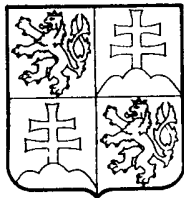


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 02889-90.A

(13) A3

5(51) A 61 K 31/40

(22) 11.06.90

(32) 14.06.89

(31) 89/36637

(33) US

(40) 12.11.91

(71) QUADRA LOGIC TECHNOLOGIES INC., Vancouver, CA

(72) Haeger Bruce E., Highland Mills, New York, US  
Lawter James R., Goshen, New York, US  
Naringrekar Vijay H., Suffern, New York, US  
Cucolo Michael C., Yonkers, New York, US

(54) Lyofilizovaný prostředek obsahující polyhematoporfyrinové ethery  
/estery a způsob jeho přípravy

(57) Řešení se týká stabilních lyofilizovaných prostředků obsahujících porfyrinové sloučeniny selektivní vůči tumorům, použitelné ve fotodynamické terapii a diagnostice. Lyofilizovaný prostředek je vhodný pro injekční podání. Připravuje se z vodního roztoku polyhemaporfyrinových etherů/esterů, který neobsahuje chlorid sodný, zmrazením a následně se lyofilizuje při zvýšené teplotě až do získání bezpečného obsahu zbytkové vlhkosti, t.j. nižší jako 1 %.

Předložený vynález se týká lyofilizovaných přípravků, obsahujících porfyrinové sloučeniny selektivní k tumorům, které jsou použitelné ve fotodynamické terapii. Zvláště výhodně se předložený vynález týká lyofilizovaných přípravků, obsahujících polyhematoporfyrinový ether/esterový přípravek nazývaný jako PHOTOFRIN II<sup>R</sup> a způsobů přípravy lyofilizovaného přípravku.

Fotodynamická terapie, používající porfyriny a podobné sloučeniny je v oboru již určitou dobu známá. Již od roku 1940 je známo, že porfyrin má schopnost fluorescence v tumorových tkáních. U porfyrinů bylo zjištěno, že mohou lokalizovat tumorovou tkáň tím, že absorbují světlo o určitých vlnových délkách při ozáření a umožňují detekovat tumor lokalizací fluorescence. Proto jsou přípravky obsahující porfyriny vhodné pro diagnózu a detekci takových tumorových tkání. Dále mohou porfyrinové sloučeniny také rozrušovat tumorovou tkáň, jestliže jsou ozářeny při vhodné vlnové délce, což je umožněno tvorbou jednoduchého kyslíku /Weishaupt K.R., a kol., Cancer Research /1976/ str. 2326-2329/.

Použití těchto sloučenin absorbujících světlo, zejména sloučenin podobných porfyrinům, může být uznáváno jako léčení tumorů, jestliže jsou tyto látky podávány systémiicky. Použitelnost těchto sloučenin je odvozena od jejich schopnosti se lokalizovat v neoplastické tkáni, zatímco z nor-

mální okolní tkáň se odstraní /viz např. Dougherty T.J. a spol., "Cancer: Principles and Practice of Oncology" /1982/, V.T.de Vita Jr. a kol., eds., str.1836 - 1844/.

Navíc k systemickému použití pro léčení tumorů má více nedávných publikací specifikované alternativní použití pro porfyrinové sloučeniny. Například použití porfyrinů při léčení kožních chorob bylo popsáno v US patentu č. 4753958. Použití fotosenzitivních sloučenin pro sterilaci biologických vzorků, obsahujících infekční organismy jako jsou bakterie a viry bylo uvedeno v US patentu č. 4727027, kde je fotosenzitivní látkou furokumarin a jeho deriváty. Fotosenzitivní porfyriny jsou vhodné při detekci a léčení atherosklerotických plaků, jak je popsáno v US patentech č. 4512762 a 4574682. Dále US patenty č. 4500507 a 4485806 popisují použití radioaktivně značených porfyrinových sloučenin pro zobrazení tumoru.

