gener som er egnet i praktiseringen av den foreliggende oppfinnelse er gener som restimulerer kroppens immunrespons overfor cancerceller. Eksempelvis kan antigener slik som HLA-B7, kodet av DNA som rommes i et plasmid, inkorporeres inn i et

proteinskall ifølge den foreliggende oppfinnelse for injeksjon direkte inn i en tumor (slik som en hudcancer). Straks det er i tumoren, vil antigenet rekruttere til tumoren spesifikke celler som forhøyer nivået av cytokinaser (eksempelvis IL-2) som gjør tumoren til et mål for immunsystemangrep.

5

Som et annet eksempel, tas plasmider som inneholder partier av det adenotilknyttede virusgenom i betraktning for innkapsling inn i mikrokapsler med proteinskall ifølge den foreliggende oppfinnelse. Dessuten kan mikrokapsler med proteinskall ifølge den foreliggende oppfinnelse benyttes for å tilføre terapeutiske gener til CD8+ T-celler, for

10

adoptiv immunoterapi mot et utvalg tumorer og infektuøse sykdommer.

Proteinskall ifølge den foreliggende oppfinnelse kan også benyttes som et tilførselssystem for å bekjempe infektuøse sykdommer via målrettet tilførsel av et antisens-nukleotid, eksempelvis mot viruset hepatitt B. Et eksempel på et slikt

15

antisensoligonukleotid er et 21-mer fosfortioat mot polyadenyleringssignalet fra viruset hepatitt B.

Proteinskall ifølge den foreliggende oppfinnelse kan også benyttes for tilførsel av transmembran regulator (CFTR)-genet ved cystisk fibrose. Mennesker som mangler

20

dette gen utvikler cystisk fibrose, noe som kan behandles ved nebuliserende mikrokapsler med proteinskall ifølge den foreliggende oppfinnelse, inneholdende CFTR-genet, og direkte inhalering inn i lungene.

Enzymer kan også tilføres ved anvendelse av proteinskallene ifølge den foreliggende

25

oppfinnelse. Eksempelvis kan enzymet DNase innkapsles og tilføres til lungene. På lignende måte kan ribozymmer innkapsles og målrettes mot viruskapselproteiner eller virusinfektete celler ved festing av egnede antistoffer til yttersiden av det polymere skall. Vaksiner kan også innkapsles inn i polymere mikrokapsler ifølge den foreliggende oppfinnelse og benyttes for subkutan, intramuskulær eller intravenøs tilførsel.

30

Eksempel 36

Lokalisert behandling av hjernetumorer og tumorer innen peritoneum

Tilførsel av kjemoterapeutiske midler lokalt til en tumor er en effektiv fremgangsmåte

35

for langtids eksponering overfor virkestoffet mens dosebegrensende bivirkninger minimaliseres. De biokompatible materialer som diskuteres i det foregående kan også benyttes i flere fysiske former slik som geler, tverrbundne eller ikke tverrbundne, til

frembringelse av matrikser fra hvilke den farmakologisk aktive bestanddel, eksempelvis paklitaksel, kan frigjøres ved diffusjon og/eller degradering av matriksen. Capxol kan bli dispergert innen en matriks av det biokompatible materialet til frembringelse av en formulering av paklitaksel med vedholdende frigjøring for behandling av hjernetumorer og tumorer innen den peritoneale kavitet (ovarialcancer og metastatiske sykdommer). 5 Temperaturfølsomme materialer kan også benyttes som den dispergerende matriks for formuleringen ifølge oppfinnelsen. Således kan eksempelvis Capxol injiseres inn i en flytende formulering av de temperaturfølsomme materialer (eksempelvis kopolymerer av polyakrylamider eller kopolymerer av polyalkylenglykoler og polylaktid/glykolider 10 og lignende) som geler på tumorpunktet og frembringer langsom frigjøring av Capxol. Capxol-formuleringen kan dispergeres inn i en matriks av de ovenfor nevnte biokompatible polymerer til frembringelse av en formulering med styrt frigjøring av paklitaksel, som ved hjelp av egenskapene til Capxol-formuleringen (albumin som er knyttet sammen med paklitaksel) resulterer i lavere giftighet for hjernevev, såvel som 15 lavere systemisk giftighet som diskutert i det følgende. Denne kombinasjon av Capxol, eller andre kjemoterapeutiske midler som formuleres på lignende måte som Capxol, sammen med en biokompatibel polymermatriks, kan være egnet til styrt lokal tilførsel av kjemoterapeutiske midler for behandling av faste tumorer i hjernen og i peritoneum (ovarialcancer) og i lokale anvendelsesområder overfor andre faste tumorer. Disse 20 kombinasjonsformuleringer er ikke begrenset til anvendelsen av paklitaksel og kan benyttes med et bredt utvalg farmakologisk aktive bestanddeler, inklusive anti-infektiva, immunsuppressiver og andre kjemoterapeutika og lignende.

Eksempel 37

25

Stabilitet av Capxol™ etter rekonstituering

Lyofilisert Capxol i hetteglass av glass ble rekonstituert med sterilt normalt saltvann til konsentrasjoner på 1, 5, 10 og 15 mg/ml og lagret ved romtemperatur og under nedkjølte betingelser. Suspensjonene ble funnet å være homogene i løpet av minst 3 30 dager under disse betingelser. Partikkelstørrelsesmålinger som ble utført på flere tidspunkter indikerte ingen endring i størrelsesfordeling. Ingen utfelling ble sett under disse betingelser. Denne stabilitet er uventet og overviner problemer som henger sammen med Taxol, hvilken utfeller innen ca. 24 timer etter rekonstituering ved de anbefalte konsentrasjoner på 0,6-1,2 mg/ml.

35

Dessuten, var rekonstituert Capxol stabilt i nærvær av forskjellige slangematerialer slik som teflon, silastik, polyetylen, tygon og andre vanlige materialer for infusjonsslangor.

Dette er en vesentlig fordel sammenlignet med Taxol som er begrenset til infusjonssett av polyetylen og infusjonsflasker av glass.

Eksempel 38

5

Enhetsdoseformer for Capxol™

- Capxol fremstilles som et lyofilisert pulver i hetteglass av egnet størrelse. Således kan egnet dosering fylles i en egnet beholder og lyofiliseres til oppnåelse av et pulver som inneholder idet vesentlige albumin og paklitaksel i den ønskede mengde. Slike
- 10 beholdere rekonstitueres deretter med sterilt normalt saltvann eller annet vandig fortynningsmiddel til det egnede volum på tidspunktet for anvendelse til oppnåelse av en homogen suspensjon av paklitaksel i fortynningsmidlet. Denne reskontituerte løsning kan direkte administreres til en pasient enten ved injeksjon eller infusjon med vanlige i.v. infusjonsutstyr.
- 15 Dessuten kan Capxol™ fremstilles som en klar til bruk, frossen løsning i flasker eller poser som skal tines opp på tidspunktet for anvendelse og ganske enkelt administreres til pasienten. Dette unngår lyofiliseringstrinnet i fremstillingsprosessen.

- Det er meget overraskende at når formuleringen ifølge oppfinnelsen og Taxol
- 20 administreres til rotter ved ekvivalente doser av paklitaksel, resulterer dette i en meget høyere grad av myelosuppressjon for Taxol-gruppen sammenlignet med gruppen som mottar formuleringen ifølge oppfinnelsen. Dette kan resultere i lavere forekomster av infeksjoner og feberepisoder (eksempelvis fibril neutropeni). Det kan også redusere syklustiden mellom behandlinger som for tiden er 21 dager. Med anvendelsen av
- 25 farmasøytiske preparater som fremstilles, kan denne syklustid reduseres til 2 uker eller mindre, noe som tillater en mer effektiv behandling for cancere. Således kan anvendelsen av farmasøytiske preparater som fremstilles frembringe vesentlig fordel sammenlignet med Taxol.

30 Eksempel 39

Oral tilførsel av virkestoffer

- Taxol absorberes meget svakt ved hjelp av den orale rute. Partikkelformede formuleringer slik som Capxo™ kan i stor grad forbedre opptaket av virkestoffet slik som
- 35 paklitaksel. Dessuten er formuleringene ifølge oppfinnelsen av paklitaksel som fremstilles ved hjelp av mikroemulsjons/inndampingsprosessen egnet for oralt opptak av virkestoffer. Anvendelsen av surfaktanter i kombinasjon med disse formuleringer

forbedrer overraskende disse virkestoffers orale biotilgjengelighet. Anvendelsen av lipider, surfaktanter, enzyminhibitorer, gjennomtrengningsforbedrere, ioneparende midler, metaboliseringsinhibitorer og lignende ble overraskende funnet å øke den orale absorpsjon av paklitakselformuleringene ifølge oppfinnelsen. Eksempler på ioneparende midler inkluderer, men er ikke begrenset til trikloracetat, trikloracetatsalicylat, 5 naftalensulfonsyre, glycin, bis-N,N-dibutylaminoetylenkarbonat, n-alkylsulfonater, og n-alkylsulfater. Eksempler på membrangjennomtrengningsforbedrere inkluderer, men er ikke begrenset til natriumkaprat, acylglyserider, polyoksyetylenalkyletersacylkarnitiner, natriumkolat, natirumtaurokolat, natriumtaurodihydrofusidat, EDTA, natriumsalicylat, 10 og natriummetoksysalicylat. En ikke-begrensede liste over surfaktanter og lipider som kan benyttes i formuleringer ifølge oppfinnelsen er beskrevet heri.

Eksempel 40

15 Modus for administrering av Capxol og formulering ifølge oppfinnelsen av andre virkestoffer

Formuleringene ifølge oppfinnelsen kan administreres ved intravenøs infusjon, intravenøs bolus, intraperitoneal injeksjon, intraarteriell injeksjon, intraportal injeksjon, hepatisk embolisering, intratumoral injeksjon eller implantasjon, intrauretral injeksjon 20 eller iontoforese, intramuskulær injeksjon, subkutan injeksjon, intratekal injeksjon, inhallasjon av tørt pulver eller nebulisert væske og lignende.

Eksempel 41

25 Anvendelse av Capxol for å sikte mot angiogenisk vaskulatur

Angiogenese har vært implisert som en forårsakende og/eller forværende faktor i progressjonen av sykdommer slik som cancer, reumatoid artritt og retinopati. Ifølge oppfinnelsen er det overraskende funnet at Capxol kan reversere eller redusere alvorlighetsgraden av reumatoid artritt såvel som kurere tumorer i dyremodeller. Det er 30 derfor mulig at Capxol har antiangiogenisk aktivitet. For å gjøre Capxol enda mer effektiv, er det mulig å rette seg mot angiogen vaskulatur ved å feste egnede peptider til Capxol. Eksempler på et slikt peptid er RGD (arginin-glycin-aspartinsyre). Mange andre peptider med lignende aktivitet kan festes til Capxol, er andre virkestoffer som er fremstilt ved prosessen ifølge oppfinnelsen, for målrettet terapi. Peptidet/Capxol kan 35 administreres på konvensjonell måte til pasienter i behov derav.

Eksempel 42Anvendelse av Capxol™ til behandling av leversykdom

Hepatocellulær carcinom i sluttrinnet og andre cancere i leveren kan behandles ved administrering av Capxol intraportalt. Embolisering direkte inn i leveren forbedrer i stor grad det at dosen når leveren. I tillegg, kan meget høyere doser enn for konvensjonell Taxol benyttes for å behandle sykdommen mer effektivt. Dessuten kan egnede målrettingsmidler slik som proteiner eller peptider som lokaliserer seg i levervev kombineres med Capxol med hensyn til større terapeutisk effektivitet.

