

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19) ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.06.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.06.1997 14.10.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/049236 1997/950225**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.02.2001**
(Věstník č. 2/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/11820**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/56398**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 4379

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/16

A 61 P 31/04

A 61 P 1/00

(71) Přihlašovatel:

AMBI INC., Purchase, NY, US;

(72) Původce:

Goldstein Beth P., West Islip, NY, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Léčivo pro léčení chorob vyvolaných bakteriální
infekcí tračníku a/nebo pro vyhubení bakterií
kolonizujících tlusté střevo**

(57) Anotace:

Použití lanthocinu pro výrobu léčiva pro léčení chorob vyvolaných bakteriální infekcí tračníku a/nebo pro vyhubení bakterií kolonizujících tlusté střevo. Zejména se jedná o léčbu onemocnění způsobených infekcí střeva *C.difficile* a také kolonizací enterokoky rezistentními na vankomycin. Léčiva obsahují nisin a jiné bakteriociny obsahující lanthionin jako aktivní činidlo.

Léčivo pro léčení chorob vyvolaných bakteriální infekcí trač-
níku a/nebo pro vyhubení bakterií kolonizujících tlusté střevo

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká léčiva pro léčení chorob vyvolaných bakteriální infekcí tračníku a/nebo pro vyhubení bakterií kolonizu-
jících tlusté střevo. Zejména sse jedná o léčbu onemocnění způso-
bených infekcí tlustého střeva *C. difficile* a také kolonizací entero-
koky resistantními na vankomycin. Způsoby využívají nisin a jiné
bakteriociny obsahující lanthionin (lanthociny) jako aktivní činidlo.

Dosavadní stav techniky

Nisin je bakteriocin, antimikrobiální činidlo produkované
potravinovým organismem a patří do skupiny podobných substancí
označovaných jako lantibiotika (nebo zde lanthociny), kam patří
například subtilin, epidermin, gallidermin a pep 5.

Nisin je produkován *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, který
patří k Lancefieldově serologické skupině N (Mattick, A.T.R. and
A. Hirsch, 1947, Lancet 2:5). Nisin je peptid tvořený 34
aminokyselinovými zbytky a obsahuje pět kruhových struktur
navzájem vázaných thioetherovými můstky, které vytvářejí
lanthionin nebo B-methyllanthionin. Tyto thioethery vedou ke
kondenzaci cysteinových sulfhydrylových skupin s
dehydro-vedlejšími řetězci tvořenými buď serinovými, nebo
threoninovými zbytky v důsledku posttranslačních modifikací
nisinového prekursového peptidu.

Bylo popsáno, že nisin účinkuje jako kationtové povrchové
aktivní činidlo a že jeho aktivita může být neutralizována
aniontovými detergentními činidly (Ramseier, H.R. 1960, Arch.
Mikrobiol 37: 57) a že na molekulové úrovni působí nisin na

cytoplasmatické membráně a inhibuje biosyntézu peptidoglykanu (Reisinger et al., 1980, Arch. Microbiol. 127: 187). Působení nisinu na vegetativní bakterie je s největší pravděpodobností způsobeno napětově závislou depolarizací plasmatické membrány po inserci peptidu na lipidovou dvojvrstvu, pravděpodobně prostřednictvím interakcí mezi dvěma sousedními molekulami nisinu, které vytvoří dočasný pór nebo kanál. Molekulové vlastnosti nisinu a mechanismus jeho biosyntézy byly předmětem nedávných studií (Jung, G. and H.G. Sahl, 1991, Nisin and Novel Lantibiotics ESCOM Science Publishers, Leiden).

Soudí se, že nisin má úzké spektrum aktivity a obvykle je aktivní pouze proti některým Gram-pozitivním bakteriím, s výjimkou té situace, že je kombinován s chelačním činidlem, kdy je nisin překvapivě aktivní proti Gram-negativním bakteriím a má zvýšenou aktivitu proti Gram-pozitivním bakteriím (U.S. patenty č. 5217950 a 5260271, Blacburn et al.). Nisin je používán jako antimikrobiální potravinové konzervační činidlo a je považován za bezpečný JEFCA a různými národními úřady regulujícími používání potravinových přísad, jako jsou například USA, UK a EEC úřady.

Ačkoliv byl nisin účinný v předběžných studiích na zvířatech ((Mattick, A.T.R. and A. Hirsch, 1947, Lancet 2:5; Bavin, E.M., et al., 1952, Lancet 1: 127; Gowans, J.L. et al., 1952, Brit. J. Pharmacol. 7: 438; Hirsch, A. and A.T.R. Mattick, 1949, Lancet ii: 190), byl shledán nedostatečně účinným pro terapii u zvířat a člověka.

Clostridium difficile je anaerobní, Gram-pozitivní, sporulující toxigenní bacil, který se málokdy nachází v signifikantním množství ve střevu člověka. Nicméně, protože je refrakterní na mnoho antimikrobiálních činidel a je endemický v nemocnicích a ošetrovatelských zařízeních, může se objevit tehdy,

když je normální bakteriální flóra střeva potlačena, což se nejčastěji stane po léčbě širokospektrými antibiotiky. Za těchto okolností může *C. difficile* způsobit závažná onemocnění, která jsou známá jako průjem asociovaný s antibiotiky a pseudomembranosní kolitida. V léčbě těchto onemocnění se uplatní metronidazol a orální vankomycin. V současnosti je nicméně použití vankomycinu aktivně opouštěno, protože - zejména orální formy - vyvolávají selekci nových tříd vysoce resistantních střevních organismů, enterokoků resistantních na vankomycin (VRE), které mohou způsobit fatální, neléčitelné infekce v jiných místech těla. Metronidazol není aktivní proti enterokokům, proto může jeho použití také přispět k selekci VRE ve střevu. Počet relapsů pro *C. difficile* je velmi vysoký, přibližně 20%; soudí se, že může souviset s tvorbou spor, které se obtížně eradikují.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí prostředku pro léčbu onemocnění tlustého střeva způsobeného bakteriemi a pro eradikaci potenciálně nebezpečných bakterií kolonizujících tlusté střevo. Pro bakteriociny obsahující lanthionin (lanthociny), jako je nisin, byla prokázána neočekávaná stabilita v tlustém střevu a bylo prokázáno, že nejsou toxické při podání ve vysokých dávkách do tlustého střeva. Jako důsledek tohoto objevu je dalším předmětem vynálezu prostředek pro podání vybraného lanthocinu do tlustého střeva v množství dostatečném pro účinnou léčbu infekce tlustého střeva.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1 ukazuje citlivost nisinu na enzymy přítomné v gastrointestinálním traktu.

Obr. 2 ukazuje vliv tloušťky potahu tablety na čas zahájení rozpadu tablety ve fosfatovém pufru.

Obr. 3 ukazuje vliv tloušťky potahu tablety na čas zahájení a dokončení rozpadu tablety ve fosfatovém pufru.

Obr. 4 ukazuje vliv tloušťky potahu tablety na oddálení uvolňování nisinu do fosfatového pufru s pH 6,8.

Obr. 5 ukazuje profil rozpouštění tablet pro 6 tablet se 40% Eudragit™ potahem.

Obr. 6A a 6B ukazují postup tabletového prostředku s 40% tloušťkou potahu lidským gastrointestinálním traktem během 7 hodin po polknutí.

Obr. 7A a 7B ukazují postup tabletového prostředku se 120% tloušťkou potahu lidským gastrointestinálním traktem během 12 hodin po polknutí.

Obr. 8A a 8B ukazují postup tabletového prostředku se 180% tloušťkou potahu lidským gastrointestinálním traktem během 16 hodin po polknutí.

Předmětem předkládaného vynálezu je prostředek pro léčbu onemocnění střeva způsobených *C. difficile* a pro eradikaci organismů kolonizujících tlusté střevo jako jsou VRE.

Zjistili jsme, že nisin má výraznou aktivitu proti patogenním kmenům různých Gram-pozitivních bakterií, včetně VRE (U.S. pořadové č. 08/667650, který je zde uveden jako odkaz). Bylo známo, že nisin je aktivní proti organismům způsobujícím kazení

potravy rodu *Clostridium* a po našem počátečním objevu jeho aktivity proti *C. difficile* byly takové aktivity nedávno popsány (Kerr et al., 1997, Lancet, 349: 1026). V této přihlášce jsme prokázali, že nisin má velmi silnou aktivitu proti velkému počtu klinických izolátů *C. difficile*, včetně kmenů resistantních na klindamycin a metronidazol. Také je ukázáno, že nisin má slabou aktivitu proti hlavní normální střevní flóře u lidí, *Bacteroides fragilis*. Skutečně je okno mezi koncentracemi nisinu aktivními proti 50% kmenů *C. difficile* a koncentracemi aktivními proti 50% *B. fragilis* velmi široké. To znamená, oproti tvrzením uváděným Kerrem et al, že je nepravděpodobné, že by účinné dávky nisinu měly nežádoucí vliv na ochranné komensální bakterie v tlustém střevu. Ačkoliv vyžaduje nisin, jak již bylo uvedeno, potenciační činidla pro to, aby byl aktivní proti většině Gram-negativních bakterií, existují určité výjimky z tohoto pravidla. Například, vybrané Gram-negativní bakterie, jako je *Neisseria gonorrhoeae*, jsou citlivé na nisin samotný. *B. fragilis* je vybraný anaerob a jeho citlivost na nisin nebyla dříve známa.

Protože je nisin peptid a může být štěpen proteolytickými enzymy, které jsou přítomny ve velkém množství v tenkém střevu (viz obr. 1), nebylo jeho orální použití pro léčbu infekcí dolního gastrointestinálního traktu dosud navrženo. Kromě toho nebylo známo, zda bude intaktní nisin tolerován, pokud bude dopraven do dolního gastrointestinálního traktu, ani to, zda bude možno v tomto místě očekávat dostatečnou stabilitu pro dosažení antimikrobiální aktivity.

Nyní jsme za použití bakteriálních modelů ve studii subakutní intrakolonální toxicity prokázali, že nisin je nedráždivý pro tlusté střevo při opakovaném podání. Dále jsme prokázali, že intaktní nisin nemůže být detekován v krvi takto léčených zvířat, což ukazuje na to, že systémová absorpce (a možná systémová

toxicita) je při tomto způsobu podání nepravděpodobná. Dále, ve studii na zvířatech, u kterých byla provedena ligace části tlustého střeva, jsme prokázali, že významná část nisinu zůstává po instilaci do tlustého střeva několik hodin intaktní in situ.

Proto je potenciálně přínosný vývoj systémů pro podání nisinu, nebo jiných lanthocinových antimikrobiálních peptidů, včetně strukturálních variant těchto proteinů produkovaných genetickým inženýrstvím nebo semisynteticky, pro léčbu infekcí tlustého střeva způsobených mikroorganismy (včetně například *C. difficile*) citlivými na tyto peptidy, nebo pro eradikaci citlivých organismů (včetně například VRE), které jsou potenciálně nebezpečné pro zdravé jedince nebo jiné pacienty, z tlustého střeva. Proto je dalším aspektem předkládaného vynálezu vývoj prostředků, které umožňují orální podání takového množství nisinu, které je účinné pro léčbu bakteriální infekce tlustého střeva.