Fotosenzitivní přípravek široce používaný při časných stadiích fotodynamické terapie pro detekci i léčbu obsahuje surový derivát hematoporfyrinu, také nazývaný jako hematoporfyrinový derivát, HpD, nebo Lipson derivát, připravený postupem popsaným Lipsonem a kol., v J.Natl.Cancer Inst./1961/26:1-8. Byla provedena významná práce, která použila tento přípravek a o použití tohoto derivátu při léčení malignity bylo rozsáhle referováno /Cancer Res.

/1978/38: 2628-2635; J.Natl.Cancer Inst./1979/ 62:231-237/.

Dougherty a spolupracovníci připravili účinnější formu hematoporphyrinového derivátu, příprava byla provedena ultrafiltrací HpD za účelem snížení obsahu látek o nízké molekulové hmotnosti. Tato práce je podstatou US patentu č. 4649151, zde je uvedena jako odkaz v předložené přihlášce, která dále popisuje podrobně metody pro fototerapeutické léčení pacienta za použití zde popsaných prostředků. Tato forma léčiva je komplexní směsí obsahující porfyrinové jednotky spojené etherovými můstky /Dougherty T.J. a kol., Adv.Exp.Med.Biol./1983/ 160:3-13/ a esterové<sup>ými</sup> můstky /Kessel, D. a kol., Photochem.Photobiol. /1987/ 36:463 - 568/. Tato komplexní směs, označená zde jako polyhematoporphyrinové ethery/estery /"PHE"/ je dostupná pod obchodním označením PHOTOFRIN II<sup>R</sup> a je podstatou předloženého vynálezu.

PHE může být podáván jako 2,5 mg/ml nebo 5 mg/ml roztok obsahující PHE v normálním salinickém roztoku. PHE se rychle rozkládá, jestliže je vystaven teplu a je proto relativně nestabilní při teplotě místnosti. V souladu s tím je tedy třeba roztok uchovávat zmražený pro zachování jeho síly. Navíc roztok má tendenci ke tvorbě částic při vyšších teplotách, což je nežádoucí pro použití pro injekce, pokud není uchovávan zmražený a neroztaže přímo před použitím.

Použití takových zmražených roztoků má mnoho nevýhod.

Jelikož má být uchovávan zmražený, musí být umístěn a uchovávan ve zmrazeném stavu, což vyžaduje použití zvláštních

podmínek chlazení. Například produkt musí být uložen ve zvláštních kontejnerech za použití suchého ledu nebo podobného chladicího media. To je hlavní nevýhodou společně s cenou a logistikou použití produktu. Do doby použití musí být zmrazený roztok uchováván při  $-20^{\circ}\text{C}$ , což je teplota nižší než jsou pracovní teploty některých mrazniček, pak je nutné zvláštní mrazicí zařízení. Dále musí zmrazený produkt projít periodou tání a není proto přímo použitelný pro pacienta.

Je proto potřebný přípravek PHE, který je stabilní při teplotě místnosti po delší časové období, nemusí být uchováván zmrazený a proto není třeba žádných zvláštních skladovacích a ukládacích podmínek.

V oboru je známo, že lyofilizace produktu, který je relativně nestabilní ve vodném roztoku může vést k produktu, který je stabilní a má proto prodlouženou životnost, než ve vodném roztoku. Dále má lyofilizovaný produkt proti produktu v práškové formě tu výhodu, že je rychle rozpustný a snadněji rekonstituovatelný před injekčním podáním. Jinou výhodou lyofilizovaného produktu nestabilního ve vodném roztoku je to, že může být připraven a plněn do dávkových obalů v kapalném stavu, sušen při nízkých teplotách, čímž se odstraní nežádoucí tepelné vlivy a uchováván v suchém stavu čímž je stabilnější./Viz Remington's Pharmaceutical Sciences, 15.vydání, str. 1483-1485 /1975//. Lyofilizace je tak

ideální metodou pro získání přípravku PHE, který není nutno uchovávat zmrazený a který má požadovanou stabilitu při teplotě místnosti.

Weinstein a spol., v UP patentu č. 4753958 popisuje topický přípravek obsahující hematoporfyrinový derivát pro léčení psoriasy a jiných kutánních chorob, který je připraven lyofilizací solného roztoku PHE o koncentraci 5 mg/ml a je rekonstituován ve vhodném topickém vehikulu.

