

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 1515

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.11.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.11.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/247306**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.09.2003**
(Věstník č. 9/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US01/43325**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/058622**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/4741

A 61 K 31/4745

A 61 K 31/47

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

NEOPHARM, INC., Lake Forest, IL, US;

(72) Původce:

Ahmad Imran, Wadsworth, IL, US;

Zhang Jia-Ai (Allen), Vernon Hills, IL, US;

Rahman Aquilur, Potomac, MD, US;

(74) Zástupce:

Guttmann Michal JUDr. Ing., Nad Štolou 12, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Komplexy SN-38 s lipidem a způsob jejich použití

(57) Anotace:

Řešení se týká nových přípravků a způsobů léčení onemocnění způsobených buněčnou proliferací, zejména léčení rakoviny u savců, obzvláště pak lidí. Terapeutické přípravky podle předloženého řešení zahrnují komplexy SN-38 s lipidem, kde komplexy mohou obsahovat kterýkoliv z různých neutrálních nebo nabitých lipidů, výhodně kardiolipin. Přípravky jsou schopné účinně inkorporovat SN-38 do komplexů a jsou schopné solubilizace SN-38 v relativně vysokých koncentracích.

KOMPLEXY SN-38 S LIPIDEM A ZPŮSOB JEJICH POUŽITÍ

Oblast techniky

Předložený vynález se týká komplexů SN-38 s lipidy, jejich způsobu výroby a použití při léčení onemocnění, zejména pak onemocnění týkajících se proliferace eukaryotických buněk.

Dosavadní stav techniky

Sloučenina známá jako 7-ethyl-10-hydroxykamptothecin (SN-38) a formálněji jako ((+)-(4*S*)-4,11-diethyl-4,9-dihydroxy-1*H*-pyrano[3',4':6,7]-indolizino[1,2-*b*]chinolin-3,14(4*H*,12*H*)-dion byla poprvé popsána v patentu US 4,473,692 jako aktivní metabolit irinotekanu, derivát kamptothecinu. Předpokládá se, že tato látka se váže na enzym topoizomerázu I, což je enzym zodpovědný za uvolnění torzního napětí v DNA indukci reverzibilních jednořetězcových zlomů. Zdá se, že vazba SN-38 blokuje religaci („religation“) jednořetězcových zlomů tomoizomerázou-I, což způsobuje cytotoxicitu u savčích buněk, které zřejmě nemohou jinak dostatečně opravit vzniklé zlomy.

Metabolická konverze irinotekanu na SN-38 se primárně vyskytuje v játrech a zahrnují štěpení karbamátové vazby mezi kamptotecinovou částí a dipiperidinovým vedlejším řetězcem, které je zprostředkováno karboxylesterázou. Následně tento derivát podléhá konjugaci za vzniku glukuronidového metabolitu.

Jako inhibitor topoizomerázy I purifikované z lidských a hlodavčích buněčných linií je SN-38 přibližně 1000-krát účinnější než irinotekan. *In vitro* testy cytotoxicity ukázaly, že SN-38 je až 2000-krát toxičtější než irinotekan. Z toho plyne, že SN-38 má potenciál být vysoce účinným antineoplastickým agens. Tudíž SN-38 je výhodnější než jeho kamptothecinové prekurzory z hlediska toho, že nevyžaduje aktivaci v játrech. Odpovídající formulace by tedy mohla být používána při místních i systémových způsobech léčení.

SN-38 je neobyčejně nerozpustný ve vodných roztocích. Navzdory své nerozpustnosti ve vodě, má také nízkou afinitu k lipidovým membránám, ze kterých má tendenci precipitovat do vodné fáze. Tyto vlastnosti (rozpustnost)

brání využití SN-38 jako terapeutika. Navíc účinnost SN-38 při opakovaných podáních může být limitována vznikem multirezistence, která nejenže snižuje účinnost samotného léku, ale také účinnost určitých dalších antineoplastických terapeutik. Obecná toxicita SN-38 také limituje jeho terapeutické použití.

Tudíž zde existuje potřeba formulací, které zlepší účinnost SN-38 takovým způsobem, že SN-38 může být používáno účinněji při léčení onemocnění souvisejících s buněčnou proliferací. Taková formulace by měla mít vhodnou rozpustnost a toxicitu a byla by účinná při léčení určitých proliferativních onemocněních, např. rakovině.