Farmaceutické prostředky obsahující takové peptidy budou vhodně potažené tablety nebo granule nebo kapsle pro orální podání, které umožní udržení integrity dávkové formy během průchodu žaludkem a tenkým střevem a které umožní uvolnění aktivní složky ve správné oblasti gastrointestinálního traktu (distální části tenkého střeva až proximální části tlustého střeva. Nicméně se také předpokládá, že například čípky a rektální nálevy mohou být také účinnými dávkovými formami. Konkrétní dávkové formy uvedené dále jsou uvedeny pouze pro ilustraci a nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklady 1-5 se týkají testování vlastností nisinu v prostředí tlustého střeva a účinnosti nisinu proti bakteriím normálně

osídľujícím tlusté střevo.

Příklad 1a: Aktivita nisinu proti *C. difficile*

12 klindamycin-resistentních klinických izolátů od McGuire Veterans' Administration Hospital, Richmond, VA, bylo testováno v Brucella agaru s ovčími erytrocyty za anaerobních podmínek. MIC (minimální inhibiční koncentrace byla definována jako nejnižší testovaná koncentrace, která kompletně inhibovala viditelný růst bakterií.

Jak je uvedeno v tabulce 1, všechny kmeny byly inhibovány nisinem v koncentraci 0,25 $\mu\text{g/ml}$ nebo nižší.

60 klinických izolátů z University of Florence (Italy) Hospital bylo testováno na citlivost na nisin a na antimikrobiální činidla v současnosti používaná pro léčbu průjmu a kolitidy způsobené *C. difficile*, za použití stejných metod, jako jsou popsány výše. Jak je uvedeno v tabulce 2, median MIC neboli MIC_{50} (koncentrace, při které je inhibován růst 50% nebo více testovaných kmenů) nisinu pro tyto kmeny byl 0,05 $\mu\text{g/ml}$, což je významně méně než dávka vankomycinu nebo metronidazolu potřebná pro inhibici stejných kmenů. MIC_{90} je koncentrace antimikrobiálních činidel, při které je inhibován růst 90% nebo více testovaných kmenů.

Tento příklad ukazuje, že *C. difficile* je vhodným cílovým organismem pro terapii nisinem nebo příbuznými peptidy.

Příklad 1b: Chybění aktivity nisinu proti *Bacteroides fragilis*

9 izolátů *B. fragilis* z McGuire Veterans' Administration Hospital, Richmond, VA, bylo testováno způsobem uvedeným výše.

Růst žádného z kmenů nebyl inhibován ani při nejvyšších použitých koncentracích nisinu ($32 \mu\text{g/ml}$). MIC nisinu pro tyto kmeny je proto $64 \mu\text{g/ml}$ nebo vyšší. Podobně, jak je uvedeno v tabulce 3, 23 izolátů z University of Florence (Italy) Hospital mělo také relativně nízkou citlivost na nisin; median MIC byl $> 128 \mu\text{g/ml}$.

Tento příklad prokázal, že pravděpodobnost narušení normální flóry tlustého střeva u lidí je nízká. Dále prokázal, že aktivita nisinu samotného proti vybraným Gram-negativním kmenům nemůže být určena z existujících dat pro jiné kmeny.

Tabulka 1: Aktivita nisinu in vitro proti 20 klinickým izolátům *C. difficile*

Kmen číslo	Minimální inhibiční koncentrace (MIC) nisinu v $\mu\text{g/ml}$
Cd82	0,13
Cd62	$\leq 0,016$
Cd30	0,13
Cd145	0,25
Cd180	0,25
Cd171	0,13
Cd162	0,13
Cd233	0,13
Cd146	0,25
Cd154	0,25
Cd144	0,13
Cd158	0,06
Cd234	0,13
Cd248	0,13
Cd232	0,13

Tabulka 1: (pokračování)

Kmen číslo	Minimální inhibiční koncentrace (MIC) nisinu v $\mu\text{g/ml}$
Cd228	0,25
Cd240	0,25
Cd241	0,25
Cd243	0,25
Cd242	0,06

Tabulka 2: Srovnání aktivity nisinu proti 60 klinickým izolátům
C. difficile

Sloučenina	Rozsah MIC	MIC ₅₀	MIC ₉₀
nisin	0,03 - 1	0,05	0,25
vankomycin	0,13 - 2	0,38	0,8
metronidazol	0,25 - 4	0,35	0,8

Všechny hodnoty MIC jsou uvedeny v $\mu\text{g/ml}$. MIC₅₀ a MIC₉₀ jsou vypočítány geometricky.

Tabulka 3: Srovnání aktivity nisinu proti 23 klinickým izolátům
B. fragilis

Sloučenina	Rozsah MIC	MIC ₅₀	MIC ₉₀
nisin	16 - >128	>128	>128
vankomycin	0,25 - >32	55	13
metronidazol	1 - >16	1,4	2

Všechny hodnoty MIC jsou uvedeny v $\mu\text{g/ml}$. MIC_{50} a MIC_{90} jsou vypočítány geometricky.

Příklad 2: Tolerabilita nisinu v ligovaném střevu králíků

5 králíků bylo uvedeno do anestezie a po celou dobu pokusu byly udržovány v narkolepsii. Břicho bylo rozříznuto a byl ligován segment střeva tvořený ileo-cékálním spojením a proximálním tlustým střevem. Dva králíci sloužili jako kontrola a třem bylo podáno 20 mg nisinu (ve formě získané od výrobce) přímo do ligovaného segmentu střeva. Králíci byli ponecháni naživu 6 hodin.

Při pitvě a při histopatologickém vyšetření exponované oblasti střeva nebyly zjištěny žádné známky iritace nebo toxicity, které by se daly přisoudit léčbě nisinem. Tento příklad ukazuje, že akutní podání nisinu do tlustého střeva králíků v dávce podobné dávce, jaká může být použita u lidí, nezpůsobuje žádnou lokální toxicitu, a to ani tehdy, je-li dávka arteficiálně zadržována ve střevu po dobu 6 hodin pomocí ligace střeva.

Příklad 3: Tolerabilita nisinu při opakovaném podání do střeva psů

Psům byly chirurgicky implantovány hadičky do oblasti proximálního tlustého střeva. Po probírání z anestezie byl skupině 6 psů podáván intrakolonálně nisin v dávce 0, 50, 125 nebo 300 mg/kg za den po dobu 28 dnů; psi byli rozděleni na polovinu pro podání v přibližně 10 hodin a v přibližně 16 hodin každý den.

Při pitvě a při histopatologickém vyšetření a klinickém vyšetření nebyly zjištěny žádné známky lokální iritace nebo systémové toxicity, které by se daly přisoudit léčbě nisinem.

Tento příklad ukazuje, že velmi vysoké dávky nisinu jsou tolerovány při opakovaném podání do tlustého střeva savců.

Příklad 4: Chybění systémové absorpce nisinu ze střeva

V průběhu toxikologických pokusů popsaných v příkladech 2 a 3, výše, byly odebírány vzorky krve pro stanovení nisinu v séru.

V králičím modelu ligovaného střeva (příklad 2) byla krev odebírána 0,5, 2 a 6 hodin po instilaci nisinu. Analýza byla provedena specifickým ELISA testem, který měl hodnotitelný limit 1 $\mu\text{g/ml}$ v králičím séru.

V žádné ze vzorků nebyl nisin detekovatelný, což ukazuje, že absorpce z tlustého střeva je v tomto zvířecím modelu zanedbatelná.

V pokusu na psech (příklad 3) byly vzorky krve odebírány v den 28 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 7 hodin po ranní dávce nisinu. V tomto pokusu bylo sérum testováno mikrobiologickým testem za použití *Micrococcus luteus* jako testovacího organismu; hodnotitelný limit v tomto testu v psím séru je 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Z 18 psů léčených nisinem dokončilo studii 17 psů a 16 psů mělo při pitvě správně umístěný katetr (u dvou psů došlo k úniku materiálu do peritonea; jeden byl utracen předčasně a jeden dokončil studii). U psů, kteří měli správně (intra-intestinálně) umístěný katetr nebyl v žádném času nisin detekovatelný v séru.

Tento příklad dokazuje, že nisin, při správném podání do tlustého střeva savců, i ve vysokých dávkách, není absorbován do systémové cirkulace a je proto značně nepravděpodobné, že by způsobil systémovou toxicitu.

Příklad 5: Nisin může být přítomen v tlustém střevu savců v koncentracích dostatečných pro inhibici cílových bakterií

V pokusu na králících popsaném výše (příklad 2) byly obsahy střevní kličky odebrány při pitvě. Tyto obsahy byly extrahovány a byly analyzovány HPLC. Střevní obsah kontrolních králíků, kterým nebyl podán nisin, byly použity pro hodnocení procesu extrakce. Toto bylo provedeno přidáním známých množství nisinu do těchto vzorků, homogenizací a extrakcí. Nejúčinnější postup extrakce, při kterém bylo zpětně získáno přibližně 50% přidaného nisinu, byl potom použit pro střevní obsahy králíků, kterým byl podán nisin. Více než 24% podaného nisinu bylo zpětně získáno z obsahu střeva ošetřených králíků, což znamená, že s největší pravděpodobností více než polovina nisinu zůstávala stabilní in situ po dobu 6 hodin.

Za předpokladu zvýšení dávky nisinu na 600 mg pro léčbu u dospělých lidí a průměrného (plného) obsahu tlustého střeva přibližně 4 l by mělo být možné dosáhnout lokálních koncentrací až 40-80 $\mu\text{g/ml}$ (nebo 40-80 $\mu\text{g/g}$ obsahu střeva) v tlustém střevu po delší období. Tato hodnota mnohokrát převyšuje MIC cílového organismu, *C. difficile* a *Enterococcus* spp, ale rovná se nebo je nižší než sensitivita protektivní Gram-negativní střevní flory jako je *B. fragilis*. Skutečná dávka může být vyšší nebo nižší, protože závisí na mnoha faktorech, jako je účinnost zahájení působení a rozpouštění dávkové formy u lidí, lokální biologická dostupnost aktivní složky (volné množství dostupné pro interakci s bakteriemi vs. množství vázané na pevný materiál), závažnost onemocnění, transitní doba prostředku u jedince s průjemem atd. Vzhledem k tomu se předpokládá, že během jakékoliv 24-hodinové periody může být podáno více dávek (až 6). Předpokládané rozsahy denních dávek jsou od minimálně 100 mg do maximálně 6 g, lépe od

300 mg do 2 g.