10

Eksempel 43Giftighets/myelosuppressjonsstudie av paklitaksel - Sammenligning mellom BMS-formulering og Capxol™ i rottestudie omfattende enkeltdoseadministrering

15

En oppsummering av en preklinisk studie er presentert i det følgende:

Plan: 1X, Enkeltdose intravenøs infusjon (dag 1)

Dyr: Sprague Dawley rotter, 40 hanndyr, 40 hunndyr

5 rotter/kjønn pr. gruppe

20 Vekt: 300 ± 50 g

Studievarighet: 15 dager

Behandlingsgrupper: BMS (1 bærer + 3 behandlede grupper)
Capxol™ (1 bærer* + 3 behandlede grupper)

Doser: BMS (0, 3, 6 og 9 mg/kg)

25 Capxol™ (0, 6, 9 og 12 mg/kg)

Dosekonsentrasjon: 0,6 mg/ml (alle rotter)

Dosevolum: BMS (15, 5, 10, 15 ml/kg)
Capxol™ (20, 10, 15 og 20 ml/kg)

Infusjonshastighet: Ca. 0,75 ml/time (alle rotter)

30 Doserute: I.V. infusjon, halevene

Klinisk observasjon: IX/dag

Klinisk bane: Dager 0 (før behandling), 1, 3, 7, 11, 15.
Utfør standardliste for NCI Tox Branch

Kroppsvekt: Dager -1, 1, 3, 8 og 15

35

(* bærer fremstilles ved prosesser identisk med det i fremstillingsavsnittet beskrevne, med det unntak at tilsatsen av paklitaksel utelates).

Eksempel 44

Pilotstudie av myelosuppressjon - hematologisk giftighet

5 Forut for igangsettingen av den formelle studie, ble en pilotstudie med 3 rotter i Capxol™-gruppen og 3 rotter i BMS-gruppen utført for å bestemme utfall. Den dose som ble benyttet var 5 mg/kg med et doseringsvolum på 7 ml/kg. Dosen ble gitt som en intravenøs bolus gjennom halevenen. Resultatene av denne studie er oppsummert i diagrammet (se figur 3) som viser prosentvis endring i WBC-tellinger (en indikator for
10 myelosuppressjon) for hver formulering som en funksjon av tid.

Konklusjoner på pilotstudiet av myelosuppressjon:

De foreliggende data viser signifikant lavere WBC-tellinger (middelverdi + SD) i BMS-gruppen sammenlignet med Capxol™-gruppen, noe som indikerer en større grad av
15 myelosuppressjon for BMS-formuleringen (maksimal WBC-suppressjon på >70% for BMS; maksimal WBC-suppressjon på <30% for Capxol™). Analyse av data viser en statistisk signifikant forskjell ($p < 0,05$) mellom de to grupper for alle datapunkter, bortsett fra dag 0, 13 og 14. Dessuten gjenvinnes normale nivåer for WBC innen 6 dager i den gruppe som mottok Capxol™, mens 14 dager kreves for gjenvinning av normale
20 WBC-nivåer i BMS-gruppen. Dette indikerer en signifikant redusert hematologisk giftighet for Capxol™. Dersom lignende resultater ses i humane kliniske utprøvinger, kan disse data antyde at syklustiden (for tiden 3 uker for Taxol) mellom påfølgende sykluser med behandling kunne reduseres signifikant (eventuelt til 2 uker, eller endog 1 uke eller mindre ved anvendelse av Capxol™).

25

Eksempel 45

Pilotstudie av antitumoreffektivitet

Forut for igangsetting av den ovenstående studie, ble en pilotstudie med Capxol™ utført
30 for å bestemme måldoseområder og effektivitet. Musene ($n=10$) ble implantert subkutan med MX-1 pattedyrtumor og behandlingen ble igangsatt når tumoren nådde en størrelse på ca. 150-300 mg. Dette opptrådte ved dag 12 og behandlingen ble igangsatt på dag 13 etter innledningsvis seeding. Capxol™ ble rekonstituert i saltvann for å oppnå en kolloidal løsning av nanopartikler av paklitaksel. De tumorbærende mus
35 ($n=5$) ble behandlet med rekonstituert Capxol™ i en dose på 20 mg/kg (betegnet med VIV-1), som ble gitt ved bolushaleveineinjeksjon hver dag i løpet av 5 påfølgende dager. Den kontrolltumorbærende gruppe ($n=5$) mottok utelukkende saltvann på den samme

plan. Størrelsen av tumorene ble overvåket som en funksjon av tid. Kontrollgruppen viste en voldsom økning i tumorvekt til en median på over 4500 mg og alle dyrene i denne gruppe ble avlivet mellom dag 28 og dag 39. Behandlingsgruppen fremviste på den annen side bemerkelsesverdig effektivitet og alle dyr hadde ingen målbare tumorer ved dag 25. Dyrene i denne gruppe ble alle avlivet på dag 39 på hvilket tidspunkt de ikke fremviste noe tegn på gjenopptreden eller noe tegn på tumor. Resultatene er vist i figur 4.

Konklusjon:

Denne studie viste bemerkelsesverdig antitumoraktivitet for Capxol™. Således, bevares antitumoraktiviteten av paklitaksel i Capxol™-formuleringen. Den studie viser at den intravenøse administrering av nanopartikler av paklitaksel kan være like effektiv som administrering av virkestoffet i den løselige form. Således fremviser Capxol™ effektivitet og potent antitumoraktivitet uten de giftige virkninger som ses i den godkjente og markedsførte cremaphorholdige BMS-formulering.

Note: På basis av litteratordata, og på erfaring ved SRI (Southern Research Institute)-forskere, er det fastlagt at den maksimalt tolererte dose (MTD) for paklitaksel oppløst i fortynningsmiddel 12 (cremaphor/etanol, hvilket er det fortynningsmiddel som benyttes i BMS-formuleringen) er 22,5 mg/kg for denne bestemte stamme av atymiske mus. Dette resultat oppnås ved å løse opp paklitaksel ved en meget høyere konsentrasjon i fortynningsmiddel 12 sammenlignet med den markedsførte BMS-formuleringen (BMS paclitaksel, 6 mg/ml i cremaphor/etanol). Denne gjøres for å minimalisere den mengde cremaphor/etanol som administreres til mus for å unngå giftighet fra bæreren. Ved en dose på 22,5 mg/kg, har paklitaksel i fortynningsmiddel 12 lignende effektivitet som for Capxol™ i det foregående.

Eksempel 46

Behandling av reumatoid artritt i en dyremodell med Paklitakselnanopartikler
Den kollageninduserte artrittmodell i Louvain-rotten, ble benyttet for å teste den terapeutiske effekt av paklitakselnanopartikler på artritt. Potestørrelsen på forsøksdyrene ble overvåket for å evaluere alvorlighetsgraden av artritt.

Etter at artritt var fullt ut utviklet (vanligvis ~9-10 dager etter kollageninjeksjon), ble forsøksdyrene oppdelt i ulike grupper for å motta enten paklitakselnanopartikler 1 mg/kg q.o.d., eller Paklitakselnanopartikler 0,5 mg/kg + prednison 0,2 mg/kg q.o.d.

(kombinasjonsbehandling) intraperitonealt i 6 doser, deretter en dose pr. uke i 3 uker. Potestørrelsene ble målt ved begynnelsen av behandlingen (dag 0) og hver gang virkestoffet ble injisert. En gruppe mottok utelukkende normalt saltvann som kontroll. Ved avslutningen av forsøket, oppnådde den gruppe som mottok

5 paklitakselnanopartikler 42% reduksjon av potestørrelse, kombinasjonsbehandlingsgruppen fremviste en 33% reduksjon av potestørrelsen, mens kontrollgruppen hadde ca. 20% økning av potestørrelsen. Opprinnelig potestørrelse før artritt ble induisert var 50%. Resultatene er vist i figur 2.

- 10 Som konklusjon, demonstrerte de paklitakselholdige nanopartikler terapeutisk effekt på artritt. For å unngå virkninger av langtids anvendelse av både paklitaksel og vedkommende steroid, er det trolig bedre å velge en kombinasjonsbehandling for å få lignende effekt, men bare halve doseringen for hvert virkestoff.

15 Eksempel 47

Effekten av Capxol på arterierestenose

- Unormal utbredelse av glatt vaskulær muskel (VSMP) henger sammen med kardiovaskulære forstyrrelser slik som aterosklerose, hypertensjon og de fleste
- 20 endovaskulære prosedyrer. Unormal VSMP er en vanlig komplikasjon ved perkutan transluminal koronar angioplasti (PTCA). Forekomsten av kronisk restenose som kommer av VSMP etter PTCA har vært rapportert å være så høy som 40-50% innen 3-6 måneder.
- 25 Den høye forekomst av vaskulær reokklusjon som henger sammen med PTCA har ført til utvikling av in vivo dyremodell for restenose og til søking etter midler for å forebygge den. Den følgende studie beskriver anvendelsen av Capxol i å inhibere restenose som følger intimal trauma av arterien.
- 30 Sprague-Dawley hannrotter (Chales River) som veier 350-400 g bedøves med ketamin og rompun og den høyre vanlige halsarterie eksponeres over en lengde på 3,0 cm. Vedhengende vev avklares for å tillate to DIETRICH mikro bulldog clamps å plasseres ca. 2 cm fra hverandre rundt halsarterien uten å forårsake knusende skade på vagus eller tilknyttet øvre cervikale ganglion og sympatetisk tråd. Ingen forgreninger foreligger
- 35 langs dette segment av karet. En 30-gauge nål som er festet til en 3-veis stoppekran føres først inn og dras deretter ut av nedre ende av det isolerte segment for å frembringe et hull på karetets vegg, og føres deretter til øvre ende for injeksjon. 2-3 ml fosfatbuffret

saltvann injiseres for å skylle ut alt blod inne i det isolerte segment og deretter vendes den 3-veis stoppekran til en annen forbindelse til en regulert kilde for komprimert luft. En mild luftstrøm (25 ml pr. minutt) føres gjennom karetets lumen i 3 minutter til frembringelse av tørrende skade på endotelium. Segmentet fylles deretter på nytt med saltvann forut for fjerning av nålen fra karet. Før clampene fjernes, blir nålhullene på karveggen omsorgsfullt kauterisert for å forebygge blødning. En tampong som er fuktet med saltvann kan også benyttes for å presse på nålehullene for å stoppe blødning. Huden lukkes med 7,5 mm metallklips og vaskes med betadin.

Alle dyrene mottok den kirurgi som er beskrevet i det foregående og avlives på den 14. dag etter kirurgi. Halsarterien på hver side ble tatt ut for patologisk undersøkelse. Den ikke-opererte side vil tjene som selvkontroll. Forsøksgruppene mottok ulik behandling som følger:

Gruppe 1: Capxol-behandling ved høy dose:

Paklitaksel 5 mg (v/100 mg human albumin)/kg/uke, IV.

Gruppe 2: Capxol-behandling ved lav dose:

Paklitaksel 1 mg (v/20 mg human albumin)/kg/uke, IV.

Gruppe 3: Kontroll med virkestoffbærer.

Human albumin 100 mg/kg/uke, IV.

Halsarteriebiopsiprøvene konserveres i formalin og deretter kuttet tverrgående snitt (8 µm) fra paraffinblokker og farges med hematoksylin og eosin. Tverrsnittsområdene av blodkarlagene (intima, media og adventitia) kvantifiseres.