Ačkoliv lyofilizace zmrazeného salinického roztoku může být účelná pro přípravu produktu vhodného pro topickou aplikaci, bylo autory předloženého vynálezu zjištěno, že vznikají určité problémy, když má být lyofilizovaný salinický roztok být převeden na prostředek, což je obtížné a výsledný produkt je nepříjemný pro injekční podání. Při provedení pokusů o lyofilizaci koncentrovaného salinického roztoku, obsahujícího 15 mg/ml PHE a 5,4 % chloridu sodného /množství chloridu sodného nezbytné pro získání isotonického roztoku po rekonstituci vodou pro injekce na 2,5 mg/ml PHE roztoku/ se vyskytlo částečné vysrážení /vysolení/ PHE aktivní složky. Dále, jako důsledek vysrážení, je provedení filtrace koncentráту extrémně nesnadné a vyžaduje častou výměnu filtru. Něco aktivní složky se zachytí na filtru. Dále lyofilizovaný produkt není homogenní a ob-<sup>těchto</sup> sahuje odděleně chlorid sodný a PHE. Oddělení/fází pravděpodobně vzniká během zmrazení v důsledku rozdílné krystalizace.

Alternativně, salinický roztok obsahující 2,5 mg/ml PHE by mohl být lyofilizován ale lyofilizační proces by byl velmi dlouhý, jelikož by bylo třeba odstranit více vody. Dále by mohly vznikat určité problémy s filtrací a vysrážením během procesu, které jsou způsobeny přítomností chloridu sodného v roztoku.

Je proto potřebné připravit prostředek obsahující PHE, který je při teplotě místnosti stabilní po prodlouženou dobu a nevyžaduje zmrazení, ale který překonává problémy spojené s lyofilizací vodného salinického roztoku.

Cílem předloženého vynálezu je poskytnout způsob přípravy přípravku PHE, který je relativně nestabilní ve vodném roztoku, takovým postupem, že se získá produkt stabilní při teplotě místnosti po prodlouženou dobu.

Cílem předloženého vynálezu je poskytnout PHE přípravek, který je homogenní a vhodný pro injekční podání.

Dalším cílem předloženého vynálezu je poskytnout způsob lyofilizace PHE roztoku, který vylučuje problémy spojené s lyofilizací PHE salinického roztoku.

Tyto a další objekty a přednosti předloženého vynálezu budou odborníkům zřejmé z následujícího popisu.

Předložený vynález je založen na objevu, že PHE fotosenzitivní přípravek, který je stabilní při teplotě místnosti během delšího časového období, může být připraven lyofilizací. Dále je založen na objevu, že problémy spojené s lyofilizací PHE salinického roztoku mohou být odstraněny vylou-

čením chloridu sodného z roztoku a lyofilizací PHE z vodného roztoku a pak rekonstitucí nesalinickým ředidlem jako je 5% dextroza pro injekce.

S překvapením bylo objeveno, že přípravek obsahující polyhematoporfyrin ether/ester, který je stabilní při teplotě místnosti během delšího časového období, může být připraven lyofilizací fotosenzitivní látky z nesalinického roztoku a rekonstitucí lyofilizovaného produktu nesalinickým ředidlem. Předložený vynález poskytuje způsob přípravy lyofilizovaného PHE, který je rychle uskutečnitelný, neboť má malý počáteční objem, vylučuje srážení PHE složky a který vede k produktu/homogennímu <sup>v podstatě</sup>.

Popis PHE aktivní složky podle předloženého vynálezu a způsob její přípravy je popsán v uvedeném US patentu č. 4649151.

Podle předloženého vynálezu se lyofilizovaný PHE přípravek vyrobí z koncentrátu obsahujícího přibližně 15 mg/ml PHE ve vodě. Tento koncentrát se pak podrobí lyofilizaci a výsledný produkt je vhodný pro skladování a transport. Lyofilizovaný produkt se před použitím rekonstituuje vhodným nesalinickým roztokem jako je 5% dextroza pro injekce a získá se 2,5 mg/ml roztok pro použití při léčení nebo diagnóze pacienta.