Protože je známo, že nisin velmi rychle zabíjí citlivé bakterie, tak tento příklad ukazuje, že nisin nebo podobné peptidy mohou být při podání v dostatečných dávkách do střeva použity pro léčbu bakteriálních onemocnění způsobených citlivými bakteriemi, nebo pro eliminaci potenciálně nebezpečných citlivých bakterií kolonizujících střevo.

Výše uvedené příklady ukazují, že nisin a jiné peptidy mající podobné antimikrobiální vlastnosti mohou mít - oproti očekávání - požadovaný efekt v prostředí tlustého střeva bez očekávaných možných nežádoucích účinků.

Nejprve byly navrženy prostředky pro dodání terapeutických množství nisinu do tlustého střeva orálním podáním. Příklady 6-8 se týkají takových prostředků. V příkladech uvedených dále byly navrženy dávkové formy, které mohou udržovat svou integritu po dobu alespoň 4 hodin při pH žaludku a po dobu 0,5-3 hodin při pH 6,8 (což je distální částí tenkého střeva) a potom se začnou rozpadat v nebo poblíž tlustého střeva.

Počáteční studie prostředků byly zaměřeny na vývoj nepotažených tabletových jader, které se budou rychle rozpadat ve fosfatovém pufru, pH 7,0. Příprava tabletových jader nebyla jednoduchá z důvodů konkrétních fyzikálně-chemických vlastností nisinu a proto, že aktivní složka tvoří relativně velkou část tabletového jádra. Oproti většině léčivých substancí, včetně medicínálních peptidů, je nisin amfipatický (stejně jako hydrofobní). Proto nisin, ačkoliv je dostatečně rozpustný ve vodě, i při neutrálním pH, nedifunduje snadno ze stlačeného tabletového jádra, pokud je jádro ponořeno v pufru. Místo toho se okolo tablety vytvořila vrstva nisinu ve formě gelu, která

bránila přístupu vody do nitra tablety. Po rozsáhlém výzkumu hodnotícím různé přísady a činidla podporující rozpadavost byl tento jedinečný problém vyřešen pouze tím, že do tablety bylo zapracováno optimální množství chloridu sodného. Toto množství snížilo dostatečně tvorbu gelu, takže bylo umožněno rozpadání tablet.

Druhý problém související s přípravou prostředků se týkal pevnosti tabletového jádra. Tableta musí odolávat důkladnému třepání při následném potahování ve Wuster™ fluidizovaném loži. Tablety obsahující různé procento vysoce účinných pojiv (Povidon, Methocel a Carbopol™) měly pro tento proces nedostatečnou pevnost. Měření uvnitř tablet vedlo k závěru, že z důvodů charakteru a fyzikálně-chemických vlastností nisinu bylo vazbě bráněno zachyceným vzduchem, což vedlo k nízké fyzikální pevnosti tablet. Tento problém byl vyřešen použitím válcování v procesu tabletování.

Uvolňovací charakteristiky prostředku byly určeny potahem tabletových jader kopolymeru kyseliny metakrylové : methylnmethakrylatu (Eudragit™). Doba zahájení rozpadu tablety a doba dokončení rozpadu tablety se reprodukovatelně lišily podle použití různé hmotnosti potahu na tabletovém jádru.

Příklady 6-11 se týkají různých prostředků a testování jejich vhodnosti pro dodání účinných množství lantnocinu podle předkládaného vynálezu do tlustého střeva.

Příklad 6a: Vliv činidla podporujícího rozpadavost na rozpad tablety

Byla připravena tabletová jádra obsahující následující složky:

Složka	Procento hmotnosti léku ¹
Nisin	100
Chlorid sodný	10
Činidlo podporující rozpadavost	10
Aerosil	0,25
Stearan hořečnatý	1,0

¹ hmot./hmot. vzhledem k nisinu

Použitými činidly podporujícími rozpadavost byly Ac-Di-Sol, Explotab a Polyplasdon XL. Doby rozpadu (který byl měřen ve fosfatovém pufru, pH 7) tablet obsahujících různá činidla podporující rozpadavost byly:

Činidlo podporující rozpadavost	Doba rozpadu (n=3)
Ac-Di-Sol	7,6 ± 0,4 min
Explotab	9,1 ± 1,7 min
Polyplasdon XL	9,7 ± 1,8 min.

Tablety obsahující Ac-Di-Sol jako činidlo podporující rozpadavost se rozpadaly rychleji než tablety obsahující jiná činidla. Proto byly další prostředky připraveny s Ac-Di-Sol.

Příklad 6b: Vliv NaCl na rozpad tablety

Byla připravena tabletová jádra obsahující následující složky:

Složka	Procento hmotnosti léku ¹
Nisin	100
Chlorid sodný (Fisher)	0-20
Ac-Di-Sol	10
Aerosil	0,25
Stearan hořečnatý	1,0

¹ hmot./hmot. vzhledem k nisinu

Doby rozpadu (který byl měřen ve fosfatovém pufru, pH 7) tablet obsahujících různá množství NaCl byly:

% chloridu sodného (hmot./hmot. tabl. jádra)	Doba rozpadu (n=3):
a) 0% chloridu sodného	žádný rozpad po 1,5 hodině
b) 0,9% chloridu sodného	žádný rozpad po 1,5 hodině
c) 2,6% chloridu sodného	4,9 ± 0,4 min.
d) 4,2% chloridu sodného	4,1 ± 0,1 min.
e) 8,3% chloridu sodného	6,1 ± 0,5 min.
f) 15,3% chloridu sodného	5,1 ± 0,2 min.

Výše uvedená data ukazují, že přítomnost chloridu sodného v dostatečné koncentraci překonává problém související s tvorbou gelu z nisinu a významně usnadňuje rozpad tablet obsahujících nisin při fyziologickém pH. Testovaná tabletová jádra obsahující více než 1% chloridu sodného se rozpadala za dobu 4-6 minut, zatímco při koncentraci NaCl 1% nebo menší nedošlo k žádnému rozpadu ani po 1,5 hodině. Dále, při koncentracích NaCl až do 15,3% došlo k pouze malým změnám NaCl. Proto, jak uvádí předkládaný výsledek, prostředky s koncentrací NaCl v rozsahu od

přibližně 2% do přibližně 20% dodají účinně nisin nebo jiný lanthocin do střeva.

Příklad 7: Tabletová jádra obsahující nisin

Byla připravena a testována následující tabletová jádra obsahující následující složky v uvedených poměrech:

Šarže	Ac-Di-Sol ¹	Chlorid sodný ¹
NIP (1)	10%	10%
NIP (2)	15%	15%

¹ hmot./hmot. vzhledem k nisinu

NIP (1)

Složení: (procenta vzhledem k nisinu).

Intragranulární:

Nisin	100
Prosolv 90	12,5
Ac-Di-Sol	5
Chlorid sodný	5
Talek	5

Extragranulární:

Prosolv 90	12,5
Povidon	5
Ac-Di-Sol	5
Chlorid sodný	5
Stearan hořečnatý	0,5

Celková hmotnost tablety = 152,5 mg

Vlastnosti tablety:

Drtící síla = $5,65 \pm 1,8$ kp (n = 10)

Doba rozpadu:

v R.O. (reversní osmosou přečištěné) vodě = $24,4 \pm 2,5$ min. (n=3)ve fosfatovém pufru pH = $33,1 \pm 4,5$ min. (n=3)

NIP (2)

Složení: (procenta vzhledem k nisinu).

Intragranulární:

Nisin	100
Prosolv 90	12,5
Ac-Di-Sol	7,5
Chlorid sodný	7,5
Talek	2

Extragranulární:

Prosolv 90	12,5
Povidon	5
Ac-Di-Sol	7,5
Chlorid sodný	7,5
Stearan hořečnatý	0,5

Celková hmotnost tablety = 162,5 mg

Vlastnosti tablety:

Drtící síla = $5,56 \pm 1,89$ kp (n = 10)

Doba rozpadu:

v R.O. vodě = $23,9 \pm 2,1$ min. (n = 3)ve fosfatovém pufru pH = 7,0 = $29,9 \pm 2,7$ min. (n = 3)

Bylo zjištěno nejen to, že tyto dávkové formy mají při simulaci podmínek pasáže gastrointestinálním traktem přijatelné charakteristiky rozpadavosti a příznivé hodnoty drtící síly, ale také to, že při této pasáži byla zachována integrita nisinu a

homogenost obsahu.

Příklad 8:

(A) Příprava tabletových jader

	Složka	Intra- granulárně	Extra- granulárně	Hmotnost	% hmot./hmot. nisinu
1	Nisin	x		600 g	100,0%
2	Chlorid sodný	x		45 g	7,5%
3	AcDiSol ¹	x		60 g	10,0%
4	ProSolv ²	x		75 g	12,5%
5	Talek	x		12 g	2,0%
6	Chlorid sodný		x	45 g	7,5%
7	AcDiSol		x	60 g	10,0%
8	ProSolv		x	75 g	12,5%
9	Povidon ³		x	30 g	5,0%
10	Stearan hořečnatý		x	3 g	0,5%

¹ AcDiSol = zesíťená karboxymethylcelulosa sodná

² ProSolv = zkřemenělá mikrokrytalická celulosa

³ Povidon = polyvinylpyrrolidon

Tabletová jádra byla připravena za použití následujících kroků:

1. Všechny složky se odděleně prosejí přes síto č. 20 (0,0331") mesh.
2. Odváží se intragranulární části nisinu, NaCl, AcDiSol a ProSolv (složky č. 1-4). Tyto složky se smísí ve vhodné skleněné

nádobě.

3. Provede se mísení po dobu 15 minut v Turbula mixéru při 50 rpm.
4. Odváží se talek (složka č. 5). Přidá se ke směsi z kroku 3.
5. Provede se mísení po dobu 3 minut v Turbula mixéru při 50 rpm.
6. Na válcovém lisu (model TF-mini) se stlačí směs z kroku 5, válcovací tlak = 100 kg/cm^2 ; rychlost válcování = 6 rpm; rychlost otáčení = 11 rpm.
7. Pevná hmota z kroku 6 se protlačí přes síto 1,0 mm mesh za použití oscilačního granulačního přístroje (Erweka AR400 Wet-Dry Granulator).
8. Granule z kroku 7 se stlačí ve válcovém lisu, válcovací tlak = 30 kg/cm^2 ; rychlost válcování = 8 rpm; rychlost otáčení = 11 rpm.
9. Pevná hmota z kroku 8 se protlačí přes síto 1,0 mm mesh za použití oscilačního granulačního přístroje.
10. Granule z kroku 9 se stlačí ve válcovém lisu, válcovací tlak = 30 kg/cm^2 ; rychlost válcování = 8 rpm; rychlost otáčení = 11 rpm.
11. Pevná hmota z kroku 10 se protlačí přes síto 1,0 mm mesh za použití oscilačního granulačního přístroje.
12. Odváží se extragranulární části NaCl, AcDiSol, ProSolv a Povidonu (složky č. 6-9). Tyto složky se přidají ke granulím z kroku 11.
13. Provede se mísení po dobu 10 minut v Turbula mixéru při 50 rpm.
14. Odváží se stearan hořečnatý (složka č. 10). Přidá se ke směsi z kroku 13.
15. Provede se mísení po dobu 2 minut v Turbula mixéru při 50 rpm.
16. Směs z kroku 15 se stlačí v rotačním tabletovém lisu (Manesty D3B) (kompresní tlak = 1500 liber; rychlost = 16 rpm) za použití 7,0 mm biokonkávních stanic.