Předložený vynález poskytuje takové způsoby a přípravek. Tyto a další výhody předloženého vynálezu, jakož i další charakteristiky vynálezu, budou lépe pochopeny pomocí následujícího popisu předloženého vynálezu.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká nových přípravků SN-38, způsobů jejich přípravy a použití při léčení onemocnění způsobených proliferativními eukaryotickými buňkami, např. rakovina, zejména u savců, obzvláště pak lidí. Přípravky SN-38 zahrnují SN-38 komplexovaný s lipidem, kde více než 50 hmotn. % SN-38 je komplexováno s lipidem. Komplexy zahrnují lipozómy a mohou obsahovat kteroukoliv z různých neutrálních nebo nabitých lipidových látek, výhodně kardiolipin. Vhodné lipidy zahrnují jakékoliv farmaceuticky přijatelné lipofilní látky, které váží SN-38, čímž poskytují stabilní farmaceutickou formulaci a usnadňuje její podání savcům. Kardiolipin může být syntetický nebo získaný z přírodních zdrojů. Lipidové komplexy mohou mít vlastní negativní nebo pozitivní náboje nebo mohou být neutrální. Výhodné komplexy také obsahují α - tokoferol. Komplexy SN-38 mohou být používány výhodně se sekundárními terapeutickými agens jinými než SN-38, včetně antineoplastických, antifungálních, antibiotických nebo jiných aktivních agens. Lipozómové komplexy mohou být multilamelární vezikuly, unilamelární vezikuly nebo jejich směsi podle potřeby. Předložený vynález také zahrnuje způsoby přípravy takových komplexů SN-38. Předložený vynález se dále týká způsobů, při kterých terapeuticky účinné množství SN-38 komplexů je zahrnuto ve farmaceuticky přijatelném excipientu a

podáváno savci, např. lidem, za účelem léčení proliferativních onemocnění, např. rakoviny.

V jednom zejména výhodném způsobu přípravy komplexů SN-38 je SN-38 rozpuštěno v alkalickém roztoku a používáno k hydrataci lipidové vrstvy za vzniku lipozómů.

Detailní popis vynálezu

Předložený vynález se týká přípravků a způsobů dodání SN-38 do savčího hostitele. Přípravky a způsoby jsou charakterizovány obcházením problémů s rozpustností SN-38, vysokou stabilitou SN-38 a komplexu, schopností podání SN-38 jako bolusu nebo krátké infuze ve vysokých koncentracích, sníženou toxicitou SN-38, zvýšenou terapeutickou účinností SN-38 a modulací multirezistence.

Přípravek podle předloženého vynálezu je lipidový komplex s SN-38, ve kterém komplex výhodně obsahuje kardiolipin. Vhodné komplexy jsou charakterizovány vazbou SN-38 s lipofilní sloučeninou, která mění rozpouštěcí charakteristiky takovým způsobem, že mohou být vytvořeny a používány stabilní farmaceutické preparáty. Komplexy zahrnují, ale není to nikterak limitováno, lipozómy a micely. V komplexech může být SN-38 vázán na lipid kovalentními, hydrofóbními, elektrostatickými, vodíkovými nebo jinými vazbami a vazba může být kdekoliv, kde může být SN-38 jednoduše zachyceno do vnitřku lipozómu. Přípravky SN-38 zahrnují SN-38 komplexované s lipidem, kde asi 50 hmotn.% SN-38 nebo více je komplexováno s lipidem, výhodněji asi 70 hmotn.% nebo více, ještě výhodněji asi 80 hmotn.% nebo více a nejvýhodněji asi 90 hmotn.% SN-38 nebo více je komplexováno s lipidem.

Výhodně obsahují komplexy SN-38 se lipidem kardiolipin. Může být používán kterýkoliv vhodný kardiolipin. Například může být kardiolipin purifikován z přírodních zdrojů nebo může být chemicky syntetizován, např. tetramyristylkardiolipin, způsoby, které jsou známe z dosavadní techniky.