De skadde halsarterier i kontrollgruppen fremviste bemerkelsesverdig akkumulering av intimale glatte muskelceller og VSMC-invasjon av basismembran. Den samlede tykkelse av halsarteriens vegg er doblet. Behandlingsgruppene fremviste en statistisk signifikant minskning i tykkelsen av den intimale vegg sammenlignet med kontrollen.

Eksempel 48

In vivo målretting av nanopartikler

Ved inkorporering av visse målrettende enheter slik som proteiner, antistoffer, enzymer, peptider, oligonukleotider, sukker, polysakkarider og lignende, inn i nanopartiklenes

proteinbelegg, er det mulig å rette seg mot spesifikke punkter i kroppen. Denne evne til målretting kan benyttes for terapeutiske eller diagnostiske formål.

Eksempel 49

5

Antistoffmålretting av polymere skall

Naturen til de polymere skall for visse aspekter ved oppfinnelsen muliggjør feste av monoklonale eller polyklonale antistoffer til det polymere skall, eller inkorporering av antistoffer i det polymere skall. Antistoffer kan inkorporeres i det polymere skall idet
 10 det polymere mikrokapselskall dannes, eller antistoffer kan festes til det polymere skall etter fremstilling derav. Vanlige protein-immobiliseringsteknikker kan benyttes til dette formål. Eksempelvis, med proteinmikrokapsler som fremstilles fra en proteinkilde slik som albumin, er et stort antall aminogrupeer på albuminets lysinrester tilgjengelige for feste av egnet modifiserte antistoffer. Som eksempel kan antitumormidler tilføres til en
 15 tumor ved å inkorporere antistoffer mot tumoren inn i det polymere skall mens det dannes, eller antistoffer mot tumoren kan festes til det polymere skall etter fremstilling derav. Som et annet eksempel, kan genprodukter tilføres til spesifikke celler (eksempelvis hepatocytter eller visse stamceller i benmargen) ved å inkorporere antistoffer mot reseptorer på målcellene inn i det polymere skall mens det dannes, eller
 20 antistoffer mot reseptorer på målcellene kan festes til det polymere skall etter fremstilling derav. Dessuten, kan monoklonale antistoffer mot nukleære reseptorer benyttes for å rette det innkapslede produkt mot kjernen til visse celletyper.

Eksempel 50

25

Målretting av immunosuppressive midler mot transplanterte organer ved anvendelse av intravenøs tilførsel av polymere skall som inneholder slike midler

Immunosuppressive midler er i utstrakt grad benyttet etter organtransplantasjon til forebyggelse av avstøtningsepisoder. Nærmere bestemt forlenger cyklosporin, et potent
 30 immunosuppressivt middel, overlevelsen for allogene transplantater som involverer hud, hjerte, nyre, pankreas, benmarg, tynntarm og lunge hos dyr. Cyklosporin har vært vist å undertrykke noen grad av tumoral immunitet og i en større grad, celleformidlede reaksjoner slik som allotransplantasjonsavstøtning, forsinket hypersensitivitet, eksperimentell allergisk encefalomyelitt, Freund's adjuvant artritt, og transplantasjon
 35 versus vertssykdom i mange dyrearter når det gjelder et utvalg organer. Vellykket nyre-, lever- og hjerte-allogene transplantater har vært utført i mennesker ved anvendelse av... cyklosporin.

Cyklosporin tilføres for tiden i oral form enten som kapsler inneholdene en løsning av cyklosporin i alkohol, og oljer slik som maisolje, polyoksyetylerter glyserider og lignende, eller som en løsning av olivenolje, polyoksyetylerter glyserider og lignende.

- 5 Det administreres også ved intravenøs injeksjon, i hvilket tilfelle det oppløses i en løsning av etanol (ca. 30%) og cremaphor (polyoksyetylert lakserolje) som må være fortynnet 1:20 til 1:100 i normal saltvann eller 5% dekstrose forut for injeksjon. Sammenlignet med en intravenøs (i.v.) infusjon, er den absolutte biotilgjengelighet av den orale løsning ca. 30% (Sandoz Pharmaceutical Corporaton, publikasjon SDI-Z10
- 10 (A4), 1990). Generelt sett lider den i.v. tilførsel av cyklosporin av lignende problemer som den for tiden praktiserte i.v. tilførsel av Taxol, dvs. anafylaktiske og allergiske reaksjoner som antas å skyldes Cremaphor, den tilførselsbærer som benyttes i den i.v. formulering. Dessuten unngår den intravenøse tilførsel av virkestoff (eksempelvis cyklosporin) som er innkapslet som beskrevet heri farlige blodtoppnivåer som følger
- 15 umiddelbart etter administrering av virkestoffet. Eksempelvis fremviste en sammenligning av for tiden tilgjengelige formuleringer av cyklosporin med den i det foregående beskrevne innkapslede form av cyklosporin en femfoldig minskning i blodtoppnivåer for cyklosporin straks etter injeksjon.

- 20 Med sikte på å unngå problemer som henger sammen med emulgatoren, kan cyklosporin som rommes innen polymere skall som beskrevet i det foregående tilføres ved i.v. injeksjon. Det kan oppløses i en biokompatibel olje eller et antall andre løsningsmidler hvoretter det dispergeres inn i polymere skall ved sonikering som beskrevet i det foregående. Dessuten, en viktig fordel med å tilføre cyklosporin (eller annet
- 25 immunosuppressivt middel) i polymere skall har fordelene med lokal målretting på grunn av opptaket av det injiserte materialet ved hjelp av RES-systemet i leveren. Dette kan, i noen grad, unngå systemisk giftighet og redusere effektive doseringer på grunn av lokal målretting.

30 Eksempel 51

Anvendelse av Capxol for antistoffmålretting

- Monoklonale antistoffer mot diverse tumorer eller vev kan festes til Capxol for å muliggjøre målretting av Capxol eller andre virkestoffer som er preparert ved prosessen ifølge oppfinnelsen mot sykdomspunkter. Eksempelvis ville antistoffer mot
- 35 ovarialcancer som er festet til Capxol og administrert intraperitonealt ha stor velgjørende virkning for ovarialcancerpasienter.

Eksempel 52Intravenøs administrering av terapeutika

Intravenøs administrering av terapeutika, eksempelvis virkestoffer, imaging, midler, og lignende, predisponerer vedkommende terapeutika til idet minste en passering gjennom leveren. I det dette terapeutikum filtreres gjennom leveren, tas et signifikant parti av vedkommende terapeutikum opp og omsluttet ved hjelp av leveren, og er derfor ikke tilgjengelig for systemisk distribusjon. Videre, når det en gang er tatt opp av leveren, tenderer det til å bli metabolisert, og de resulterende metabolske biprodukter har ofte generelle systemiske giftigheter. Ved å kapsle inn virkestoffet eller annet terapeutisk middel i et belegg ifølge oppfinnelsen (eksempelvis ved anvendelse av et protein slik som albumin), lettes leveromslutning ved intravenøs administrering. Albumin, f.eks., er kjent for å passere gjennom leveren og blir generelt distribuert gjennom pasienten. Således opptrer omslutningen av albumin ved hjelp av leveren ikke i samme grad som giftige forbindelser eller virkestoffer som har heptatiske reseptorer (eller andre mekanismer) som initierer prosesser hvilke resulterer i deres fjerning fra blodstrømmen. Ved å beskytte vedkommende terapeutikum med et belegg av en biokompatibel polymer (eksempelvis et humant albuminbelegg), forbipasserer virkestoffet da leveren og fordeles generelt gjennom alle organsystemer. I overensstemmelse med et aspekt, er det frembragt en ny fremgangsmåte for å passere forbi leveren, idet den omfatter innkapsling av et virkestoff i et humant leveralbumin (idet vesentlige en fysiologisk komponent). På denne måte, blir mer av virkestoffet tilgjengelig for systemisk terapi. I tillegg til den økede tilgjengelighet av virkestoffet, foreligger det en minsking i produksjonen av metabolske biprodukter av hepatocellulær virkestoffdegradering. Både økningen i leverforbipassering og minskning i biprodukter av virkestoffmetabolisering frembringer en synergistisk forbedring i den samlede virkestoffeffektivitet. Denne forbedrede effektivitet strekker seg til alle virkestoffer og materialer som innkapsles i humant albumin.

Eksempel 53Reduksjon av myelosuppressive (hematologisk giftighet) effekter og generell giftighet av virkestoffer

Flere kjemoterapeutiske virkestoffer har dosebegrensende giftighet på grunn av deres myelosuppressive effekter. Taxol (paklitaxel) er et klassisk eksempel på et slikt virkestoff. Når det administreres i dets for tiden godkjente formulering i form av cremaphor/etanol, frembringer Taxol myelosuppressive effekter som begrenser den

gjentatte administrering av virkestoffet og forhindrer fornyet behandling av en pasient i løpet av minst 3 uker med sikte på å tillate at pasientens blodtall vender tilbake til normalen. Det ble postulert at på grunn av den ugiftige biokompatible egenskap til virkestoffbæreren når det gjelder visse aspekter av den foreliggende oppfinnelse, dvs.
5 humant albumin, kan de giftige bivirkninger av myelosuppressjon i stor grad reduseres.

Sprague Dawley-rotter ble gitt paklitaksel i kommersiell formulering (tilgjengelig via Bristol Myers Squibb (BMS) i cremaphor/etanol, heretter betegnet Taxol) eller som fremstilt ved en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen i form av nanopartikler med
10 albumin. Begge formuleringer ble administrert ved haleveneinjeksjon. Et enkelt dosenivå på 5 mg/kg ble administrert for Taxol-formuleringen, mens to dosenivåer på 5 mg/kg og 12 mg/kg ble administrert for formuleringen ifølge oppfinnelsen. Tallene for hvite blodceller for rottene ble overvåket daglig etter administrering som en indeks for myelosuppressjon.

15 For Taxol-formuleringen (5 mg/kg) ble det funnet at WBC-tallene falt med 47,6% og 63,5% på hhv. dag 1 og dag 2 etter administrering, mens for formuleringen ifølge oppfinnelsen med 5 mg/kg, økte WBC-tallene med hhv. 14,7% og 2,4% på dag 1 og dag 2. For formuleringen ifølge oppfinnelsen med høyere dose på 12 mg/kg, økte WBC-
20 tallene med hhv. 6,5% og 3,6% på dag 1 og dag 2.

Disse resultater indikerer at korttidsmyelosuppressjon i stor grad reduseres ved administrering av virkestoffet i den foreliggende formulering ifølge oppfinnelsen.

En annen indikator på generell giftighet er dyrets kroppsvekt. Kroppsvekter for rottene
25 ble også overvåket etter administrering av paklitaksel. Ved en dose på 5 mg/kg, resulterte Taxol-formuleringen i en reduksjon av kroppsvekt med 10,4% på 3 dager etter administrering, mens den samme dose av paklitaksel som ble administrert i formuleringen ifølge oppfinnelsen resulterte i bare 3,9% fall i kroppsvekt, noe som viser den i stor grad reduserte giftighet av formuleringen ifølge oppfinnelsen.

30 Det er meget overraskende at når formuleringen ifølge oppfinnelsen og Taxol administreres til rotter i ekvivalente doser paklitaksel, resulterer en meget høyere grad av myelosuppressjon for Taxol-gruppen sammenlignet med formuleringsgruppen ifølge oppfinnelsen. Dette kan resultere i lavere forekomster av infeksjoner og feberepisoder
35 (eksempelvis febril neutropeni). Det kan også redusere syklustiden mellom behandlinger, noe som for tiden er 21 dager for Taxol. Med anvendelsen av farmasøytiske preparater som er fremstilt, kan denne syklustid reduseres til 2 uker, 1 uke

eller mindre, noe som muliggjør mer effektiv behandling av cancere. Således kan anvendelsen av farmasøytiske preparater som fremstilles frembringe vesentlig fordel sammenlignet med Taxol.