Ve výhodném provedení předloženého vynálezu se do vhodné nádoby pro lyofilizaci umístí přibližně 5 ml přibližně 15 mg/ml PHE koncentrátu. V každé lahvičce je tak 75

mg polyhematoporfyrinových etherů/esterů. Každá 5ml lahvička se pak zmrazí v lyofilizační komůrce na teplotu  $-35^{\circ}\text{C}$  nebo nižší na dobu dostatečnou pro úplné zmrazení produktu. Ten se pak lyofilizuje při zvýšené skladovací teplotě, až se získá produkt s bezpečným obsahem vlhkosti, pak se tlak komory vyrovná s atmosférickým tlakem a lahvičky se pak utěsní. Protože výchozí objem je malý /5 ml/, je produkt rychle lyofilizován, obvykle během 24 hodinového období. Tato skutečnost výrazně snižuje náklady ve srovnání s lyofilizací velkých objemů zředěnějších roztoků. Výsledný produkt může být skladován při teplotě místnosti po dobu delší než 6 měsíců bez patrné ztráty účinnosti. Před podáním pacientovi se lyofilizovaný produkt rekonstituuje 30 ml 5% dextrozy pro injekce, čímž se získá isotonický roztok o koncentraci 2,5 mg/ml.

Ředidlem použitým pro rekonstituci lyofilizovaného produktu je výhodně 5% dextroza pro injekce, ale mohou být použita i jiná nesalinická ředidla jako je sterilní voda.

Jestliže se lyofilizovaný produkt rekonstituuje normálním salinickým roztokem a filtruje za použití 0,2  $\mu\text{m}$  filtrů, je možno pod optickým mikroskopem pozorovat velké množství nežádoucích částic. Nevýznamná tvorba částic je pozorována při rekonstituování produktu dextrozou pro injekce. Proto je žádoucí použít nesalinický roztok.

Předpokládá se, že do přípravku podle předloženého vynálezu mohou být zahrnuty další složky. Tyto zahrnují pufrы pro úpravu pH roztoku, smáčecí nebo emulgační činidla,

antimikrobiální činidla a/nebo ochranné látky, podle potřeby. Tak je možno použít pro hrubý produkt neelektrolytických činidel jako je mannitol nebo dextroza pro zlepšení charakteristik lyofilizovaného koláče. Jsou možné další variace mimo výše uvedených, pokud jde o další vhodná vehikula a tyto variace budou pro odborníky zřejmé. Všechny takové variace jsou vsouladu s rozsahem předloženého vynálezu.

Následující příklady přinášejí porovnání lyofilizovaného přípravku s dostupným zmrazeným roztokem. Příklady žádným způsobem neomezují rozsah předloženého vynálezu.

#### Příklad 1

Koncentrovaný PHE vodný roztok obsahující přibližně 15 mg/ml polyhematoporfyrin etherů/esterů se připraví v souladu s postupem popsáným Doughertym v US patentu č. 4649151. Koncentrát se uchovává zmrazený a roztaví se před lyofilizací v lázni studené vody o teplotě  $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  s postupným tavením. Roztavený koncentrát se pak zvaží a nalije do tárované skleněné míchací nádoby chráněné před světlem. Vsádka se pak míchá do dosažení homogenity.

Když se získá homogenní směs, změří se pH roztaveného surového koncentrátu a upraví se na hodnotu pH 7,2 - 7,8 5% chlorovodíkovou kyselinou nebo 5% vodným roztokem hydroxidu sodného, je-li to žádoucí. Koncentrát se pak sterilně filtruje za použití dvoustupňového filtračního procesu, který zahrnuje 0,45  $\mu\text{m}$  polyvinylidendifluoridový předfiltr násled-

dovaný 0,2  $\mu$ m sterilní filtr stejného typu.

Po ukončení filtrace koncentrátu se do 30 ml nádobek umístí vhodný objem tak, aby bylo dosaženo hodnoty 75 mg na nádobku. Nádobky se pak umístí do lyofilizační komory. Sterilní koncentrát se zmrazí na teplotu produktu  $-35^{\circ}\text{C}$  nebo nižší na dobu nejméně 2 hodin. Pak se lyofilizuje při teplotě  $+35^{\circ}\text{C}$  dokud teplota produktu nedosáhne  $+20^{\circ}\text{C}$  až  $+25^{\circ}\text{C}$  a udržuje se na této teplotě 5 hodin. Komora se pak vyrovná s atmosférickým tlakem vpuštěním bezvodého dusíku, nádobky se uzavřou, vyjmou z komory a utěsní.