Komplexy SN-38 obecně obsahují kromě kardiolipinu další komplexotvorná činidla. Vhodná činidla zahrnují farmaceuticky přijatelné syntetické, semisyntetické (modifikované přirozené) nebo přirozeně se vyskytující sloučeniny

mající hydrofilní a hydrofóbní místa. Tyto sloučeniny zahrnují amfifilní molekuly, které mohou mít vlastní pozitivní, negativní nebo neutrální náboje, nebo které postrádají náboj. Vhodná komplexotvorná činidla zahrnují sloučeniny, např. fosfolipidy, jenž mohou být syntetické nebo odvozené z přírodních zdrojů, např. získané z vajec nebo sóji. Vhodné fosfolipidy zahrnují sloučeniny, např. fosfatidylcholin (PC), fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylserin (PS), fosfatidylglycerol (PG), fosfatidovou kyselinu (PA), fosfatidylinositol (PI), sfingomyelin (SPM) atd., samotné nebo v kombinaci. Používány mohou být fosfolipidy dimyristoylfosfatidylcholin (DMPC), dimyristoylfosfatidylglycerol (DMPG), dioleoylfosfatidylglycerol (DOPG), distearoylfosfatidylcholin (DSPC), dioleoylfosfatidylcholin (DOPC), dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC), diarachidonoylfosfatidylcholin (DAPC) nebo hydrogenovaný sojový fosfatidylcholin (HSPC).

Komplexy SN-38 s lipidem obecně zahrnují alespoň jednu steroidní složku, např. cholesterol, polyethylenglykolové deriváty cholesterolu (PEG-cholesteroly), koprostanol, cholestanol nebo cholestan nebo α -tokoferol. Také mohou obsahovat deriváty sterolu, např. cholesterol-hemisukcinát (CHS), cholesterol-sulfát, atd. Mohou být také používány deriváty organických kyselin s tokoferoly, např. α -tokoferol-hemisukcinát (THS). Vhodné komplexy SN-38 mohou být také připraveny s glykolipidy nebo přirozenými nebo derivatizovanými mastnými kyselinami, atd. Výhodná komplexotvorná činidla SN-38 zahrnují kardiolipin, fosfatidylcholin, cholesterol a α -tokoferol, které jsou spojeny za vzniku lipozómu.

Může být používáno jakékoliv vhodné množství SN-38. Vhodná množství SN-38 jsou ta množství, která mohou být stabilně inkorporována do komplexů podle předloženého vynálezu. SN-38 by měl být výhodně přítomen ve výše uvedených přípravcích o koncentraci od asi 0,01 do asi 5 mg/ml, výhodněji od asi 0,1 do asi 4 mg/ml, ještě výhodněji od asi 0,5 do 3 mg/ml, a ještě výhodněji od asi 0,8 do 2, nejvýhodněji od asi 1 do 1,5 mg/ml SN-38.

Vhodné přípravky také obecně obsahují od asi 1 do asi 50 hmotn.% kardiolipinu nebo výhodně od asi 2 do asi 25 hmotn.% kardiolipinu, výhodněji od asi 5 hmotn.% do asi 20 hmotn.% kardiolipinu. Tyto přípravky také obecně obsahují od asi 1 hmotn.% do asi 95 hmotn.% fosfatidylcholinu, nebo výhodněji od asi 20 hmotn.% do asi 75 hmotn.% fosfatidylcholinu. Výhodné přípravky také

obecně obsahují α -tokoferol v koncentraci od asi 0,001 hmotn.% do asi 5 hmotn.%.

O komplexotvorných činidlech lze také uvažovat jako o látkách vytvářejících lipozómy a v takových případech, kdy jsou používána k přípravě lipozómů dosud známými způsoby. K přípravě požadovaných komplexů mohou být rozpuštěna samotná nebo s dalšími lipofilními složkami, včetně SN-38, ve vhodných rozpouštědlech. Vhodná rozpouštědla jsou taková, která poskytují dostatečnou rozpustnost a mohou být odpařena bez zanechání jakýchkoliv množství farmaceuticky nepřijatelných zbytků. Například může být kardiolipin rozpuštěn v nepochárním nebo mírně polárním rozpouštědle, např. ethanolu, methanolu, chloroformu nebo acetonu. SN-38 může být rozpuštěn v nepochárním, mírně polárním nebo polárním rozpouštědle. Příklady vhodných rozpouštědel SN-38 zahrnují methanol, chloroform, aceton nebo vodné alkalické rozpouštědlo.