5 Eksempel 54

Administrering av bolusdose av nanopartikkelformulering

Anticancervirkestoffet paklitaksel, i dets kommersielle BMS-formulering med cremaphor/etanol, kan ikke administreres som en intravenøs bolus. Dette skyldes den
 10 omfattende giftighet av bæreren, noe som resulterer i alvorlige anafylaktiske reaksjoner og krever at pasienter som mottar virkestoffet premedikeres med steroider, antihistaminer og lignende. Taxol-formuleringen administreres som en intravenøs infusjon som varer et eller annet sted mellom fra 1 time til 24 timer. Som kontrast, kan formuleringer ifølge den foreliggende oppfinnelse, på grunn av anvendelsen av en
 15 ugiftig bærer, med letthet administreres til en pasient i form av en intravenøs bolus (dvs. i en periode på mindre enn 1 time) uten de giftighetsproblemer som ses i Taxol-formuleringen, hvilken benyttes klinisk i dag.

Den virksomme dose av paklitaksel for en pasient ligger typisk mellom 200-500 mg, avhengig av pasientens kroppsvekt eller kroppsoverflate. Taxol må administreres ved en
 20 endelig doseringskonsentrasjon på 0,6 mg/ml, noe som krever store infusjonsvolumer (typisk i området ca. 300-1000 ml). I motsetning til dette, har formuleringene ifølge oppfinnelsen ikke disse begrensninger og kan administreres i en ønsket konsentrasjon. Dette gjør det mulig for klinikerne å behandle pasienter ved hjelp av en hurtig
 25 intravenøs bolus som kan administreres på så lite som noen få minutter. Eksempelvis dersom formuleringen ifølge oppfinnelsen er rekonstituert til en doseringskonsentrasjon på 20 mg/ml, er infusjonsvolumet for en samlet dose på 200-500 mg bare hhv. 10-25 ml. Dette er en stor fordel i klinisk praksis.

30 Eksempel 55

Reduksjon i giftighet av paklitaksel i nanopartikkelformuleringen sammenlignet med Taxol

Det er velkjent at anticancervirkestoffet paklitaksel, i dets kommersielle formulering
 35 med cremaphor/etanol (dvs. Taxol), har omfattende giftighet som resulterer i alvorlige anafylaktiske reaksjoner og krever at pasienter som mottar virkestoffet premedikeres

med steroider, antihistaminer og lignende. Giftigheten av BMS-formuleringen ble sammenlignet med nanopartikkelformuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelse.

Således ble formuleringene injisert intravenøst gjennom halevenen til C57BL-mus ved ulike dosenivåer og giftige effekter ble overvåket ved generell observasjon av mus etter injeksjonen.

For Taxol var en dose på 30 mg/kg ensartet dødelig innen 5 minutter etter intravenøs administrering. For den samme dose, fremviste nanopartikkelformuleringen ifølge oppfinnelsen ingen synlige giftige virkninger. Nanopartikkelformuleringen fremviste i en dose på 103 mg/kg en viss reduksjon i kroppsvekt for musene, men endog denne høye dose var ikke dødelig. Doser på ca. 1000 mg/kg, 800 mg/kg og 550 mg/kg var alle dødelige, men adskilte seg i tid frem til dødelighet, noe som varierte mellom noen få timer til 24 timer. Således er den dødelige dose for formuleringen ifølge oppfinnelsen større enn 103 mg/kg, men mindre enn 550 mg/kg.

Det er derfor klart at den dødelige dose av paklitaksel for formuleringen ifølge oppfinnelsen er vesentlig høyere enn den for Taxol-formulering. Dette har stor betydning i klinisk praksis hvor høyere doser av kjemoterapeutiske virkestoffer kan administreres for mer effektiv onkolyttisk aktivitet med større redusert giftighet.

Eksempel 56

Bestemmelse av LD₅₀ i mus med hensyn til Taxol som er fremstilt ved fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen og taksol etter en enkeltstående intravenøs administrering

LD₅₀ for Capxol™, Taxol og deres ledsagende bærere ble sammenlignet etter en enkeltstående intravenøs administrering. Samlet ble 48 CD1-mus benyttet. Paklitakseldoser på 30, 103, 367, 548 og 822 mg/kg ble testet med hensyn til Capxol™, og doser på 4, 6, 9, 13,4 og 20,1 mg/kg paklitaksel for Taxol. Dosen for humant albumin, bæreren for Capxol™, ble utelukkende testet ved 4,94 g/kg (svarer til en dose på 548 mg/ml Capxol™) fordi humant albumin ikke betraktes som giftig for mennesker. De testede doser for Taxol-bæreren ("Cremophor EL") var 1,5, 1,9, 2,8 og 3,4 ml/kg, noe som svarer til doser på hhv. 9, 11,3, 16,6 og 20,1 mg/kg paklitaksel. 3 til 4 mus ble dosert med hver konsentrasjon. Resultatene indikerte at paklitaksel som administrert i Capxol™ er mindre giftig enn Taxol eller Taxol-bæreren derav som administrert alene. LD₅₀ og LD₁₀ for Capxol™ var 447,4 og 371,5 mg/kg paklitaksel, 7,53 og 5,13 mg/kg paklitaksel i Taxol, og 1325 og 794 mg/kg for Taxol-bæreren, (svarer til en dose på

15,06 og 9,06 mg/kg Taxol). I denne studie, var LD₅₀ for Capxol™ 59 ganger større enn Taxol og 29 ganger større enn Taxol-bæreren alene. LD₁₀ for paklitaksel i Capxol™ var 72 ganger større enn paklitaksel i Taxol. Gjennomgang av alle data i denne studie antyder at Taxol-bæreren er ansvarlig for mye av giftigheten til "Taxol". Det ble sett at mus som mottok Taxol og Taxol-bærer fremviste klassiske tegn på alvorlig hypersensitivitet som indikert ved lyst rosa skinnfarging kort tid etter administrering. Ingen slik reaksjon ble sett for grupper med Capxol™ og Capxol™-bærer. Resultatene er presentert i tabell 2.

10 Tabell 2

Enkeltstående intravenøs administrering						
Gruppe	Dose (mg/kg)	Antall dyr (n)	Antall dødsfall	% Overlevelse	LD ₅₀ (mg/kg)	MTD eller LD ₁₀ (mg/kg)
Oppfinnel sen	822	3	3	0	447,4	371,5
	548	4	4	0		
	367	3	0	100		
	103	3	0	100		
	30	3	0	100		
Taxol	20,1	4	4	0	7,53	5,13
	13,4	4	4	0		
	9	3	2	33		
	6	4	1	75		
	4	3	0	100		

Disse høye doser av Capxol™ ble administrert som bolusinjeksjoner og representerer ekvivalenten til ca. 80-2000 mg/m² dose i mennesker. LD₁₀ eller maksimalt tolerert dose av Capxol™ i denne studie er ekvivalent med ca. 1000 mg/m² hos mennesker. Dette er signifikant høyere enn den godkjente dose for mennesker på 175 mg/m² for Taxol.

Til oppfinnernes overraskelse, ble det funnet at bæreren, cremophor/etanol, alene forårsaket alvorlige hypersensitivitetsreaksjoner og død i flere dosegrupper av mus. LD₅₀-data for Taxol-bæreren alene viser at den er betraktelig mer giftig enn Capxol™, og signifikant bidrar til giftigheten av Taxol. Årsaken til hypersensitivitet har vært uklar i litteraturen, imidlertid, på basis av disse data, antar oppfinnerne at HSR'ene kan skyldes Taxol-bæreren.

Eksempel 57Bestemmelse av LD₅₀ i mus for Taxol™ og Taxol etter multippel intravenøs5 administrering

LD₅₀ for Capxol™ og BMS-Taxol og deres bærere ble sammenlignet etter multiple intravenøse administreringer. Samlet ble 32 CD1-mus benyttet. Capxol™ med paklitakseldoser på 30, 69 og 103 mg/kg ble administrert daglig i løpet av 5 påfølgende dager. Taxol med paklitakseldoser på 4, 6, 9, 13,4 og 20,1 mg/kg ble administrert daglig
 10 i løpet av 5 påfølgende dager. 4 mus ble dosert med hver konsentrasjon. Resultatene er presentert i tabell 3.

Tabell 3

15 Multiple intravenøse administreringer

Gruppe	Dose (mg/kg)	Antall dyr	Antall dødsfall	Antall overlevende	LD ₅₀ (mg/kg)	MTD eller LD ₁₀
Capxol™	103	4	4	0	76	64
	69	4	1	75		
	30	4	0	100		
Taxol	20,1	4	4	0	8,0	4,3
	13,4	4	4	0		
	9	4	2	50		
	6	4	1	75		
	4	4	0	100		

Resultatene indikerte at Capxol™ er mindre enn Taxol. LD₅₀ og LD₁₀ for Capxol™ var hhv. 76,2 og 64,5 mg/kg paklitaksel, sammenlignet med hhv. 8,07 og 4,3 mg/kg
 20 paklitaksel i Taxol. I denne studie, var LD₅₀ for Capxol™ 9,4 ganger høyere enn for Taxol. LD₁₀ for Capxol™ var 15 ganger høyere for Capxol™ enn for Taxol. Resultatene i denne studie antyder at Capxol™ er mindre giftig enn Taxol når det administreres i multiple doser med daglige intervaller.

Eksempel 58Giftighet og effektivitet av to formuleringer av Capxol™ og Taxol®

En studie ble utført for å bestemme effektiviteten av Capxol™, Taxol og Capxol™-
 5 bæreren hos atymiske NCru hunnmus som var implantert med MX-1 menneskelige
 mammaske tumorfragmenter.

Grupper på 5 mus hver ble gitt intravenøse injeksjoner av Capxol™-formuleringer VR-
 3 eller VR-4 i doser på 13,4, 20, 30, 45 mg/kg/dag i løpet av 5 dager. Grupper på 5 mus
 10 ble også hver for seg gitt intravenøse injeksjoner av Taxol i doser på 13,4, 20 og 30
 mg/kg/dag i løpet av 5 dager. En kontrollgruppe på 10 mus ble behandlet med en
 intravenøs injeksjon av Capxol-bærerkontroll (humant albumin, 600 mg/kg/dag) i løpet
 av 5 dager. Evalueringsparametere var antallet fullstendige tumorregressjoner, den
 gjennomsnittlige varighet av fullstendig regressjon, tumorfrie overlevende og
 15 tumorgjenopptreden.

Behandling med Capxol™-formulering VR-3 resulterte i fullstendige tumorregressjoner
 på alle dosenivåer. De to høyeste doser resulterte i 100% overlevelse etter 103 dager.
 Capxol™-formulering VR-4 resulterte i fullstendig tumorregressjon i de tre høyeste
 20 dosegrupper, og 60% regressjoner ved 13,4 mg/kg/dag. Overlevelsesserater etter 103
 dager var noe mindre enn med formuleringen VR-4 [*sic*]. Behandling med Taxol ved
 30, 20 og 13,4 mg/kg/dag resulterte i 103 dagers overlevelsesserater på hhv. 40%, 20% og
 20%. Behandling med kontrollbæreren hadde ingen effekt på tumorvekst og dyrene ble
 avlivet etter 33 til 47 dager. Resultatene er presentert i tabell 4.