Před použitím ve fotodynamické terapii pacienta se obsah skleněné nádobky rekonstituuje 30,0 ml 5% dextrozy pro injekce.

#### Příklad 2

Lyofilizovaný PHE s obsahem vlhkosti méně než 1 % stanovenou metodou Karl Fischera se připraví postupem podle příkladu 1 s přídatným stupněm. Po uchovávání produktu při teplotě  $+20^{\circ}\text{C}$  až  $+25^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 hodin se teplota produktu zvýší na  $+33^{\circ}\text{C}$  až  $+37^{\circ}\text{C}$  a produkt se při této teplotě uchovává po dobu 6 - 10 hodin. Komora se pak vyrovná s atmosférickým tlakem jako v příkladu 1 a nádobky se uzavřou a utěsní.

#### Příklad 3

Lyofilizovaný PHE se připraví postupem podle příkladu

1. Testuje se pak stabilita produktu při různých teplotách a časových intervalech za použití vysokotlaké kapalinové chromatografie /HPLC/ za následujících podmínek:

Mobilní fáze A: směs 1:1:1 tetrahydrofuranu, methanolu a vody, obsahující 0,02 % ledové kyseliny octové, pH upraveno na 5,0 až 5,1 NaOH.

Mobilní fáze B: 90% tetrahydrofuran ve vodě.

Kolona: Ultrasphere ODS, 5  $\mu$ m částice  
velikost 150 x 4,6 mm /Beckman/.

Teplota: okolí.

Průtoková rychlost: 1,0 ml/minutu.

Objem nástřiku: 20  $\mu$ l

Způsob detekce: UV absorbance při 420 nm.

Program mobilní fáze: 100% mobilní fáze A dokud protoporfyrinový pík není kompletně eluován /asi 9,5 až 13 minut/  
- lineární program pro 100% mobilní fázi B po dobu jedné minuty  
- 100% mobilní fáze B dokud PHE není kompletně eluován /asi 16 až 25 minut/  
- lineární program pro 100% mobilní fázi A po dobu tří minut  
- stabilizace 100% mobilní fází A nejméně po dobu 5 minut mezi nástřiky.

Výsledky jsou uvedeny dále v tabulce 1.

Tabulka 1

Lyofilizovaný PHE

Obsah PHE, plošná procenta HPLC

| Podmínky    | šarže  |        |        |        |        |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|             | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      |
| počáteční   | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| -20 °C, 6 m | 95,2   | 95,6   | 98,7   | -      | -      |
| 3 °C, 3 m   | 95,2   | 95,6   | 100,09 | 101,0  | 100,2  |
| 3 °C, 6 m   | 93,9   | 92,8   | 98,0   | -      | -      |
| 23 °C, 1 m  | 95,2   | 93,7   | 98,9   | 96,5   | 96,6   |
| 23 °C, 3 m  | 93,4   | 93,3   | 93,5   | 94,7   | 94,7   |
| 23 °C, 6 m  | 93,0   | 93,7   | 93,0   | -      | -      |
| 37 °C, 1 m  | 93,2   | 92,7   | 93,6   | 93,4   | 92,6   |
| 37 °C, 3 m  | 90,1   | 89,9   | 89,7   | 92,4   | 91,4   |

V tabulce 2 jsou uvedeny hodnoty stability zjištěné HPLC pro zmražený PHE roztok za stejných podmínek:

Tabulka 2

PHE zmražený roztok

Obsah PHE, plošná procenta HPLC

| Podmínky    | šarže |       |      |
|-------------|-------|-------|------|
|             | 1     | 2     | 3    |
| počáteční   | 100,  | 100   | 100  |
| -20 °C, 6 m | 92,9  | 101,3 | -    |
| +5 °C, 3 m  | 83,2  | 93,4  | 85,2 |