Bylo zjištěno, že tabletová jádra připravená tímto způsobem mají dostatečnou pevnost pro uchování integrity v průběhu

následujícího potahování.

(B) Příprava potažených tablet

	Složka	Hmotnost	% hmot./Eudragit polymeru ¹
1	Eudragit L30D-55	1 kg	-----
2	Triethylcitrat	45 g	15,0%
3	Sterilní voda	500 g	166,7% ²
4	Talek	6 g	2,0%

¹ Disperse je 30% polymer v pevném stavu (t.j. 30 g polymeru v pevném stavu na 100 g disperse)

² Pro přípravu 20% disperse je přidána voda (t.j. 50% hmotnosti disperse Eudragit L30D-55).

Disperse pro potažení tabletových jader připravených v části (A) byla připravena následujícím způsobem:

1. Eudragit L30D-55 se filtruje přes čistící síto.
2. Odváží se disperse Eudragitu L30D-55.
3. Odváží se voda. Za mísení se přidají do disperse Eudragitu asi 2/3 vody.
4. Odváží se triethylcitrat (TEC). Do disperse Eudragitu se za mísení po kapkách přidá TEC. Nádoba na TEC se vypláchne zbytkem vody (ve dvou dílech), která se přidá do směsi.
5. Proveďte se mísení po dobu 1 hodiny.
6. Odváží se talek. Za mísení se přidá do směsi.
7. Proveďte se mísení po dobu 1,5 hodiny.

Tabletová jádra se potáhnou potahovací dispersí následujícím způsobem:

1. Tabletová jádra se umístí ve fluidní vrstvě Wurterova

přístroje.

2. Potahová disperse se použije tak, že je možné kontinuální mísení magnetickou míchačkou.

3. Tabletová jádra se potáhnou za použití následujících potahovacích podmínek:

Rychlost postřiku: 7,0 g/min

Atomizační tlak: 1,5 baru

Vstupní teplota: 50 °C

Příklad 9: Vliv tloušťky potahu na rozpad tablet

Byl testován vliv tloušťky potahu tvořeného Eudragit L30D na rozpad a rozpouštění takto potažených tablet při pH 6,8. Procento tloušťky potahu je poměr hmotnosti potahu ku hmotnosti tabletového jádra. Výsledky uvedené na obr. 2 a 3 ukazují, že doba zahájení, tak doba dokončení rozpadu jsou přímo úměrné tloušťce Eudragit L30D potahu. Výsledky uvedené na obr. 4 ukazují, že doba mezi prvním kontaktem tablety s pufrem a prvním uvolněním nisinu je přímo úměrná tloušťce potahu. Proto může být oddáleného uvolňování potřebného pro dodání do tlustého střeva při orálním podání dosaženo použitím Eudragit L30D potahu v dostatečné tloušťce. Dále mohou být charakteristiky oddáleného uvolňování měněny změnou tloušťky potahu.

V předkládaném vynálezu se předpokládá, že při tloušťce potahu v rozmezí od přibližně 20% do přibližně 180% (0,15 mm až 1,316 mm v osovém měření) bude dosaženo požadovaného oddáleného uvolňování prostředku. Tloušťka přibližně 40% ($0,371 \pm 0,07$ mm v osovém měření) je nejlepším v současnosti známým provedením předkládaného vynálezu.

Příklad 10: Uvolňování léku za simulovaných podmínek průchodu gastrointestinálním traktem

Tablety (6) s Eudragit L30D potahem (tloušťka potahu 0,371 mm při osovém měření) byly připraveny za použití přístroje USP typ II v pufru pH 6,8 při 37 °C za použití rychlosti mísení 100 rpm. Profil rozpouštění těchto tablet byl získán nejprve vystavení tablet působení prostředí s 0,1 N HCl (žaludeční prostředí), po kterém následovalo prostředí s pH 6,8 (tlusté střevo). Výsledky, uvedené na obr. 5, ukazují, že mohou být připraveny takové tablety obsahující nisin, které reprodukovatelně uvolňují nisin během oddáleného období, které je nutné pro dodání do lidského tlustého střeva.

Příklad 11: Důkaz dodání nisinu do střeva lidského subjektu za použití tablet s oddáleným uvolňováním

Byla připravena tabletová jádra obsahující 100 mg nisinu s poměry aktivní složky a přísad popsány v příkladu 8, s tou výjimkou, že byl použit oxid samaria v takovém množství, aby každá tableta obsahovala 10 mg. Tabletová jádra byla potažena Eudragit L30D-55 jako v příkladu 8 se 40% hmotnosti tabletového jádra (tloušťka potahu 0,371 při osovém měření). Další tabletová jádra byla potažena se 120% hmotnosti tabletového jádra (tloušťka potahu 0,896 při osovém měření) a se 180% hmotnosti tabletového jádra (tloušťka potahu 1,316 při osovém měření). Tablety byly potom ostřelovány neutrony. Při tomto ostřelování se část neradioaktivního samaria (^{152}Sm) přeměnila na radioaktivní ^{153}Sm , což umožnilo zobrazení tablet v gastrointestinálním traktu scintigrafií (Digenis, G.A. and Sandefer, E., Gamma Scintigraphy and Neutron Activation Techniques in the In Vivo Assessment of Orally Administred Dosage Forms, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems, 7: 309-345 (1991)).

Scintigrafická studie byla provedena na 12 zdravých lidech mužského pohlaví. Při první návštěvě byla šesti jedincům podána

neutrony-aktivovaná tableta potažená buď 40%, 120% nebo 180% Eudragitu (dva subjekty na prostředek). Ve druhém sezení dostali 4 subjekty jednu 40% tabletu a 2 subjekty dostali jednu 120% tabletu. Tablety se nechaly zapít 250 ml chladné vody. Zobrazování bylo provedeno v intervalech 30 minut.

Obr. 6-8 ukazují osud různých tablet při jejich průchodu gastrointestinálním traktem. Obr. 6A a 6B ukazují postup 40% tablety u jednoho jedince, obr. 7A a 7B ukazují postup 120% tablety a obr. 8A a 8B ukazují postup 180% tablety. Na obr. 6A je vidět, že 40% tableta zůstává intaktní v žaludku a v jejunu. Tableta se zcela rozpadne v proximálním tlustém střevu v 5,5 hodinu (obr. 6B). 120% tableta se začne rozpadat ve 12 hodině, když je b colon transversum (obr. 7B). 180% tableta dojde do rekta prakticky intaktní (obr. 8B). Tyto výsledky ukazují, že načasování rozpadu tablet in vivo i in vitro závisí na tloušťce potahu.

Data od 6 jedinců, kterým byla podána 40% tableta, jsou shrnuta v tabulce 4. U 5 ze 6 jedinců došlo k zahájení rozpadu mezi distálním ileem a colon transversum, s pokračováním rozpadu v tlustém střevu.

Tabulka 4: Rozpad 40%-potažených nisinových tablet u člověka

Jedinec č.	Místo počátku rozpadu tablet
006	střední až distální ileum
012	distální ileum/colon ascendens
003	ileocoekální přechod/terminální ileum
011	colon ascendens
008	colon ascendens/colon transversum
009	colon descendens

Nežádoucí účinky nebyly pozorovány u žádného ze 6 jedinců, kterým byl podán tento prostředek.

Tento příklad ukazuje, že nisin může být připraven v tabletě s charakteristikami uvolňování vhodnými pro lokální léčbu onemocnění tlustého střeva u lidí, že k rozpadu tablet může dojít v lidském tlustém střevu a že dávka 100 mg nisinu je dobře tolerována při podání do lidského tlustého střeva pomocí prostředku s oddáleným uvolňováním. V předkládaném vynálezu jsou navrženy tablety obsahující od přibližně 50 mg do přibližně 600 mg nisinu. V jedné dávce může být podáno více tablet (až 4) a během 24 hodin může být podáno více dávek (až 6). Denní dávka nisinu může být v rozmezí od přibližně 100 mg do přibližně 6 g, lépe je v rozmezí od přibližně 300 mg do přibližně 2 g. Podobné dávky v tabletách a podobné denní dávky jsou také předpokládány pro jiné lanthociny.