25

Tabell 4

Dosering (mg/kg/dag)	CR/totalt			TSF/TR			DCR (dager)			Uspesifikke dødsfall/totalt		
	VR-	VR-	TAX	VR-3	VR-4	TAX	VR-3	VR-4	TAX	VR-	VR-4	TAX
45	5/5	5/5	NA	5/0	3/2	NA	>88	>73	NA	0/5	0/5	NA
30	5/5	5/5	4/4	5/0	5/0	2/2	>88	>88	>56	0/5	0/5	1/5
20	5/5	5/4	4/4	¼	2/3	1/3	>51	>47	>57	0/5	0/5	1/5
13	4/5	3/5	4/5	0/5	0/5	¼	10	8	>29	0/5	0/5	0/5

CR = Fullstendig tumorregressjon;

30 TFS = tumorfrie overlevende;

TR = tumorgjenopptreden;

DCR = dager med fullstendig regressjon.

Disse uventede og overraskende resultater viser en økende effektivitet for de to

- 5 “Capxol-formuleringer sammenlignet med Taxol. Dessuten, oppnås høyere doser med paklitaksel i Capxol™-gruppene på grunn av lavere giftighet av formuleringen. Disse høye doser ble administrert som bolusinjeksjoner.

Eksempel 59

10

Blodkinetikk og vevsfordeling for ^1H -Taxol®- og Capxol™ etter en enkeltstående intravenøs dose i rotten

- To studier ble utført for å sammenligne farmakokinetikk og vevsfordeling av ^3H -paklitaksel formulert i Capxol™- og Taxol-injeksjonskonsentrat. 14 hannrotter ble
15 intravenøst injisert med 10 mg/kg ^3H -Taxol og 10 rotter med 4,9 mg/kg. 10 hannrotter ble intravenøst injisert med 5,1 mg/kg ^3H -Capxol i den ovennevnte studie.

- Nivåer for både total radioaktivitet og paklitaksel minsker bifasialt i blod av rotter etter 5 mg/kg IV bolusdoser på enten ^3H -Taxol eller ^3H -Capxol™. Imidlertid er nivåene for
20 både total radioaktivitet og paklitaksel signifikant lavere etter administrering av ^3H -Capxol™ etter en lignende ^3H -Taxol-dose. Dette lavere nivå blir hurtigere fordelt ut av blodet.

- Blod-HPLC-profilen fremviser et lignende mønster for metabolisme til i høy grad
25 polar(e) metabolitt(er) for både ^3H -Capxol™ og ^3H -Taxol. Imidlertid synes hastigheten for metabolisme signifikant lavere for ^3H -Capxol idet 44,2% av blodets radioaktivitet er igjen som paklitaksel 24 timer etter dose versus 27,7% for ^3H -Taxol. Utskillingen av radioaktivitet opptrer utelukkende minimalt i urinen og hovedsakelig i feces for ^3H -Capxol™, hvilket ligner på rapporterte ekskresjonsmønstre for ^3H -Taxol.
30 Blodkinetikken for samlet radioaktivitet og paklitaksel etter IV-administrering av ^3H -Capxol™ eller ^3H -Taxol med 5 mg/kg er presentert i tabell 5.

Tabell 5

Behandling	AUD ₀₋₂₄ (mg ekv. time/ml)	Ekstrapolert C ₀ (mg ekv./ml)	Observert C _{max} (mg ekv./ml)	Observert T _{max} (time)	t _{1/2β} (time)
Total radioaktivitet					
³ H-Capxol™	6,1	7,6	4,2	0,03	19,0
³ H-Taxol	10,2	19,7	13,5	0,03	19,7
Paklitaksel					
³ H-Capxol™	3,7	7,0	4,0	0,03	11,4
³ H-Taxol	5,4	17,1	11,8	0,03	7,2

- Radioaktivitetsnivåene for vev er høyere etter ³H-Capxol™-administrering enn for ³H-Taxol-administrering for 12 av 14 vev. Forholdene mellom ppm for vev/blod er høyere i alle vev for ³H-Capxol™-doserte dyr idet blodnivåene er lavere. Dette støtter den hurtige fordeling av ³H-Capxol™ fra blodet til vevene som antydes ved hjelp av blodkinetikdata.
- ³H-Paklitaksel som formulert i Capxol™ viser en lignende farmakokinetisk profil som for ³H-paklitaksel formulert i Taxol® for injeksjonskonsentrat, men forholdene for ppm i vev/blod og metaboliseringsrater adskiller seg signifikant. Et signifikant lavere nivå av total radioaktivitet for Capxol™-behandlede dyr enn for Taxol®-behandlede dyr i blodprøven 2 minutter etter administrering indikerer at ³H-Capxol blir mer hurtig fordelt ut av blodet. Imidlertid synes metaboliseringshastigheten signifikant langsommere for ³H-Capxol™ idet 44% av blodreaktiviteten er igjen som paklitaksel på tidspunktet 24 timer etter administrering versus 28% for ³H-Taxol®.

- Dette funn for Capxol™ er overraskende og frembringer en ny formulering til oppnåelse av vedholdende aktivitet av paklitaksel sammenlignet med Taxol. Sett i sammenheng med lokale høye konsentrasjoner, burde denne forbedrede aktivitet resultere i økt effektivitet for behandlingen av primære tumorer eller metastaser i organer med høye lokale konsentrasjoner. Vevsfordelinger er presentert i tabell 6 i det følgende. Data representerer gjennomsnitt og standardavvik for 10 rotter i hver gruppe (Capxol™ og Taxol).

Tabell 6

Radioaktive rester i vev fra hannrotter, uttrykt som ppm etter en enkeltstående intravenøs dose av ³H-Capxol™ og ³H-Taxol® med 5 mg/kg

5

Prøve	Capxol™ Snittverdier	± SD	Taxol Snittverdier	± SD
Hjerne	0,106	0,008	0,145	0,020
Hjerte	0,368	0,063	0,262	0,037
Lunge	1,006	0,140	0,694	0,057
Lever	1,192	0,128	1,37	0,204
Nyre	0,670	0,110	0,473	0,068
Muskel	0,422	0,120	0,386	0,035
GI trakt	0,802	0,274	0,898	0,243
Testikler	0,265	0,023	0,326	0,047
Pankreas	0,963	0,357	0,468	0,070
Skrott	0,596	0,070	0,441	0,065
Ben	0,531	0,108	0,297	0,051
Milt	0,912	0,131	0,493	0,070
Prostata	1,728	0,356	1,10	0,161
Seminal	1,142	0,253	1,20	0,237
Blodkar	0,131	0,010	0,181	0,020
Plasma	0,131	0,012	0,196	0,026

Disse data viser signifikant høyere nivåer for akkumulering av Capxol™ i flere organer under sammenligning med Taxol®. Disse organer inkluderer prostata, pankreas, nyre, lunge, hjerte, ben og milt. Således kan Capxol™ være mer effektiv enn Taxol® i
10 behandlingen av cancere i disse organer ved ekvivalente doser med paklitaksel.

Nivåer i prostatavevet er av særskilt interesse i behandlingen av prostatakraft. Dette overraskende og uventede resultat har implikasjoner for behandlingen av prostatakraft. Tabell 7 i det følgende viser data for individuelle rotter (10 i hver gruppe) som viser økt
15 akkumulering av paklitaksel i prostata for Capxol™ sammenlignet med Taxol®. Basis for lokaliseringen innen prostata kunne være et resultat av formuleringens partikkelstørrelse (20-400 nm), eller tilstedeværelsen av proteinet albumin i de formuleringer som kan forårsake lokalisering i det prostatiske vev gjennom spesifikke

membranreseptorer (gp 60, gp 18, gp 13 og lignende). Det er også trolig at andre biokompatible, biodegraderbare polymerer utover albumin kan fremvise spesifisitet overfor visse vev, slik som prostata, noe som resulterer i høyere lokal konsentrasjon av paklitaksel i disse vev som et resultat av de egenskaper som er beskrevet i det foregående. Slike biokompatible materialer er ment å skulle befinne seg innen rekkevidden av den foreliggende oppfinnelse. En foretrukken utførelsesform av et preparat til oppnåelse av høye lokale konsentrasjoner av paklitaksel i prostata er en formulering som inneholder paklitaksel og albumin med en partikkelstørrelse i området 20-400 nm, og fri for cremophor. Denne utførelsesform har også vært vist å resultere i konsentrasjoner av paklitaksel på høyere nivåer i pankreas, nyre, lunge, hjerte, ben og milt ved sammenligning med Taxoli ekvivalent doser.

Tabell 7

Data for 10 rotter i hver gruppe
Dose 5 mg/kg paklitaksel

taxol iflg oppfinnelsen		Taxol®	
	1,228		1,13
	2,463		1,04
	1,904		0,952
	1,850		1,42
	1,660		1,31
	1,246		1,08
	1,895		1,03
	1,563		0,95
	1,798		0,94
	1,676		1,18
Snitt	1,728	Snitt	1,103
SD	0,36	SD	0,16

Disse data viser at lokaliseringen av Capxol™ til prostata er ca. 150% sammenlignet med Taxol®.

Den uventede lokalisering av paklitaksel til prostata i Capxol™-formuleringen kan utnyttes for tilførsel av andre farmakologisk virksomme midler til prostata for behandling av andre sykdomstilstander som påvirker dette organ, eksempelvis

antibiotika i en lignende formulering for behandling av prostatitt (inflammasjon og infeksjon av prostata), terapeutiske midler som er virksomme i behandlingen av godartet prostatisk hypertrofi kan formuleres på en lignende måte for å oppnå høy lokal tilførsel. På lignende måte, kan det overraskende funn at Capxol™ frembringer høye lokale konsentrasjoner til hjertet utnyttes for behandling av restenose såvel som aterosklerotisk sykdom i koronarkar. Paklitaksel har vært demonstrert å ha en terapeutisk effekt i forebyggelsen av restenose og aterosklerose, og Capxol™ er således en ideell bærer. Videre har det vært demonstrert at polymerisert albumin fortrinnsvis bindes til inflammerte indoteliale kar muligens gjennom gp60-, gp18- og gp13-reseptorer.

Eksempel 60

Blodkinetikk og vevsfordeling for paklitaksel etter multiple intravenøse dosenivåer av Capxol™ i rotten

Studien ved anvendelse av ^3H -Capxol™ ble supplert ved behandling av fire ytterligere grupper av rotter med en enkeltstående bolusdose på 9,1 mg/kg, 26,4 mg/kg, 116,7 mg/kg og 148,1 mg/kg med paklitaksel i Capxol™. Blod ble oppsamlet fra halevenen og AUD_{0-24} ble beregnet. Etter 24 timer, ble blodprøver samlet opp, ekstrahert og ekstraktet ble injisert på HPLC for å bestemme nivået av opphavsforbindelsen i blodet.

Blodkinetikken for total radioaktivitet og paklitaksel etter IV-administrering av ^3H -Capxol™ er presentert i tabell 8.