Obecně zahrnuje způsob smíchání rozpuštěných lipofilních složek dohromady a odpaření nebo lyofilizaci rozpouštědla(del) za vzniku homogenní lipidové vrstvy. Odpaření rozpouštědla může být provedeno jakýmikoliv vhodnými prostředky, při kterých není narušena stabilita složek. Lze říci, že SN-38 je stabilní do té doby, dokud si chemická struktura udrží svou integritu nebo do té doby, dokud chemická struktura je v rovnováze. Chemické struktury v rovnováze s SN-38 specificky zahrnují struktury, jenž poskytují větší rozpustnost při vyšším pH, ale které jsou konvertovány na SN-38, pokud je pH sníženo.

Komplexy SN-38, včetně lipozómů nebo micel, pak mohou být připraveny přidáním vhodného rozpouštědla do suché směsi lipidové vrstvy. Vhodná rozpouštědla zahrnují farmaceuticky přijatelná rozpouštědla. Obecně jsou rozpouštědla vodné roztoky obsahující farmaceuticky přijatelné soli, pufrý nebo jejich směsi. V jednom způsobu je lipidová vrstva hydratována vodným roztokem SN-38 majícím alkalické pH. Vhodné rozmezí pH se pohybuje od asi 7 do asi 11, pH od asi 8 do asi 10 jsou výhodnější a nejvýhodnější jsou pH od asi 9 do asi 10. Vodné roztoky mající vhodné pH mohou být připraveny z vody obsahující vhodné množství NaOH v něm rozpuštěné. Alternativně mohou být takové roztoky připraveny s pufrý, např. Tris•HCl, které mají pK v rozmezí 1 pH jednotky požadovaného pH.

Lipozómové komplexy jsou připraveny dispergováním lipidu ve vodném roztoku za intenzivního míchání. Může být používán jakýkoliv způsob míchání tak, aby vybraný způsob vytvářel dostatečnou hybnou sílu mezi lipidovou vrstvou a polárním rozpouštědlem, čímž by docházelo k homogenizaci směsi a tvorbě požadovaných komplexů. Například míchání může být dosaženo vortexem, magnetickým mícháním a/nebo sonikací. Tam, kde jsou potřeba multilamelární lipozomy, lze je jednoduše vytvořit vortexováním roztoku. Tam, kde jsou potřeba unilamelární lipozomy, je do způsobu zahrnutý sonikační nebo filtrační krok.

Lipozomální komplexy SN-38 mohou být připraveny smícháním SN-38, kardiolipinu, cholesterolu, fosfatidylcholinu a α -tokoferolu ve vhodném rozpouštědle za vzniku homogenní směsi. Směs je sušena za vzniku lipidové vrstvy a hydratována do lipozómů přidáním vody nebo vodného roztoku a mícháním.

Alternativně mohou být lipozomy SN-38 připraveny společným rozpuštěním lipofilních složek (s výjimkou SN-38) a jejich odpařením za vzniku lipidové vrstvy. Roztok SN-38 se připraví ve vodném roztoku o alkalickém pH a použije k hydrataci suché lipidové vrstvy a tvorby lipozómů.

Obecně může být používán kterýkoliv vhodný způsob tvorby lipozómů, pokud generuje lipozomálně zachycený SN-38. Mohou být používány multilamelární vezikuly, stabilní plurilamelární vezikuly a vezikuly s odpařováním v obrácené fázi („reverse phase evaporation“ vezikuly). Předložený vynález se týká také přípravků s SN-38 zachyceným do lipozómu.

Vhodné lipozomy mohou být neutrální, negativně nebo pozitivně nabitě, kde náboj může být funkcí náboje lipozómových složek a pH lipozómového roztoku. Například při neutrálním pH mohou ze směsi fosfatidylcholinu, cholesterolu a stearylaminu vznikat pozitivně nabitě lipozomy. Negativně nabitě lipozomy mohou vznikat například z fosfatidylcholinu, cholesterolu a fosfatidylserinu.