Tabulka 2 /pokračování/

|            |      |      |      |
|------------|------|------|------|
| 5 °C, 6 m  | 81,4 | 86,9 | 84,1 |
| 5 °C, 9 m  | 77,1 | 81,9 | 77,9 |
| 25 °C, 3 m | 82,4 | 91,2 | 83,8 |
| 25 °C, 6 m | 86,4 | 93,9 | 87,8 |
| 25 °C, 9 m | 77,1 | 91,5 | 88,8 |

Výsledky v tabulkách 1 a 2 dokazují, že lyofilizovaný přípravek PHE podle předloženého vynálezu vykazuje vyšší a konzistentnější stabilitu než zmražený roztok a udržuje si svoji účinnost po dobu nejméně 6 měsíců při teplotě místnosti.

#### Příklad 4

Lyofilizovaný PHE přípravek byl připraven podle příkladu 1 a testován na obsah částic za použití HIAC počítače.

Byly získány následující výsledky:

Tabulka 3

Lyofilizovaný PHE

Částicová analýza x

Počet částic na nádobku /30 ml/, šarže č. /u stability/

| Podmínky  | šarže |      |     |     |     |
|-----------|-------|------|-----|-----|-----|
|           | 1     | 2    | 3   | 4   | 5   |
| Počáteční | -     | -    | -   | 200 | 300 |
| 3 °C, 3 m | -     | -    | -   | 400 | 300 |
| 3 °C, 6 m | 4600  | 1400 | 500 | -   | -   |

Tabulka 3 /pokračování/

|            |      |      |     |     |     |
|------------|------|------|-----|-----|-----|
| 23 °C, 3 m | -    | -    | -   | 400 | 400 |
| 23 °C, 6 m | 5700 | 1500 | 600 | -   | -   |

Všechny hodnoty udávají částice  $\geq 10 \mu\text{m}$ .

<sup>x</sup>Měření byla provedena přístrojem HIAC.

Částicová analýza zmraženého roztoku za použití Coulter počítače je uvedena v tabulce 4.

Tabulka 4

Zmrazený roztok PHE

Částicová analýza<sup>x</sup>

Počet částic na nádobku /30 ml/, šarže č. /u stability/

| Podmínky    | šarže |       |       |
|-------------|-------|-------|-------|
|             | 1     | 2     | 3     |
| Počáteční   | -     | 1163  | -     |
| -20 °C, 6 m | 2039  | 4184  | 605   |
| +5 °C, 3 m  | 6372  | 16664 | 4555  |
| 5 °C, 6 m   | 9565  | 28768 | 7160  |
| 5 °C, 9 m   | 19406 | 42730 | 21104 |
| 25 °C, 3 m  | 14059 | 18457 | 10519 |
| 25 °C, 6 m  | 10211 | 5332  | 9742  |
| 25 °C, 9 m  | 32197 | 14338 | 23501 |

<sup>x</sup>Měření bylo provedeno počítačem Coulter.

Vyhodnocení výše uvedených údajů prokazuje, že lyofilizovaný produkt vykazuje množství částicových útvarů v hodnotách pod hodnotami udávanými v USP pro injekce, v množství ne vyšším než 10000 částic větších nebo rovných 10  $\mu$ m na nádobku, přičemž zmrazený roztok vykazuje výraznou tvorbu částic při teplotách nad  $-20^{\circ}\text{C}$  v intervalech tak nízkých jako jsou 3 měsíce.

#### Příklad 5

Lyofilizovaný PHE připravený postupem podle příkladu 1 byl testován na biologickou účinnost za použití postupu popsaného T.Doughertym a kol., J.Nat.Cancer Inst. 55:115. Podle tohoto postupu byly SMT-F tumory z "donorových" DBA/2HA implantovány DBA/2HA myším pro testování. Po implantaci bylo vybráno deset myší s tumory rozměrů 4 mm x 4 mm až 6 mm x 6 mm a bylo jim intraperitoneálně injektováno 4,2 mg/kg PHE roztoku připraveného rekonstituováním lyofilizovaného PHE 5% dextrozou ve vodě. Dvacetčtyři hodiny po dávce byly tumory ozařovány třicet minut xenonovou arc lampou za použití červeného světla 630 nm ze vzdálenosti, která odpovídá světelné intenzitě  $157,5 \text{ mW/cm}^2$ , odečteno na měřicím přístroji. Vyhovující výsledky jsou interpretovány jako neviditelný nebo nehmatatelný tumor u 50 % nebo více z deseti testovaných myší 7 dní po ozařování. Výsledky biostudie za použití rekonstituovaného lyofilizovaného PHE jsou uvedeny dále v tabulce 5.