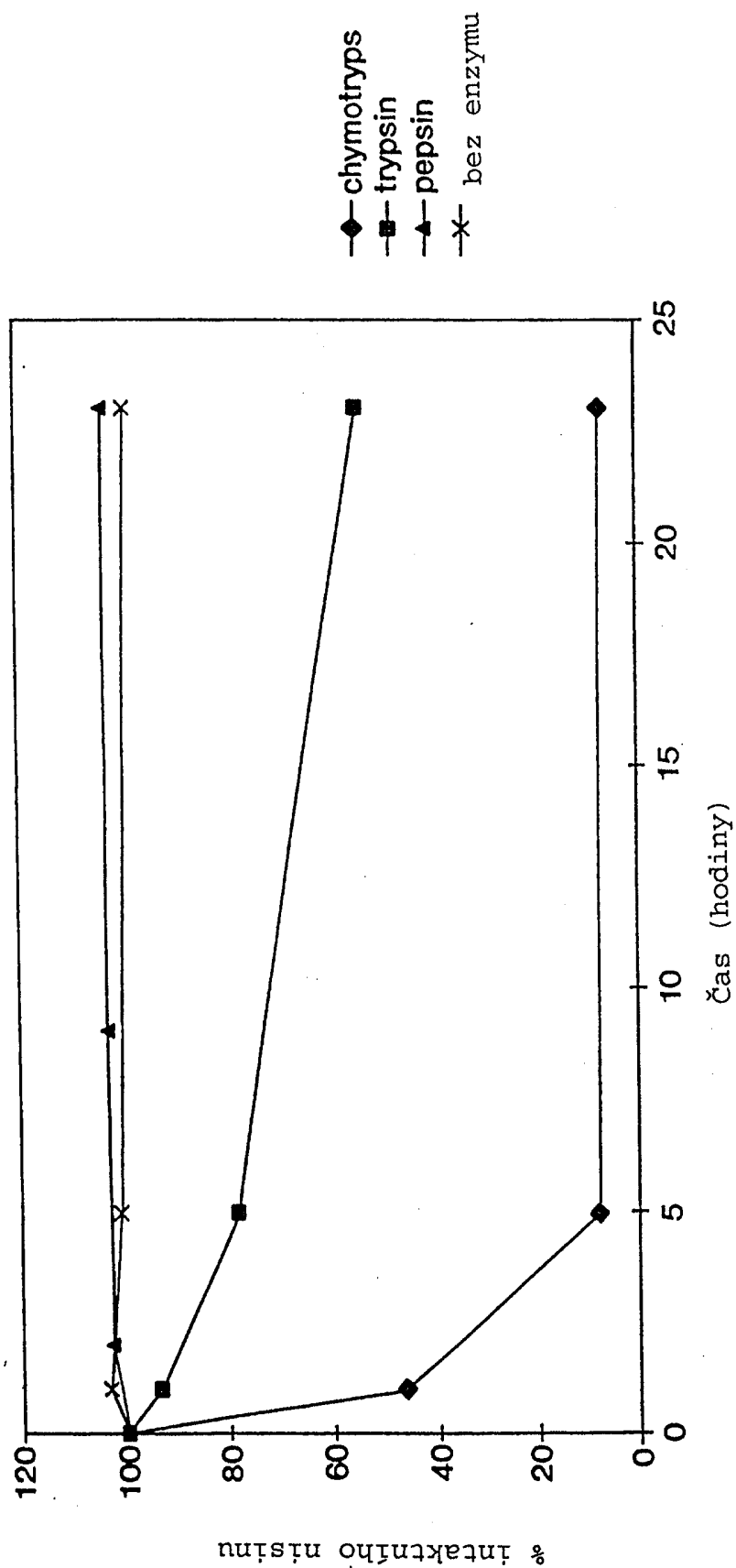
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití lanthocinu pro výrobu léčiva pro léčení chorob vyvolaných bakteriální infekcí tračníku a/nebo pro vyhubení bakterií kolonizujících tlusté střevo.
2. Použití podle nároku 1, kde lanthocinem je nisin.
3. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde bakteriální infekcí je infekce C. difficile.
4. Použití podle nároku 3, kde chorobou je průjem spojený s podáváním antibiotik nebo pseudomembranózní kolitida.
5. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde bakteriemi, které mají být vyhubeny, jsou enterokoky resistantní na vankomycin.
6. Použití podle některého z nároků 1 až 5, kde léčivo je ve formě orálního přípravku.
7. Použití podle nároku 6, kde léčivo je ve formě tablety nebo tobolky.
8. Použití podle některého z nároků 1 až 5, kde léčivo je ve formě rektálního přípravku.
9. Použití podle nároku 8, kde léčivo je ve formě čípků nebo střevního nálevu.
10. Použití podle některého z nároků 1 až 9, kde léčivo obsahuje 50 až 600 mg lanthocinu v jednotkové dávkovací formě.