Cílové agens mohou být navázány na komplexy SN-38 takovým způsobem, že komplexy mohou být nasměrovány do konkrétních tkání nebo orgánů. Agens mohou být vázány kovalentními, elektrostatickými nebo hydrofóbními vazbami s komplexy. Vhodné cílové agens zahrnují sacharidy a proteiny nebo jsou známy jiné agens, jenž dosáhnou žádaných tkání nebo orgánů. Například patent US

6,056,973, který je zde uveden jako odkaz, publikuje některá cílová agens a cílové buňky. (Viz col. 11, 1.1-41). Publikovány jsou také způsoby přípravy vhodných konjugátů. (Viz Col. 11, 155 – col. 14, 1.20).

Komplexy SN-38 mohou být filtrovány přes vhodné filtry kvůli regulaci rozdělení velikosti. Vhodné filtry zahrnují ty, které mohou být používány k dosažení požadovaného rozsahu velikosti lipozómů z filtrátu. Například mohou být připraveny lipozómy a následně filtrovány přes 5 mikronový filtr kvůli získání lipozómů majících průměr asi 5 mikronů nebo menší. Alternativně mohou být k přípravě lipozómů majících průměry asi 1 μ m, 500 nm, 200 nm, 100 nm nebo jakýchkoliv jiných vhodných velikostech používány 1 μ m, 500 nm, 200 nm, 100 nm nebo jiné filtry. Alternativně se může filtrace provádět po formulaci v tekutých excipientech nebo ředících roztocích, jak je popsáno níže.

Pokud je třeba, mohou být lipozómy sušeny, např. odpařením nebo lyofilizací, a lipozómy resuspendovány v jakémkoliv vhodném polárním rozpouštědle. Pokud jsou lipozómy lyofilizovány, mohou být před lyofilizací přidány neredukující cukry kvůli získání stability. Jedním z takových vhodných cukrů je sacharosa. Pokud jsou lipozómy připraveny hydratací lipidové vrstvy alkalií, vodné roztoky obsahující SN-38, je žádoucí použít pufr s nízkým pH k resuspendování lyofilizovaných lipozómů. Vhodná rozpouštědla pro resuspendování lipozómů zahrnují například roztok pufovaný laktátem mající pH asi 3,5.

Předložený vynález zahrnuje farmaceutické preparáty, které kromě netoxických, inertních, farmaceuticky přijatelných excipientů obsahují komplex SN-38, a způsoby přípravy takových přípravků. Netoxickými, inertními, farmaceuticky přijatelnými excipienty se rozumějí pevné, polopevné nebo tekuté ředící roztoky, fillery a pomocné látky jakéhokoliv typu.

Předložený vynález také zahrnuje farmaceutické preparáty v jednotkových dávkách, což znamená, že preparáty jsou ve formě individuálních částic, např. kapslí, pilulek, čípků a ampulí, kde obsah komplexu SN-38 odpovídá frakci nebo mnohačetné jednotlivé dávce. Jednotlivé dávky mohou obsahovat např. 1, 2, 3 nebo 4 jednotlivé dávky nebo 1/2, 1/3 nebo 1/4 jednotlivých dávek. Jednotlivá dávka výhodně obsahuje takové množství SN-38, které je obsaženo v jednom

podání, a které obvykle odpovídá celé, poloviční, třetinové nebo čtvrtěnní denní dávce.

Tablety, dražé, kapsle, pilule, granule, čípky, roztoky, suspenze a emulze, pasty, masti, gely, krémy, lotion, prášky a spreje mohou být vhodné farmaceutické preparáty.

Pro perorální způsob podání může být používán komplex SN-38 ve formě tablet, kapslí, losengů („losenges“), prášků, sirupů, vodných roztoků, suspenzí, atd. K přípravě tablet mohou být používány nosiče, např. laktosa, citrát sodný a soli kyseliny fosforečné. Dále mohou být zahrnuty bobtnadla, např. škrob a lubrikační prostředky, např. stearát hořečnatý, laurylsulfát sodný a talek. Ředící roztoky, např. laktosa a polyethylenglykoly o vysoké molekulové hmotnosti mohou být používány při přípravě dávek ve formě kapslí. Aktivní složka může být kombinována s emulzifikačními a suspenzačními prostředky k vytvoření vodných suspenzí pro perorální použití. Podle potřeby mohou být přidány aromatizační prostředky, např. sladidla.