Tabulka 5

Biostudie lyofilizovaného PHE

Výsledky biostudie, číslo šarže při stanovení stability

|             | 1                 | 2    | 3    | 4    | 5    |
|-------------|-------------------|------|------|------|------|
| počátek     | vyh. <sup>x</sup> | vyh. | vyh. | vyh. | vyh. |
| -20 °C, 6 m | vyh.              | vyh. | -    | -    | -    |
| 3 °C , 3 m  | vyh.              | vyh. | -    | vyh. | vyh. |
| 3 °C , 6 m  | vyh.              | vyh. | vyh. | -    | -    |
| 23 °C , 1 m | vyh.              | vyh. | vyh. | vyh. | vyh. |
| 23 °C, 3 m  | vyh.              | vyh. | -    | vyh. | vyh. |
| 23 °C, 6 m  | vyh.              | vyh. | vyh. | -    | -    |
| 37 °C, 1 m  | vyh.              | vyh. | vyh. | vyh. | vyh. |
| 37 °C, 3 ,  | vyh.              | vyh. | -    | vyh. | vyh. |

<sup>x</sup>vyhovující

Výsledky biostudie PHE zmrazeného roztoku za použití stejného postupu, jako je výše uvedený, jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6

PHE zmražený roztok, biostudie

Výsledky biostudie pro šarže

| Podmínky    | 1                    | 2      | 3      |
|-------------|----------------------|--------|--------|
| počátek     | vyh. <sup>x</sup>    | vyh.   | -      |
| -20 °C, 3 m | -                    | -      | vyh.   |
| -20 °C, 6 m | nevyh. <sup>xx</sup> | vyh.   | -      |
| -20 °C, 9 m | nevyh.               | vyh.   | nevyh. |
| 5 °C, 3 m   | vyh.                 | vyh.   | nevyh. |
| 5 °C, 6 m   | nevyh.               | nevyh. | nevyh. |
| 5 °C, 9 m   | vyh.                 | nevyh. | vyh.   |
| 25 °C, 3 m  | nevyh.               | vyh.   | vyh.   |
| 25 °C, 6 m  | nevyh.               | nevyh. | nevyh. |
| 25 °C, 9 m  | vyh.                 | nevyh. | nevyh. |

Srovnáním výsledků z tabulek 5 a 6 je zřejmé, že lyofilizovaný PHE podle předloženého vynálezu si udržuje svoji biologickou aktivitu v testech in vivo v intervalu nejméně 6 měsíců při teplotě místnosti, přičemž zmražený roztok vykazuje značnou variabilitu v biologické aktivitě za stejných podmínek.

#### Příklad 6

Lyofilizovaný PHE obsahující mannitol jako zahušťovací činidlo se připraví podle příkladu 1 přidáním takového

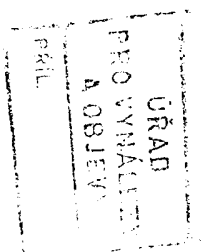
Množství mannitolu, které je rovno hmotnosti PHE, k zotátému koncentrátu ve skleněné míchací nádobce.

Příklad 7

Lyofilizovaný PHE obsahující dextrozu jako zahušťovací činidlo, se připraví podle příkladu 6 s tím, že se mannitol nahradí dextrozou.

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1.     Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje lyofilizovaný přípravek složek hematoporfyrinových derivátů, které jsou fototoxické k tumorovým tkáním, přičemž lyofilizovaný přípravek neobsahuje chlorid sodný.
2.     Prostředek podle bodu 1, vyznačující se tím, že uvedenými složkami hematoporfyrinových derivátů jsou směsi hematoporfyrinových etherů a esterů.
3.     Biologicky aktivní lyofilizovaný prostředek, který je fluorescentní, fotosenzitivní a má schopnost se lokalizovat v a zadržovat v nádorových tkáních po dobu delší než ve tkáních normálních, vyznačující se tím, že obsahuje dvě nebo více kovalentně spojených porfyrinových molekul, přičemž alespoň některé z uvedených molekul obsahují jednu nebo více vinylových skupin a tento lyofilizovaný prostředek neobsahuje chlorid sodný.
4.     Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje hlavně lyofilizovaný prostředek podle bodu 1 jako aktivní složku spolu s farmaceuticky přijatelnou přísadou.