10.12.99

PV 1999-4379

1 / 11

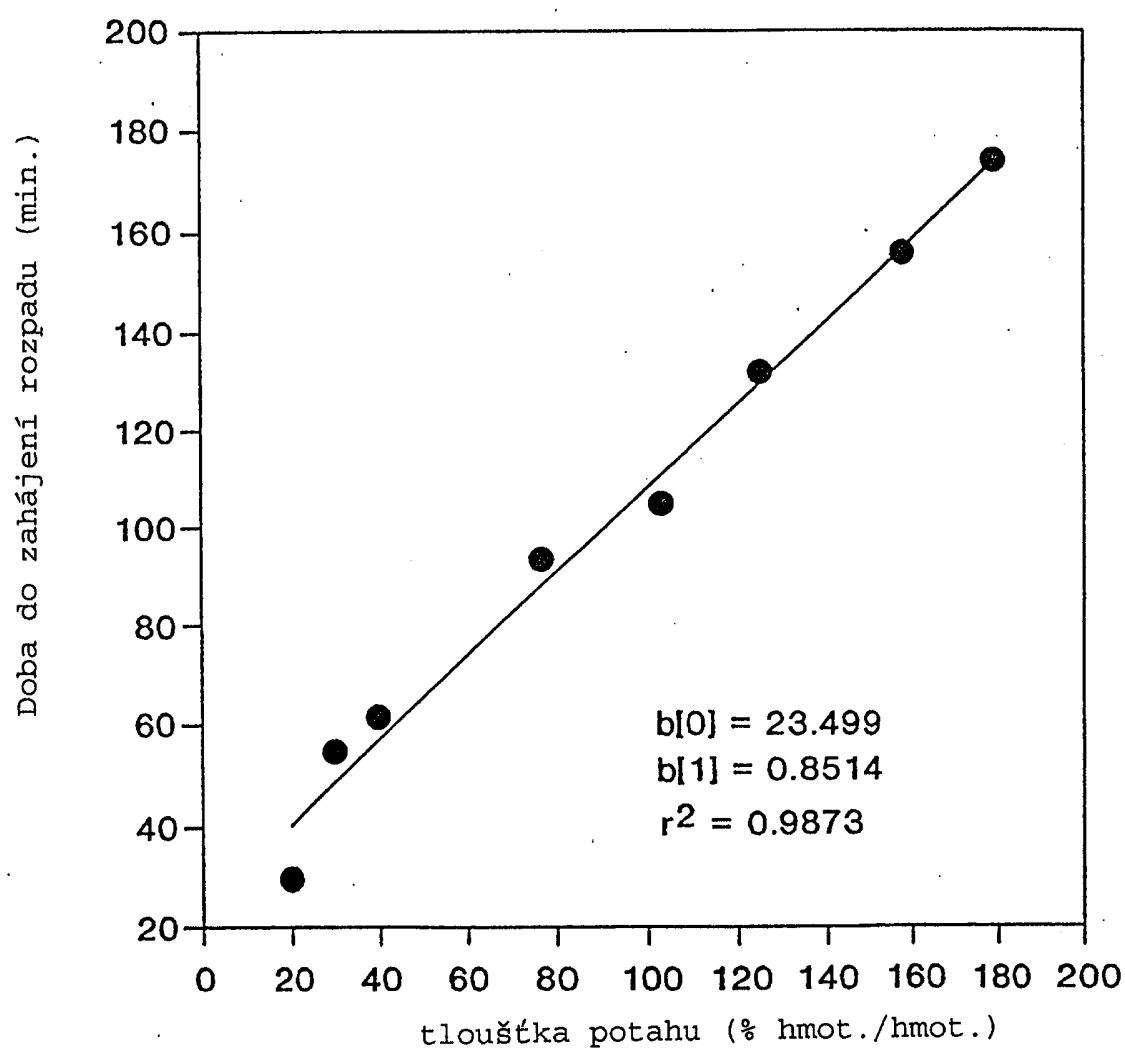


Obr. 1

10.12.99

PV 1999. 4379

2 / 11

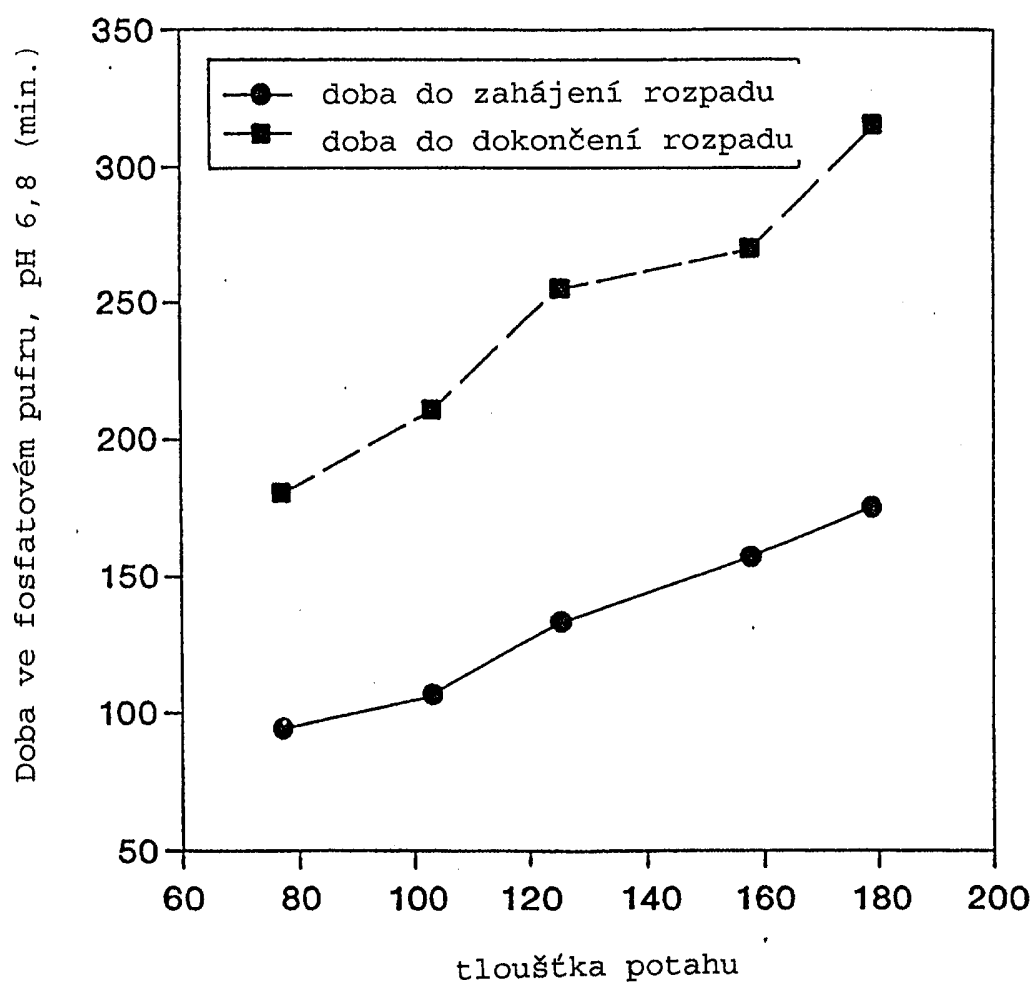


Obr. 2

10.12.99

7V 1999-4349

3/11



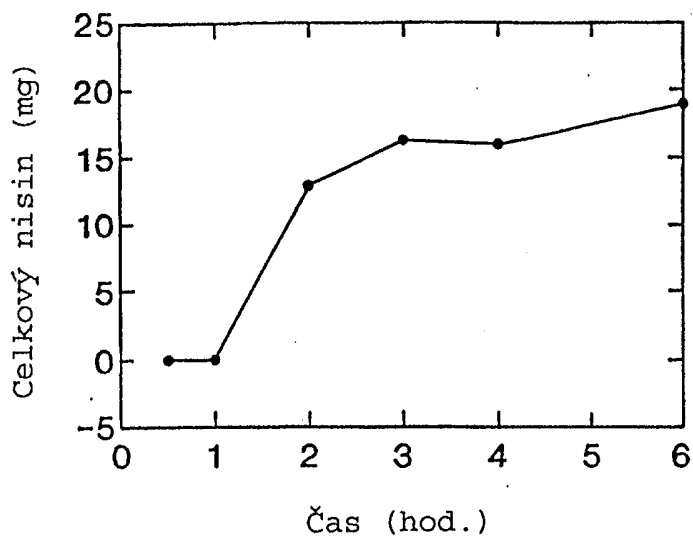
Obr. 3

10.12.99

PV 1999-4349

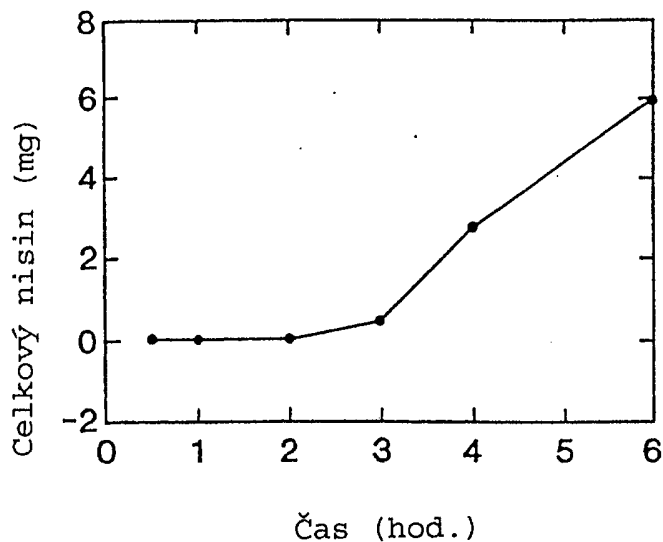
4/11

40% potažená tableta



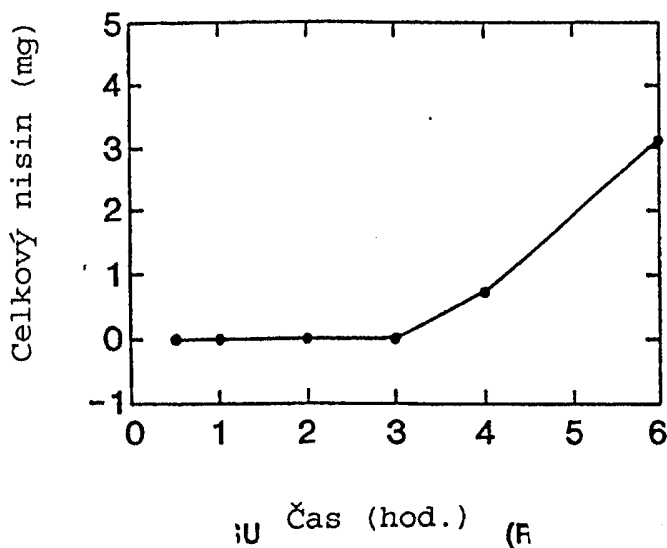
Obr. 4A

120% potažená tableta



Obr. 4B

180% potažená tableta

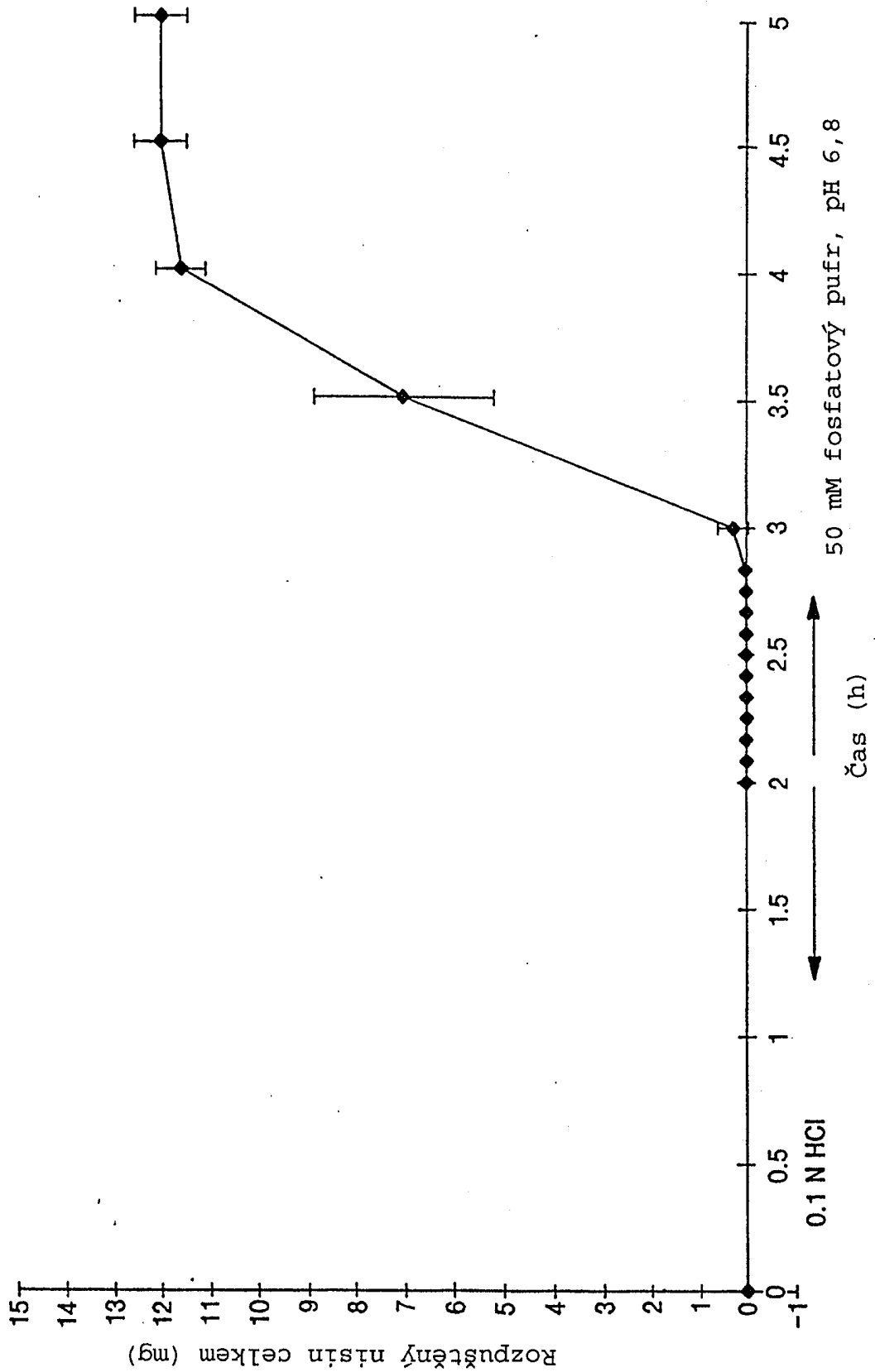


Obr. 4C

10.12.99

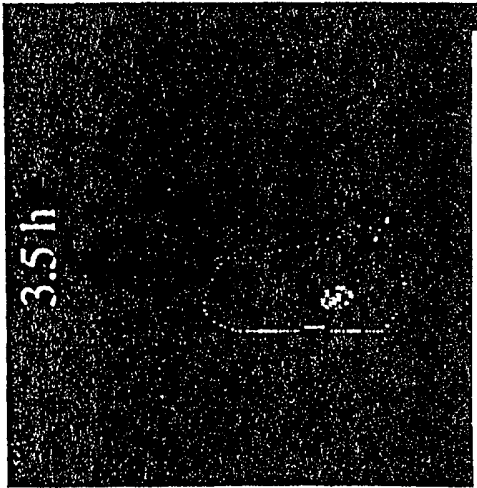
PV 1999-4379

5/11

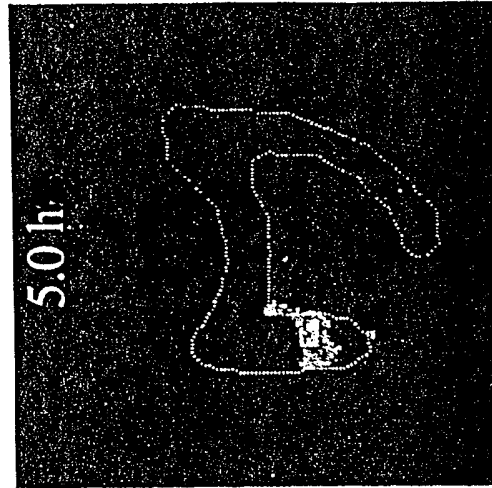


Obr. 5

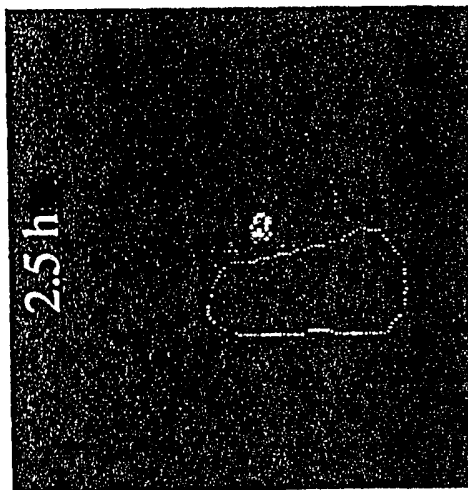
6/11