Pro místní podání a čípky mohou být lékové komplexy opatřeny ve formě takových gelů, olejů a emulzí, které se připravují přidáním vhodných, ve vodě rozpustných nebo ve vodě nerozpustných excipientů, např. polyethylenglykoly, určité tuky a estery nebo směsi těchto látek. Vhodné excipienty jsou takové, ve kterých jsou lékové komplexy dostatečně stabilní pro terapeutické použití.

Výše uvedené farmaceutické přípravky jsou připraveny pro podání obvyklým způsobem podle známých metod, např. smícháním komplexovaného SN-38 s vhodným excipientem(y).

Předložený vynález také zahrnuje použití SN-38 podle předloženého vynálezu a farmaceutické preparáty, které obsahují SN-38 podle předloženého vynálezu, na lidech a ve veterinární medicíně pro prevenci, zlepšení a/nebo léčení onemocnění, zejména pak těch nemocí, které jsou způsobeny buněčnou proliferací, např. rakovinou, u kteréhokoliv savce, např. krávy, koně, prasete, psa či kočky. Nicméně způsob je obzvláště výhodný pro použití při léčení lidí, zejména pak rakoviny a dalších onemocnění způsobených buněčnou proliferací. Přípravky podle předloženého vynálezu mají konkrétní použití při léčení lidského lymfomu, rakoviny vaječníků, prsou, plic a střeva kromě roztroušené sklerózy.

Aktivní sloučenina nebo její farmaceutické preparáty mohou být podávány perorálně, parenterálně, intraperitoneálně, rektálně nebo intratumorální injekcí. Jelikož SN-38 nevyžaduje aktivaci v játrech, je výhodné používat předložené přípravky místně, např. přímou injekcí do ramene nebo nohou nebo v případě lidí do ruky.

Dávka se u lidí vážících 70 kg pohybuje např. od asi 0,1 do 2 mg nebo od asi 0,5 do 1 mg SN-38 na kg tělesné hmotnosti. Výhodně se dávka pohybuje od asi 0,5 do 2,0 mg SN-38 na kg tělesné hmotnosti. Nicméně může být nezbytné se odchýlit od výše zmíněného rozmezí dávek a to zejména z hlediska charakteru a tělesné hmotnosti subjektu, který má být ošetřován, charakteru a síle onemocnění, charakteru preparátu a v případě podání léku, také času a době, po kterou se podání provádí. V některých případech bude dávka nižší nebo vyšší než shora zmíněná dávka. Konkrétní potřebná optimální dávka a typ podání SN-38 může být stanoven odbornou veřejností pomocí dostupných metod. Vhodná množství jsou terapeuticky účinná množství, která nezpůsobují nadbytečnou toxicitu podle empirických studií.

Výrazná výhoda přípravků obsahujících kardiolipin spočívá v tom, že poskytují způsob modulace multirezistence v rakovinových buňkách, které jsou podrobeny SN-38. Konkrétně redukuje přípravky podle předloženého vynálezu tendenci rakovinových buněk podrobených chemoterapii SN-38 ke vzniku rezistence vůči těmto přípravkům a snižují tendenci rakovinových buněk ke vzniku rezistence vůči dalším terapeutickým agens, např. taxol nebo doxorubicin. Tudíž jiná agens mohou být výhodně používána se současným léčením v kombinaci s SN-38.

Nyní, když byl popsán předložený vynález, následují konkrétní příklady, které jsou zde uvedeny pro ilustraci a nemají nikterak předložený vynález limitovat.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

SN-38 (3 μ moly) se rozpustí ve chloroformu obsahujícím 3 μ mol kardiolipinu. Do této směsi se přidá 14 μ molů fosfatidylcholinu rozpuštěného v hexanu a 10 μ molů cholesterolu v chloroformu. Směs se opatrně míchá a rozpouštědla se odpaří za vakua při teplotě nižší než 30°C za vzniku tenké suché vrstvy lipidu a léčiva. Lipozomy se pak vytvoří přidáním 2,5 ml fyziologického roztoku a intenzivním mícháním složek na vortexu. Baňky se pak vortexují kvůli vzniku multilamelárních lipozómů a případně sonikují v sonikátoru k získání unilamelárních lipozómů. Účinnost SN-38 enkapsulace se stanoví dialyzací alikvótního podílu předmětných lipozómů při 50 000 x g po dobu 1 hodiny. Poté se lipozómová frakce rozpustí v methanolu a analyzuje standardními způsoby pomocí HPLC, např. HPLC s reverzní fází. Obecně se bude účinnost enkapsulace SN-38 v lipozómech pohybovat v rozmezí od 80 do 95% iniciální vstupní dávky.