Tabell 8

Gruppe/dose (mg/kg)	AUD_{0-24} (μg ekv. time/ml)	Ekstrapolert C_0 (μg ekv./ml)	Observert $C_{\max}$ (μg ekv./ml)	Observert $T_{\max}$ (time)	$t_{1/2\beta}$ (time)
A/9,1	11,5	10,2	7,19	0,03	22,3
B/26,4	43,5	44,8	29,5	0,03	16,0
C/116,7	248,9	644,6	283,3	0,03	8,48
D/148,1	355,3	1009,8	414,2	0,03	9,34

Idet dosen av paklitaksel ble økt, økte arealet under kurven proporsjonalt. Nivået av opphavsforbindelsen etter 24 timer ble økt med en faktor på 8,5 (0,04 ppm - 0,34 ppm), ved å gå fra dosen 9 mg/kg til dosen 148 mg/kg.

Eksempel 61Bestemmelse av giftigheten i rotter av Capxol™ og Taxol etter en enkeltstående intravenøs administrering

- 5 Målet med studien var å bestemme giftigheten av Capxol™ etter en enkeltstående IV-administrering i hann- og hunnrotter. Capxol™ ble administrert til 6 hann- og 6 hunnrotter i doser på 5, 9, 30, 90 og 120 mg/kg. Halvparten av dyrene fra hver dosegruppe ble eutanisert og obdusert på dag 8. De gjenværende dyr ble obdusert på dag 31. Resultatene av Capxol™-behandlede dyr ble sammenlignet med resultatene for
- 10 normalt saltvann og bærerkontrollgrupper såvel som med resultatene av dyr som ble behandlet med 5, 9 og 30 mg/kg Taxol.

- Dyrene ble undersøkt straks etter dosering, 1 time og 4 timer etter administrering, og en gang om dagen deretter. Blod ble oppsamlet fra hvert dyr for hematologisk og serum-
- 15 bestemmelse forut for eutanasi.

- 13 dødsfall opptrådte i løpet av observasjonsperioden på 30 dager. Alle 12 dyr som ble behandlet med Taxol i en dose på 30 mg/kg paklitaksel døde innen dag 4. Utelukkende et dyr som var behandlet med Capxol™ døde. Det Capxol™-behandlede dyr mottok 90
- 20 mg/kg paklitaksel og ble funnet død på dag 15. Ingen andre dyr som var behandlet med Capxol™ døde ved dosen 90 mg/kg eller 120 mg/kg, derfor antas døden ikke å være relatert til behandlingen.

- I løpet av den første observasjonsperiode på 4 timer, ble piloereksjon og sjanglende
- 25 gange observert i flesteparten av de dyr som var behandlet med Taxol, muligens på grunn av alkoholinnholdet i medisinen. Piloereksjon ble også bemerket i noen få dyr som var behandlet med Capxol™. Dyr behandlet med Taxol i en dose på 30 mg/kg paklitaksel ble observert med piloereksjon og letargi og ble funnet døde på dag 4. Ingen åpne tegn på giftighet ble observert i Capxol™-behandlede dyr, bortsett fra noen få
- 30 tilfeller av piloereksjon ved dosenivåer på 90 mg/ml og 120 mg/ml.

- Ingen abnormaliteter ble rapportert i Capxol™-behandlede dyr. Resultater av grov obduksjon på dag 8 og dag 31 var normale. Signifikante doserelaterte endringer ble sett i de hannlige reproduktive organer i dyr som var behandlet med Capxol™. En
- 35 degenerering og vakuolering av epididymale duktale epiteliale celler, ofte ledsaget av multifokalt interstitielt lymfocytisk infiltrat, ble observert. Det var også økende alvorlig atrofi av seminiferøse tubuler sett i testes idet dosen med Capxol™ økte. Ifølge

patologens mening, ble det observert signifikante lesjoner i de hannlige reproduktive organer hos de dyr som var behandlet med 9, 30, 90 og 120 mg/kg Capxol™. Disse endringer involverte diffus degenerering og nekrose av testiklene. Disse endringer var de mest prevalente i dyr som mottok høyere doser med Capxol™. Ingen endringer ble sett i testiklene fra ubehandlede kontrolldyr, bærerkontrolldyr eller de som var behandlet med Taxol.

Dette funn er uventet og har signifikante terapeutiske implikasjoner for behandlingen av hormonavhengige cancere slik som prostatakrefte. Fjerning av testiklene (orkidektomi) er en terapeutisk tilnærming til behandlingen av prostatakrefte. Capxol™ representerer en ny formulering for behandlingen av denne sykdom ved oppnåelse av høy lokal konsentrasjon av paklitaxel på dette punkt, ved vedholdende aktivitet av den aktive bestanddel, ved reduksjon av testikulær funksjon og uten den giftige bærer cremophor. Behandling med Capxol™ muliggjør derfor reduksjon i nivåer av testosteron og andre androgene hormoner.

Cerebral kortikal nekrose ble sett på det midlere dosenivå hos Taxol-behandlede dyr. Dette kan forklare dødsfallene for dyr som ble behandlet med enda høyere doser av Taxol. Ingen cerebrale lesjoner ble sett i dyr som var behandlet med Capxol™.

Denne mangel på cerebral eller neurologisk giftighet er overraskende og har signifikante implikasjoner både for behandlingen av hjernetumorer og for evnen til å oppnå høye systemiske doser som spenner fra 5-120 mg/kg i rotter (ekvivalent med 30-700 mg/m² dose hos mennesker).

For å oppsummere, var Capxol™ betydelig mindre giftig enn Taxol. Ingen Taxol-dyr overlevde med doser på over 9 mg/kg. Med unntak av et tilfeldig dødsfall ved 90 mg/kg Capxol™, overlevde alle dyr som mottok Capxol™ ved doser opptil og inklusive 120 mg/kg. Det var en høydoserelatert effekt av Capxol™ på de hannlige reproduktive organer og en undertrykkelse i hanners kroppsvekt. Hunnrotter demonstrerte ikke noen giftige effekter fra administreringen av Capxol™ ved doser opptil og inklusive 120 mg/kg. Disse høye doser ble administrert som bolusinjeksjoner og representerer ekvivalenten til 30-700 mg/m² dose hos mennesker.

Eksempel 62

Farmakokinetiske (PK) data for cyklosporin-nanopartikler (Capsorin I.V.) etter intravenøs administrering (sammenligning med Sandimmun I.V.-formulering for tiden markedsført av Sandoz)

Nanopartikler av cyklosporin (Capsorin I.V.) som var fremstilt i det foregående (eksemplene 13 og 14) ble rekonstituert i saltvann og administrert til en første gruppe på 3 Sprague Dawley-rotter ved intravenøs bolus. En andre gruppe på 3 rotter ble gitt Sandimmun I.V., som inneholder cremaphor/etanol, etter fortynning i saltvann. Hver gruppe mottok den samme dose på 2,5 mg/kg cyklosporin. Blodprøver ble tatt ved tidspunktene 0, 5, 15, 30 (minutter), og 1, 2, 4, 8, 24, 36 og 48 (timer). Nivåer av cyklosporin i blodet ble undersøkt ved HPLC og typiske PK-parametere ble bestemt. PK-kurvene viste typisk nedbrytning over tid som følger:

	<u>Nedbrytning over tid</u>	
	AUC, mg-time/ml	Cmax, ng/ml
Capsorin I.V.	12,228	2,853
Sandimmun I.V.	7,791	2,606

Dessuten, på grunn av giftigheten til Sandimmun I.V.-formuleringen, døde 2 av 3 rotter i denne gruppe innen 4 timer etter dosering. Således viser nanopartikkelformuleringen (Capsorin I.V.) ifølge den foreliggende oppfinnelse en større AUD og ingen giftighet sammenlignet med den kommersielt tilgjengelige formuleringen (Sandimmun I.V.).

Eksempel 63

Farmakokinetiske (PK) data for cyklosporin-nanodråper (Capsorin oral) etter oral administrering sammenlignet med Neoral (formulering som for tiden markedsføres av Sandoz)

Nanodråper av cyklosporin som var fremstilt i det foregående ble administrert i appelsinjuice, til en første gruppe på 3 Sprague Dawley rotter ved oral tvangsforing. Hver gruppe mottok samme dose på 12 mg/kg cyklosporin i et identisk volum appelsinjuice. Blodprøver ble tatt på tidspunktene 0, 5, 15, 30 (minutter) og 1, 2, 4, 8, 24, 36 og 48 (timer). Nivåer av cyklosporin i blodet ble undersøkt med HPLC og typiske PK-parametere ble bestemt. PK-kurvene viste typisk nedbrytning over tid som følger:

	<u>Nedbrytning over tid</u>	
	AUC, mg-time/ml	Cmax, ng/ml
Capsorin oral	3,195	887
Neoral	3,213	690

Således viser nanodråpeformuleringen (Capsorin oral) ifølge den foreliggende oppfinnelse en lignende PK-adferd som den kommersielt tilgjengelige formulering
 5 (neoral).

Eksempel 64

Klinisk undersøkelse med Capxol™: Målsettinger og fordeler

10 Begrunnelsen for utvelgelse av den innledningsvise dose for fase I/II-utprøvinger vil bli basert på de dramatisk lave prekliniske giftighetsdata for Capxol™-formuleringen sammenlignet med Taxol-formulering. De prekliniske data i det foregående indikerer at innledningsvise dosenivåer av Capxol™ for fase I/II-studier vil benytte den etablerte MTD (maksimal tolerert dose) for paklitaksel i Taxol-formuleringen. Basert på aktuelle
 15 prekliniske data, forventes det på dette tidspunkt at de kliniske målsettinger for markeds godkjenning vil være å eliminere behovet for premedisinering forut for administrering av paklitaksel; bestemme ekvivalent dose for Capxol™ sammenlignet med Taxol - dvs. å bestemme den dose ved hvilken ekvivalent antitumorrespons oppnås; og eliminere behovet for kontinuerlig i.v. infusjon (3 til 24 timer) for
 20 paklitakseladministrering og erstatte med administrering over meget kortere perioder (< 1 time eller bolus).

Det foreligger mange potensielle fordeler med Capxol™-formuleringen for paklitaksel. Capxol™ er et lyofilisert pulver som utelukkende inneholder paklitaksel og humant
 25 serumalbumin. På grunn av naturen til den kolloidale løsning som dannes ved rekonstituering av det lyofiliserte pulver, er giftige emulgatorer, slik som cremaphor (i BMS-formuleringen av paklitaksel) eller polysorbat 80 (som i Rhone Poulenc-formuleringen av docetaksel), og løsningsmidler slik som etanol for å solubilisere virkestoffet, ikke påkrevet. Fjerning av giftige emulgatorer vil redusere forekomstene av
 30 alvorlig hypersensitivitet og anafylaktiske reaksjoner som er kjent å opptre fra produkter i likhet med Taxol.

Dessuten forventes ingen premedisinering med steroider og antihistaminer forut for administrering av virkestoffet.

På grunn av reduserte giftigheter, noe som vises ved hjelp av LD₁₀/LD₅₀-studiene, kan
5 det benyttes høyere doser, noe som vil resultere i større effektivitet.

Reduksjonen i myelosuppressjon (sammenlignet med Taxol) er forventet å redusere perioden for behandlingssyklusen (for tiden 3 uker) og forbedre terapeutiske utfall.

10 Capxol™ kan administreres i mye høyere konsentrasjoner (opp til 20 mg/ml) sammenlignet med Taxol (0,6 mg/ml), noe som tillater infusjoner med meget lavere volum, og eventuell administrering i form av en intravenøs bolus.

Et erkjent problem med Taxol er utfellingen av paklitaksel i innlagte katetere. Dette
15 resulterer i feilaktig og dårlig kontrollert dosering. På grunn av den iboende stabilitet a den kolloidale løsning hos den nye formulering, Capxol™, lettes problemet med utfelling.