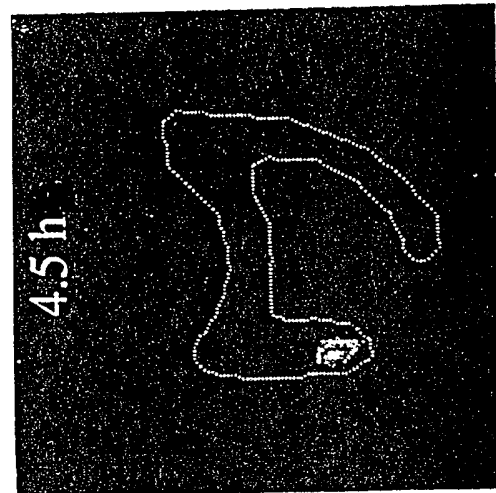
Obr. 6A-3



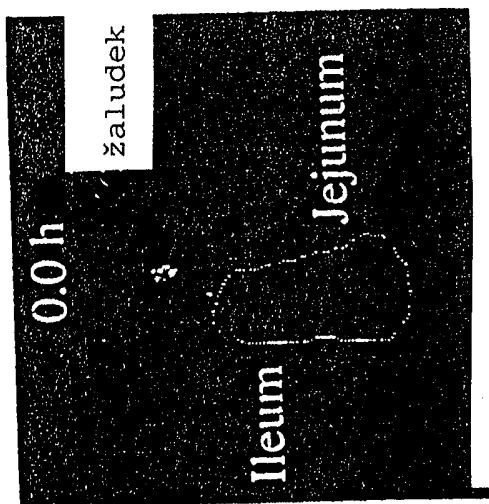
Obr. 6A-6



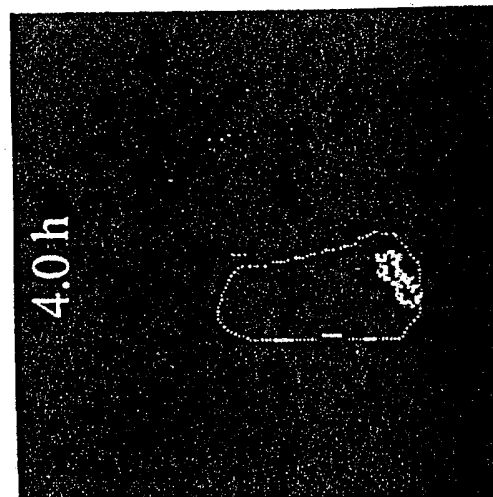
Obr. 6A-2



Obr. 6A-5



Obr. 6A-1

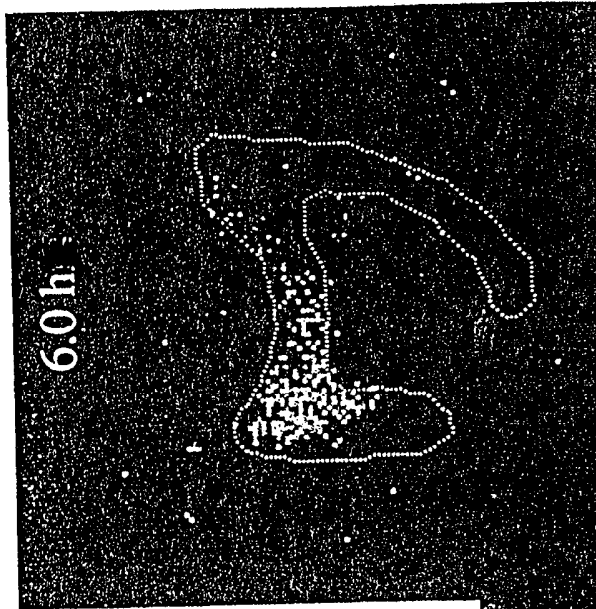


Obr. 6A-4

10.12.99

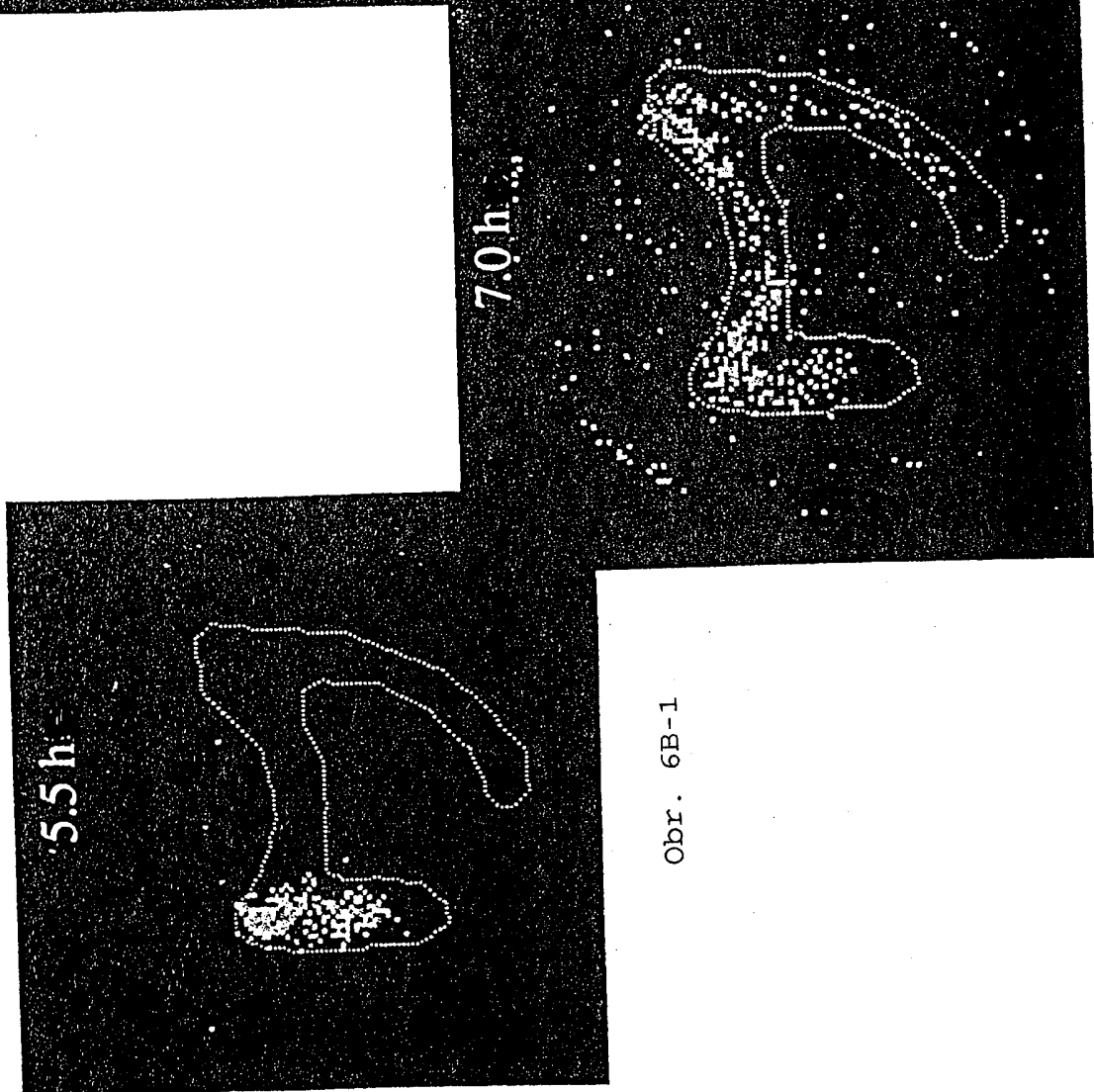
PV 1999-4379

7/11



Obr. 6B-2

Obr. 6B-3

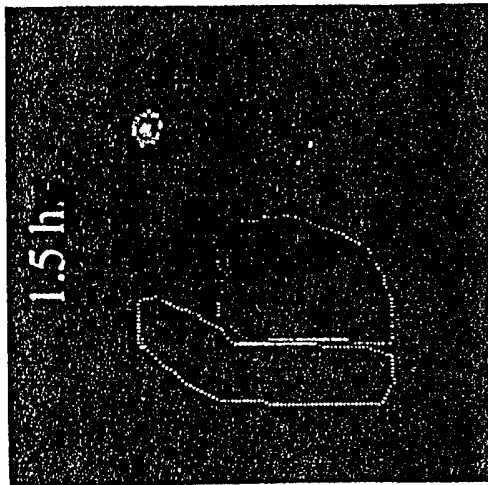


Obr. 6B-1

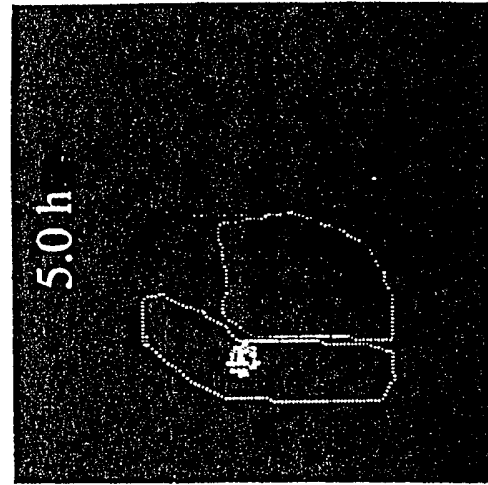
10.12.99

PV 1999 - 4379

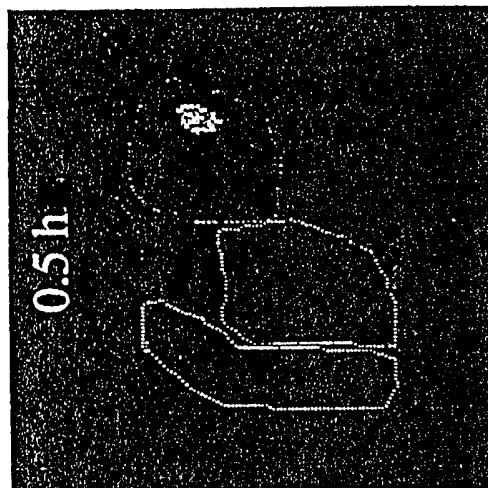
8 / 11



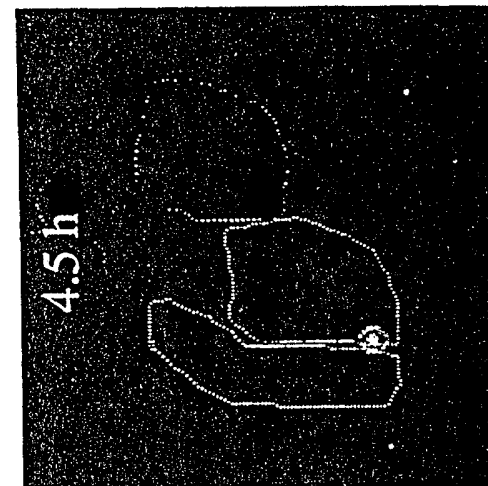
Obr. 7A-3



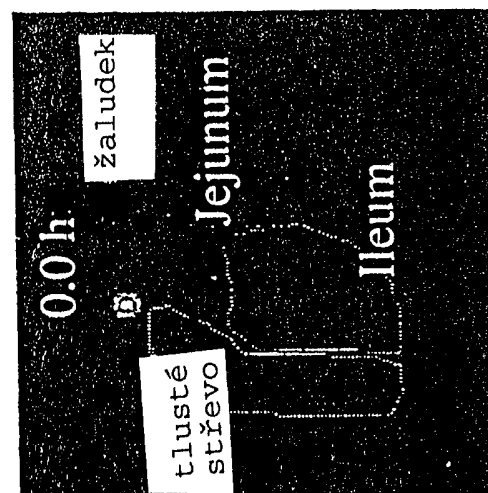
Obr. 7A-6



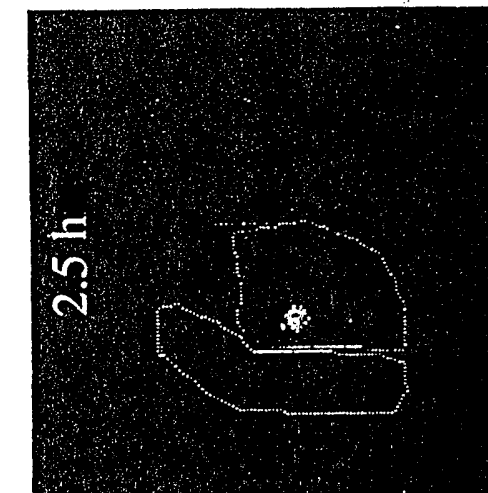
Obr. 7A-2



Obr. 7A-5



Obr. 7A-1