Příklad 2

Použijí se podobné experimentální podmínky s jinými množstvími léčiva a lipidu. Například se použije koncentrace 6 μ M SN-38, 6 μ M kardiolipinu, 28 μ M fosfatidylcholinu a 20 μ M cholesterolu. Složky se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, např. 5 ml 7% trehalosy-fyziologickém roztoku. Hydratace lipozómů může být usnadněna vortexováním a/nebo sonikací směsi. Lipozomy se podle potřeby dialyzují a stanoví se procentuální enkapsulace SN-38 v lipozómech podle výše uvedeného způsobu. Typicky bude SN-38 enkapsulace vyšší než asi 75% a obecněji od asi 85 do 95% nebo více než je stanoveno HPLC.

Příklad 3

SN-38 se enkapsuluje v lipozómech použitím 3 μ M léčiva, 15 μ M dipalmitoylfosfatidylcholinu, 1 μ M kardiolipinu a 9 μ M cholesterolu v objemu 2,5 ml. Směs léčiva a lipidu se odpařuje za vakua a resuspenduje v ekvivalentním

objemu fyziologického roztoku. Zbytek způsobu zpracování je stejný jako výše. V tomto systému bude účinnost enkapsulace SN-38 bude obecně vyšší než 75%.

Příklad 4

V tomto příkladu se připraví lipozómy obsahující 2 μM SN-38, 2 μM fosfatidylserinu, 11 μM fosfatidylcholinu, 2 μM kardiolipinu a 7 μM cholesterolu podle způsobu uvedeného v příkladu 1, kde účinnost enkapsulace SN-38 je vyšší než 75%.

Příklad 5

V tomto příkladě je uvedena příprava lipozómů obsahujících více než 1 mg/ml SN-38 v roztoku.

Lipidová vrstva se připraví přidáním asi 0,2 g D- α -tokoferolového kyselého sukcinátu do asi 1 kg *t*-butylalkoholu, který se ohřeje na asi 35-40°C. Roztok se míchá po dobu asi 5 minut, dokud se tokoferol nerozpustí. Do roztoku se přidá asi 6,0 g tetramyristoylkardiolipinu a roztok se míchá po dobu asi 5 minut. Do roztoku se přidá asi 10 g cholesterolu a roztok se míchá po dalších asi 5 minut, pak se přidá asi 30 g vaječného fosfatidylcholinu a míchá dalších 5 minut. Přibližně 11 gramů výsledného lipidového roztoku se lyofilizuje za vzniku lipidové vrstvy.

K vytvoření lipozomálního SN-38 se připraví 1,2 mg/ml roztok SN-38 rozpuštěním léčiva ve vodném alkalickém roztoku majícím pH od 8 do 10. Do baňky obsahující lipidovou vrstvu se přidá přibližně 15 ml tohoto roztoku SN-38. Baňka se opatrně míchá, nechá hydratovat při pokojové teplotě po dobu 30 minut, intenzivně vortexuje po dobu 2 minut a sonikuje po dobu 10 minut v komorovém sonikátoru při maximální intenzitě. Hodnota pH lipozomového roztoku se sníží na kyselé pH. Při použití tohoto způsobu se více než 90 hmotn.% SN-38 komplexuje s lipidem ve formě lipozómů.