Litteraturen antyder at partikler i de nedre hundre nanometers størrelsesområdet
20 fortrinnsvis partisjoneres inn i tumorer gjennom lekkende blodkar på tumorstedet. De kolloidale partikler av paklitaksel i Capxol™-formuleringen er derfor forventet å fremvise en foretrukket målrettingseffekt, noe som sterkt reduserer bivirkningene av paklitaksel som administrert i BMS-formuleringen.

25 Eksempel 65

Skissering av oppsett for klinisk utprøving av Capxol™

Indikasjon: Metastatisk brystkreft

30

Doseringsplan: Begrunnelsen for å utvelge den innledningsvise dose for fase I/II-utprøvinger vil bli basert på de signifikant lavere prekliniske giftighetsdata (enkeltdose LD₁₀-data hos mus) for Capxol™-formuleringen sammenlignet med BMS-formuleringen. Enkeltdose LD₁₀ i mus er bestemt å være 398,1 mg/kg. Konvertering av
35 denne dose til basis overflateareal (3 ganger verdien for mg/kg) gir et estimat på 1194,3 eller ca. 1200 mg/m². En konservativ utgangsdose på 1/10 av denne verdien for mennesker resulterer i en dose på 120 mg/m². Imidlertid, er det allerede godt etablert at

paklitaksel er trygg i en dose på 175 mg/m² og på basis av en pilotstudie med Capxol™ som viser lavere myelosuppressjon i rotter, bør en dose på 175 mg/m² være trygg for Capxol™-formuleringen. Capxol™-løsningen vil bli tilført i løpet av ca. 15-30 minutter eller mindre, om mulig.

5

Eksempel 66

Skissering av klinisk utviklingsprogram for Capxol™:

Kombinasjonsfase I/II dosefunnstudie/begrenset effektivitetsutprøving

10

Pasienter/formål: Pasienter med avansert metastatisk brystsykdom som er refraktorisk overfor vanlige terapier. Målet med denne utprøving vil være å etablere responshyppigheten for Capxol™ som et enkeltstående middel i pasienter med metastatisk brytkreft.

15

Dosering - Fase I -komponent: Den innledningsvise dose som skal benyttes i fase I-komponenten av utprøvingen vil være den kjente maksimale tolererte dose (MTD) for Paklitaksel (175 mg/m²). Påfølgende doser vil bli opptrappet i 25% trinn inntil MTD nås. Det vil være 3 pasienter i hver av de innledningsvise Capxol™-dosenivåer, som
 20 ekspanderes til 6 pasienter ved MTD. Evnen til å bevege seg til neste dosenivå vil bli basert på mønsteret av skadelige hendelser. Det vil si, studien vil bli avbrutt når eventuelt 2 eller pasienter av 6 på et bestemt dosenivå fremviser grad 3 ikke-myelosuppressiv giftighet eller grad 4 myelosuppressiv giftighet (på giftighetsskalaen til WHO). Dosen for Capxol™ vil bli utformet som den dose som umiddelbart går foran
 25 den dose ved hvilken utprøvingen ble avbrutt. Alternative planer for virkestoffadministrering, slik som daglig x 5 eller 24 timers infusjon kan også utforskes om nødvendig, på basis av resultatene fra studien med innledningsvis enkeltdosebolus.

30

Farmakokinetikk: For utvalgte pasienter, vil en fullstendig farmakokinetisk studie bli utført ved anvendelse av serum som tappes ut på passende utvalgte tidspunkter.

Parametere slik som $t^{1/2}$ (α eller β fase), AUC, C_{max} , klarering og volum for fordeling vil bli bestemt.

35

Pasienter - Fase II-komponent: Etter å ha etablert MTD, vil brystkreftpasienter i likhet med de som ble benyttet i de opprinnelige Paklitakselutprøvinger bli utvalgt for fase II-komponenten. Antallet vil bli basert på ønsket om å etablere tumorresponstrate med akseptabel presisjon på 95% konfidensnivå. Som sådan, vil studien ha en arm med det

mål å etablere ekvivalens med vanlig Paklitaksel ved å vise at konfidensintervallene inneholder de forventede reponsrater for Capxol™. Den størrelse av pasientutvalget som benyttes vil være 30 pasienter, noe som er vanlig for fase II-komponenten i en fase I/II-studie.

5

Måling: Det primære utfall vil være tumorrepsionsraten (CR/PR) for de rekrutterte pasienter. Dessuten vil tiden for respons, varighet og respons, samt overlevelsestid bli overvåket. Tryggheten for behandlingen vil også bli evaluert fra hyppighet av skadelige hendelser og endringer i vanlige laboratorieparametere.

P a t e n t k r a v

1.

Formulering av paklitaksel som er egnet til administrering av paklitaksel til et individ
 5 som har behov derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
 omfatter nanopartikler omfattende paklitaksel som har et proteinbelegg, der nevnte
 nanopartikler har en gjennomsnittlig diameter som ikke er større enn ca. 200 nm, der
 mengden paklitaksel avleveres ved en dose på minst 135 mg/m² i løpet av en
 administreringsperiode som ikke varer lengere enn 2 timer.

10

2.

Formulering ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 mengden paklitaksel er tilstrekkelig for å avlevere en dose på minst 175 mg/m²
 paklitaksel.

15

3.

Formulering ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 mengden paklitaksel er tilstrekkelig for å avlevere en dose på minst 250 mg/m²
 paklitaksel.

20

4.

Formulering ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 administreringsperioden ikke er lengre enn 1 time.

25 5.

Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at formuleringen er i lyofilisert form.

6.

30 Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at formuleringen er en dispersjon av
 nanopartikler i væskeform.

7.

35 Formulering ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 formuleringe er i et volum på mindre enn 200 ml.

8.

Formulering av paklitaksel, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
omfatter nanopartikler omfattende paklitaksel som har et proteinbelegg, der nevnte
nanopartikler har en gjennomsnittlig diameter som ikke er større enn 200 nm, og der
5 konsentrasjonen av paklitaksel i formuleringen er minst 2.0 mg/ml og hvor
konsentrasjonen av paklitaksel i formuleringen ikke er 20 mg/ml.

9.

Formulering ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at
10 konsentrasjonen av paklitaksel i formuleringen er 2 - 20 mg/ml.

10.

Formulering ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at
konsentrasjonen av paklitaksel i formuleringen er 5 mg/ml.

15

11.

Formulering ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 10,
k a r a k t e r i s e r t v e d at formuleringen er stabil i minst 3
dager ved enten romtemperatur eller ved kjølige betingelser.

20

12.

Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte paklitaksel administreres
oralt, intramuskulært, intravenøst, intraperitonealt, intraarterielt, intrauretralt, intratekalt
25 eller ved inhalasjon.

13.

Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet er albumin.

30

14.

Formulering ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at
albuminet er humant serum albumin.

35

15.

Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,

k a r a k t e r i s e r t v e d at nanopartiklene er filtrerbare gjennom et 0,22 µm filter.

16.

- 5 Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nanopartiklene er i et størrelsesområde fra 10 – 200 nm.

17.

- 10 Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nanopartiklene er i et størrelsesområde fra 50 – 170 nm.

18.

- 15 Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nanopartiklene er sterilfiltrert.

19.

- Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at paklitaksel i nanopartiklene er amorf.

20.

- Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at nanopartiklene er suspendert i en biokompatibel vandig væske.

21.

- Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at nanopartiklene i formuleringen har en kjerne som hovedsakelig er fri for en polymer matriks.

22.

- Formulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, for anvendelse ved
35 behandling av kreft.

23.

Formulering ifølge krav 22, k a r a k t e r i s e r t v e d at kreftformen er prostatakraft, orkidektomi, pankreaskraft eller hjernetumor.

s 24.

Formulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 21 for behandling av restenoser.