11. VI 90

0054

026523

21

5. Lyofilizovaný farmaceutický prostředek podle bodu 1, vyznačující se tím, že obsahuje méně než 1 % zbytkové vody.

6. Způsob přípravy lyofilizovaného prostředku pro použití ve fotodynamické terapii nebo diagnostice pacienty, vyznačující se tím, že se připraví vodný roztok složek hematoporfyrinových derivátů, které jsou fototoxické vůči tumorové tkáni, přičemž uvedený vodný roztok neobsahuje chlorid sodný a tento vodný roztok se lyofilizuje.

7. Způsob podle bodu 6, vyznačující se tím, že uvedená složka hematoporfyrinových derivátů obsahuje směs hematoporfyrinových etherů a esterů.

8. Způsob přípravy lyofilizovaného prostředku pro fotodynamickou terapii nebo diagnostiku pacienta, vyznačující se tím, že zahrnuje stupně

a/ přípravy vodného roztoku polyhematoporfyrinových etherů/esterů, který neobsahuje chlorid sodný,

b/ snížení teploty uvedeného roztoku až do jeho úplného zmrazení a

c/ lyofilizaci zmraženého roztoku při zvýšené teplotě až do získání bezpečného obsahu zbytkové vlhkosti.

9. Způsob podle bodu 8, vyznačující se tím, že se zmražený roztok lyofilizuje při zvýšené teplotě asi +35 °C, dokud se nezíská produkt s teplotě asi +20 °C až +25 °C a pak se

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| č. j.                            | 0 5 4 8 4  |
| posled                           | 14. II. 91 |
| ÚŘAD<br>PRO VYVÁŽENÍ<br>A OBJEVY |            |
| Pří                              |            |

tato teplota produktu udržuje po dobu asi 5 hodin.

10. Způsob podle bodu 8, vyznačující se tím, že lyofilizovaný prostředek má obsah vlhkosti nižší než jedno procento, přičemž postup zahrnuje další stupeň, při kterém se po udržování teploty produktu na asi  $+20^{\circ}\text{C}$  až  $+25^{\circ}\text{C}$  po dobu asi 5 hodin, zvýší teplota produktu na asi  $+33^{\circ}\text{C}$  až  $+37^{\circ}\text{C}$  a produkt se na této teplotě udržuje po dobu asi 6 až 10 hodin.

11. Způsob přípravy prostředku pro fotodynamické léčení nebo diagnózu pacienta, zahrnující stupně přípravy roztoku polyhematoporfyrinových etherů/esterů ve vodě a snížení teploty tohoto roztoku až do jeho úplného zmrazení, vyznačující se tím, že se pak zmrazený roztok lyofilizuje při zvýšené teplotě do získání produktu s bezpečným obsahem zbytkové vlhkosti.

12. Způsob podle bodu 11, vyznačující se tím, že lyofilizace zmrazeného roztoku se provádí při zvýšené teplotě asi  $35^{\circ}\text{C}$ , dokud se nezíská produkt o teplotě asi  $+20^{\circ}\text{C}$  až  $+25^{\circ}\text{C}$  a tato teplota produktu se pak udržuje po dobu asi 5 hodin.

13. Způsob podle bodu 12, kde lyofilizovaný prostředek má obsah vlhkosti menší než jedno procento, vyznačující se tím, že zahrnuje další stupeň po udržování teploty produktu na asi  $+20^{\circ}\text{C}$  až  $+25^{\circ}\text{C}$  po dobu asi 5 hodin, kde se zvýší teplota produktu na asi  $+33^{\circ}\text{C}$  až  $+37^{\circ}\text{C}$  a produkt se na této teplotě udržuje po dobu asi 6 až 10 hodin.