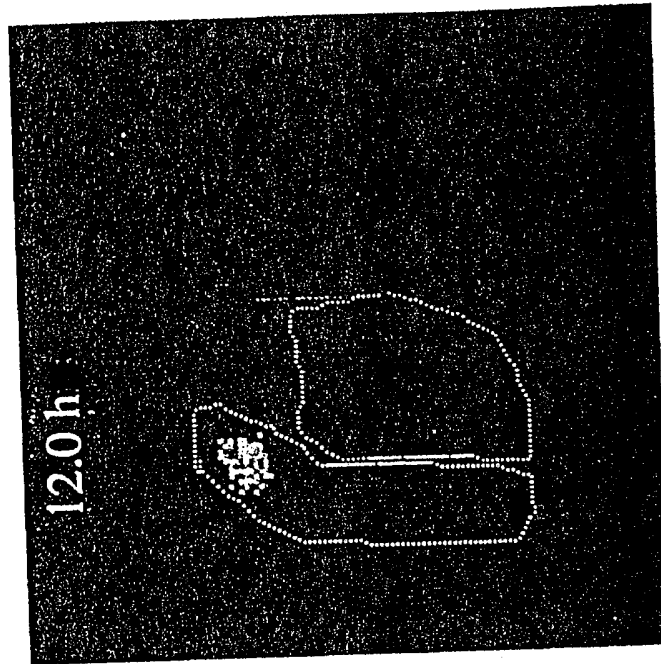


Obr. 7A-4

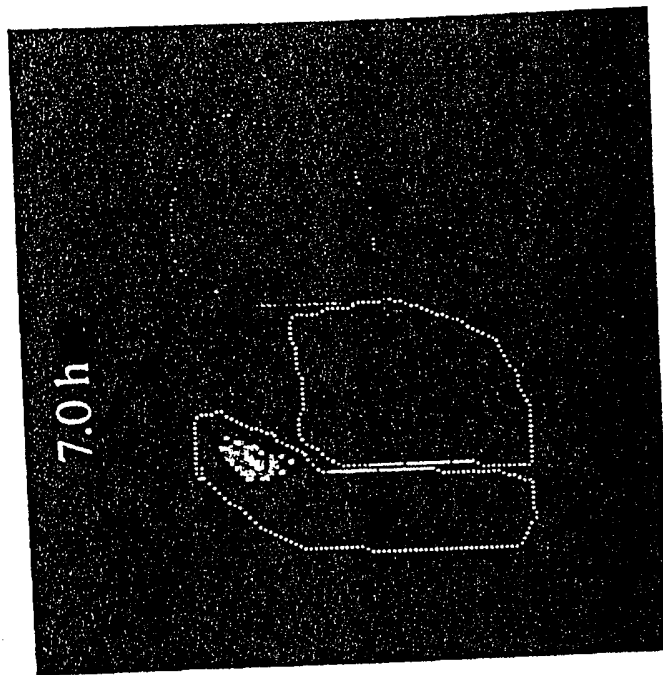
10.12.99

PV 1999-4379

9/11



Obr. 7B-2

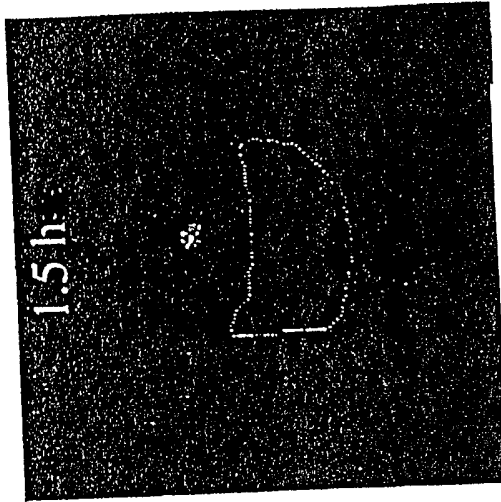


Obr. 7B-1

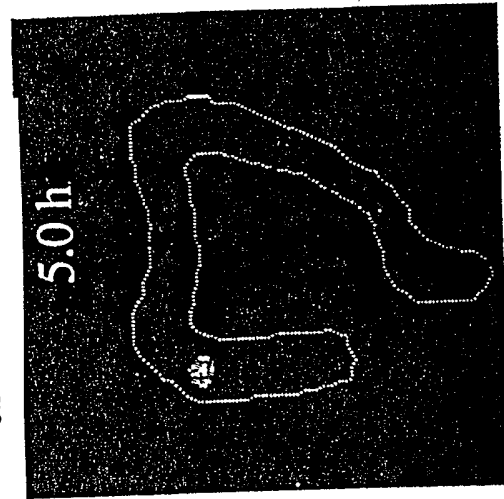
10.12.99

PV 1999-4379

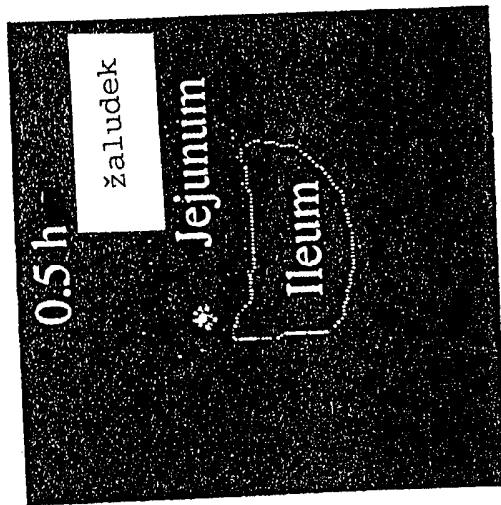
10/11



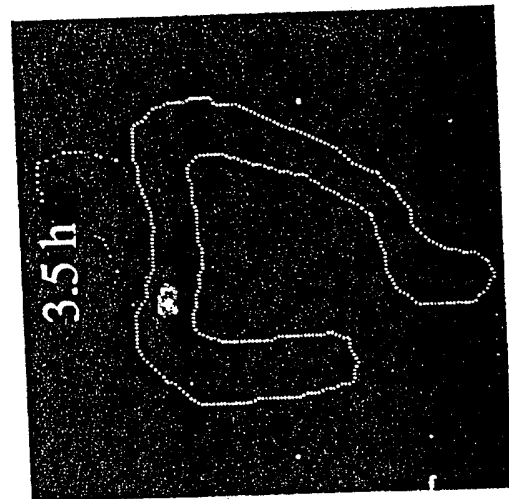
Obr. 8A-3



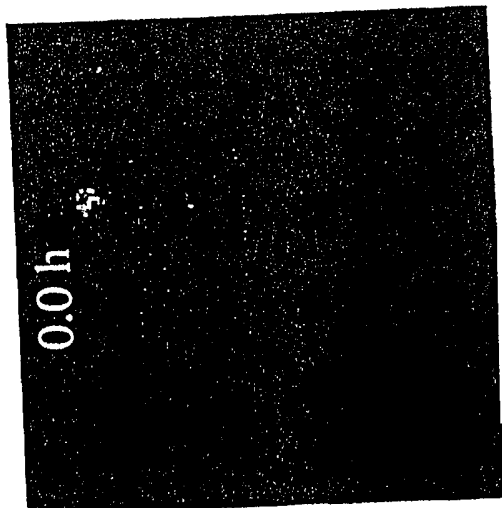
Obr. 8A-6



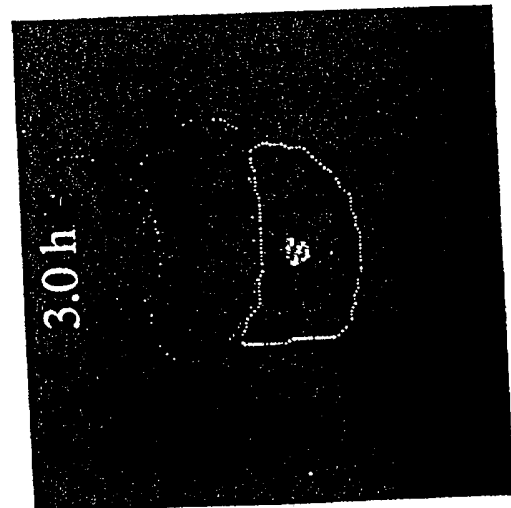
Obr. 8A-2



Obr. 8A-5



Obr. 8A-1

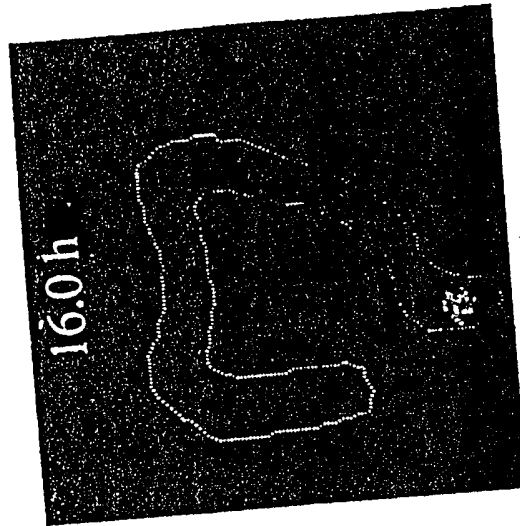


Obr. 8A-4

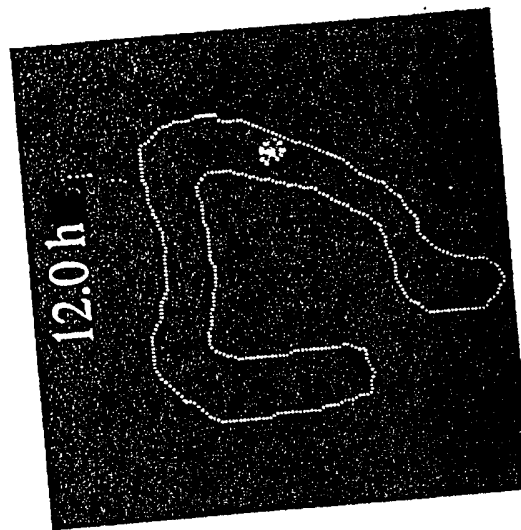
10.12.99

PV 1999-4349

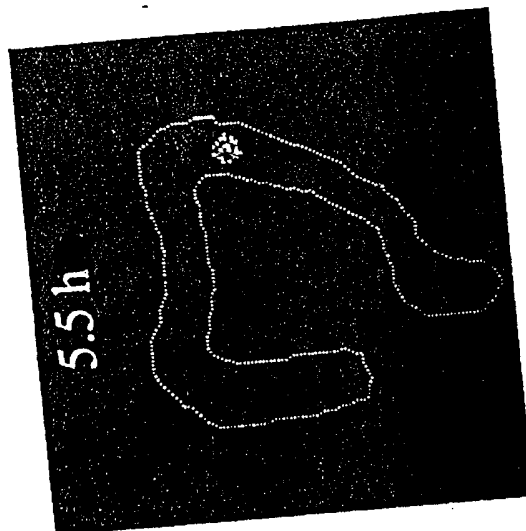
11/11



Obr. 8B-3



Obr. 8B-2



Obr. 8B-1