1/4

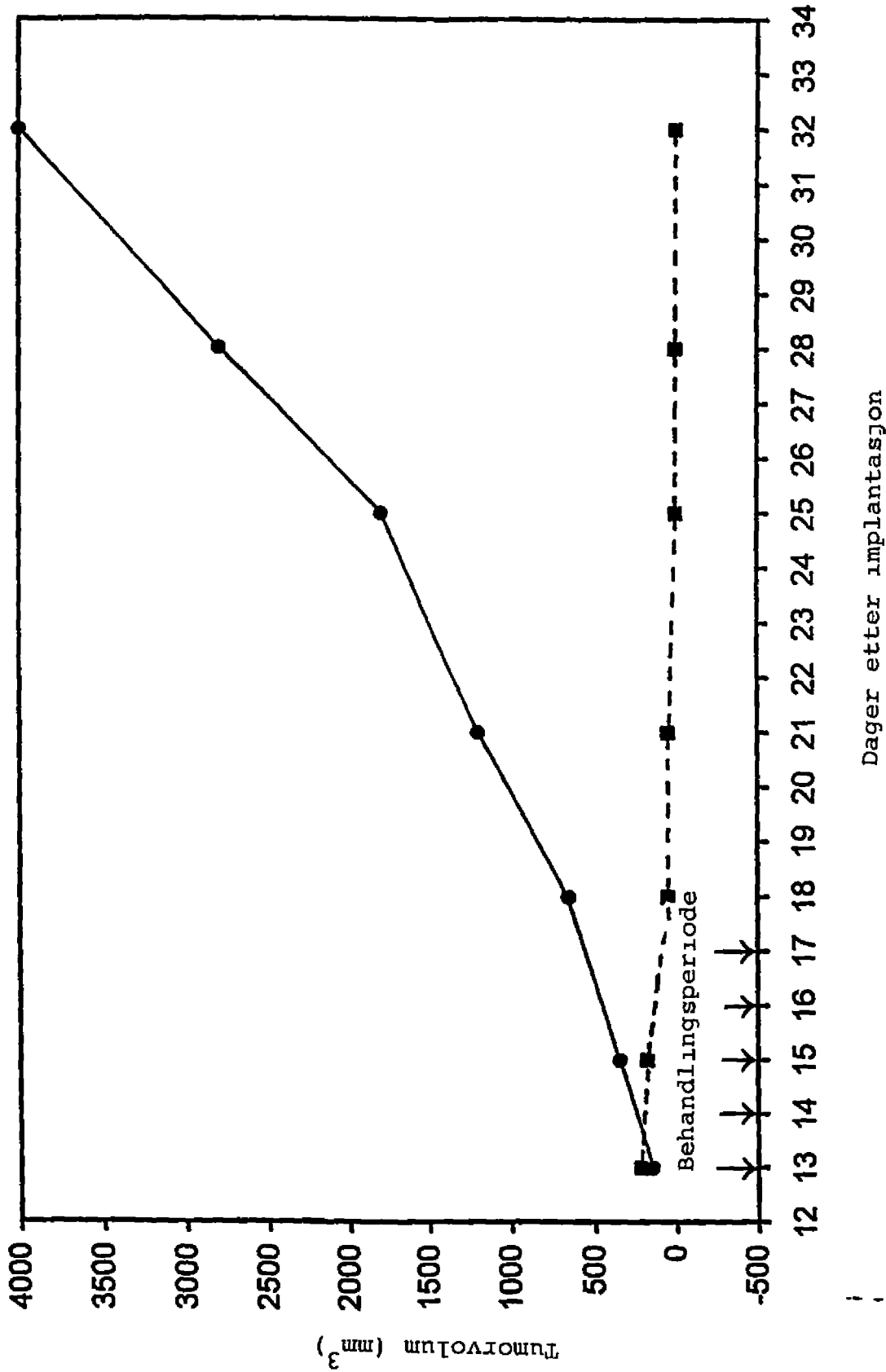
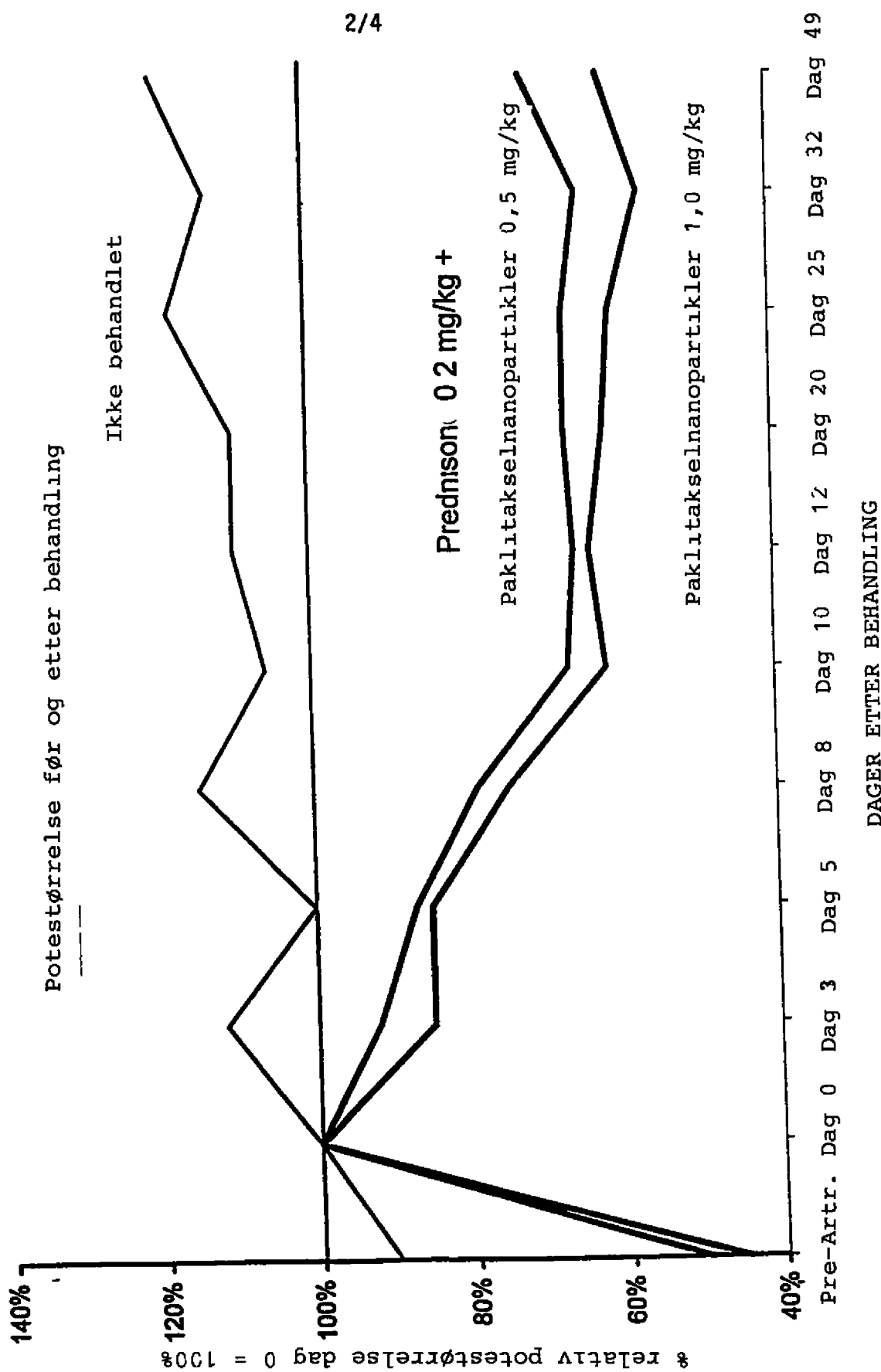
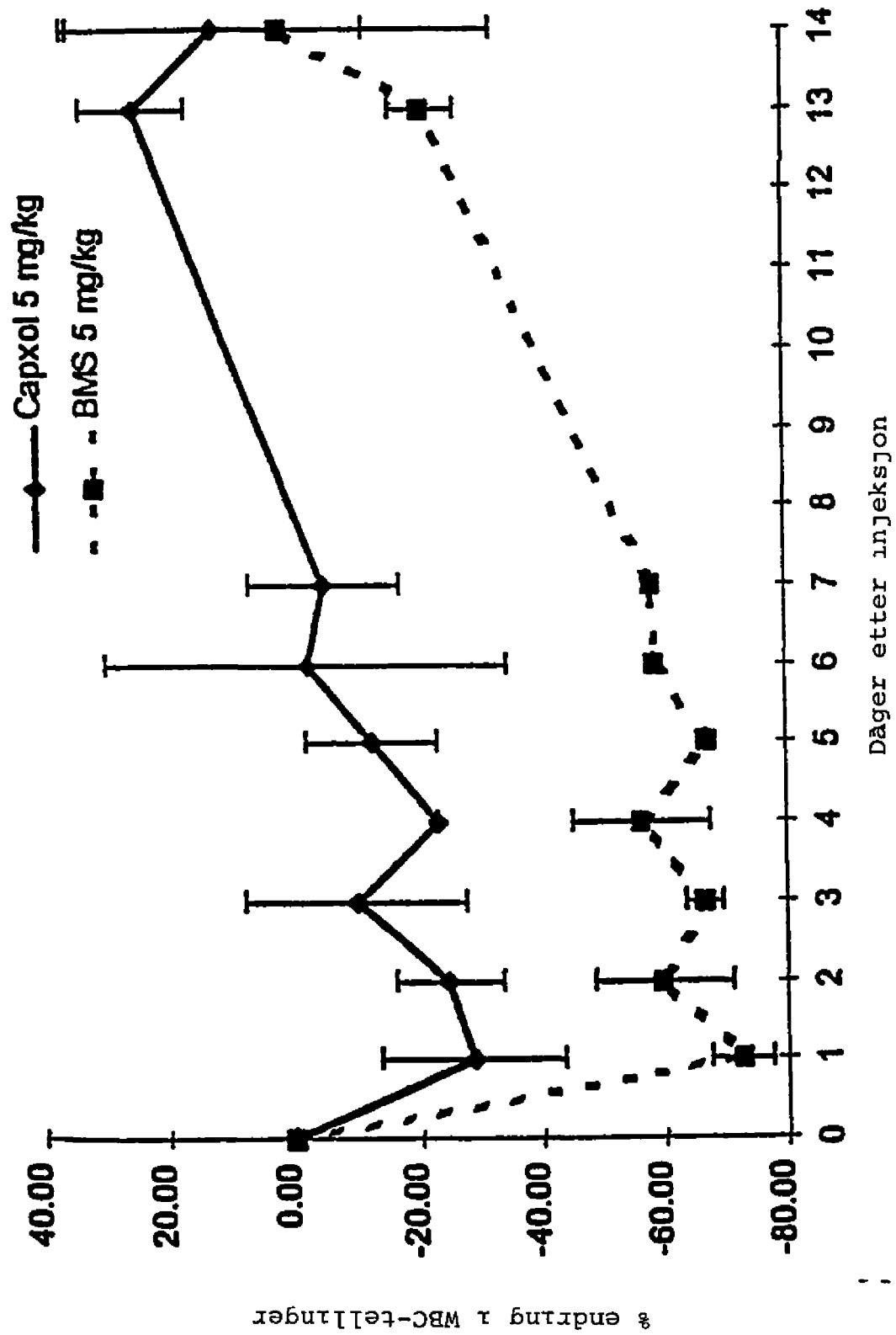


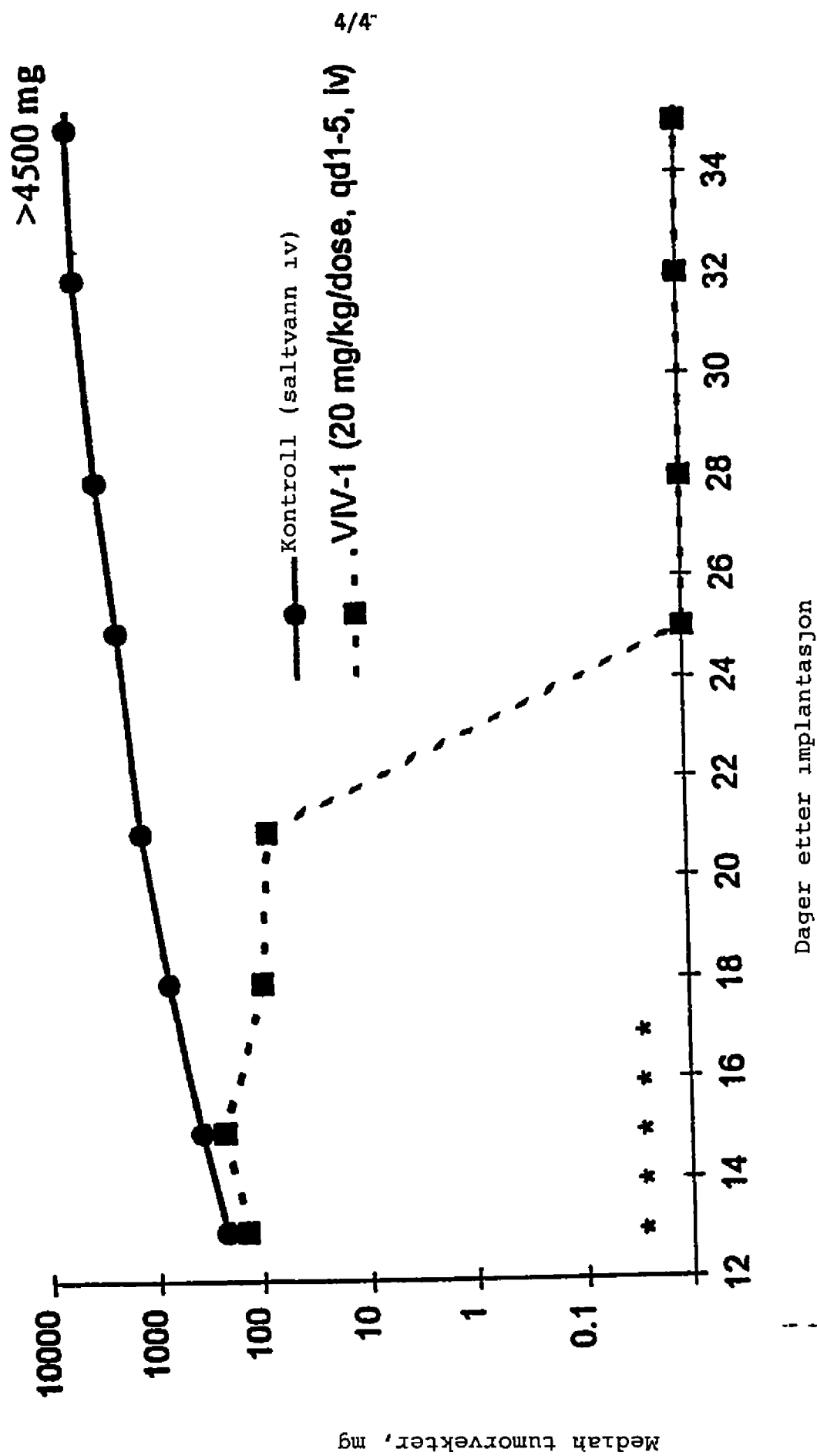
Figure 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4