29.05.03

Nyní, když byl předložený vynález popsán, budou odborné veřejnosti zřejmé různé změny a modifikace výše popsaných provedení bez vzdálení se od charakteru a rozsahu předloženého vynálezu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob léčení onemocnění způsobeného proliferací eukaryotických buněk u savčího hostitele, vyznačující se tím, že zahrnuje přípravu farmaceutického přípravku obsahujícího terapeuticky účinné množství komplexu obsahujícího SN-38 a lipid, kde více než 50 hmotn.% SN-38 je v komplexu s částí lipidu, a farmaceuticky přijatelný excipient; a podání přípravku savčímu hostiteli.
2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že SN-38 komplex je lipozóm.
3. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že lipid je alespoň jeden z lipidů vybraných ze skupiny lipidů sestávající z fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylserinu, fosfatidylglycerolu, fosfatidové kyseliny, fosfatidylinositolu, sfingomyelinu, sterolu, tokoferolu, mastné kyseliny, kardiolipinu a jejich směsí.
4. Způsob podle nároků 1 nebo 2, vyznačující se tím, že lipid obsahuje kardiolipin.
5. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že kardiolipin je vybrán ze skupiny sestávající z přirozeného kardiolipinu a syntetického kardiolipinu.
6. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že savčí hostitel je člověk.
7. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že SN-38 je podáváno dermálně.
8. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že SN-38 je podáváno přímo do nádoru.
9. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že SN-38 je podáváno intravenózně.

10. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že koncentrace SN-38 v přípravku je od asi 0,1 do asi 20 mg/ml.
11. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že asi 40 hmotn.% SN-38 nebo více je komplexováno s lipidem.
12. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že asi 70 hmotn.% SN-38 nebo více je komplexováno s lipidem.
13. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že asi 90 hmotn.% SN-38 nebo více je komplexováno s lipidem.
14. Způsob podle nároku 2, vyznačující se tím, že lipozómy mají průměr asi 1 mikron nebo menší.
15. Způsob podle nároku 2, vyznačující se tím, že lipozómy mají průměr asi 500 nm nebo menší.
16. Způsob podle nároku 2, vyznačující se tím, že lipozómy mají průměr asi 200 nm nebo menší.
17. Způsob podle nároku 2, vyznačující se tím, že lipozómy mají průměr asi 100 nm nebo menší.
18. Přípravek SN-38, vyznačující se tím, že zahrnuje SN-38 a lipid obsahující kardiolipin, kde podíl SN-38 je v komplexu s částí lipidu.
19. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že lipid dále zahrnuje fosfatidylcholin, sterol a tokoferol.
20. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že lipid dále zahrnuje fosfatidylcholin vybraný ze skupiny sestávající se z dimyristoylfosfatidylcholinu, distearoylfosfatidylcholinu, dioleoylfosfatidylcholinu, dipalmitoylfosfatidyl-

cholinu, diarachidonoylfosfatidylcholinu, vaječného fosfatidylcholinu, sojového fosfatidylcholinu, hydrogenovaného sojového fosfatidylcholinu a jejich směsí.

21. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že lipid dále zahrnuje fosfatidylglycerol vybraný ze skupiny sestávající se z dimyristoyl-fosfatidylglycerolu, dioleoyl-fosfatidylglycerolu, distearoyl-fosfatidylglycerolu, dipalmitoyl-fosfatidylglycerolu, diarachidonoyl-fosfatidylglycerolu a jejich směsí.

22. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že lipid dále zahrnuje sterol vybraný ze skupiny sestávající se z cholesterolu, polyethylenglykolových derivátů cholesterolu, koprostanolu, cholestanolu, cholestanu, cholesterol-hemisukcinátu, cholesterol-sulfátu a jejich směsí.

23. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že komplex má průměr asi 1 mikron nebo menší.

24. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že komplex má průměr asi 500 nm nebo menší.

25. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že komplex má průměr asi 200 nm nebo menší.

26. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že komplex má průměr asi 100 nm nebo menší.

27. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že přípravek dále zahrnuje farmaceuticky přijatelný excipient.

28. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že kardiolipin je vybrán ze skupiny sestávající z přirozeného kardiolipinu a syntetického kardiolipinu.

29. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že komplex zahrnuje lipozóm.

30. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že komplex dále zahrnuje cílové agens.
31. Přípravek podle nároku 30, vyznačující se tím, že cílové agens je protein.
32. Přípravek podle nároku 31, vyznačující se tím, že protein je vybrán ze skupiny proteinů sestávajících z protilátek, fragmentů protilátek, peptidů, peptidových hormonů, ligandů receptoru a jejich směsí.
33. Přípravek podle nároku 30, vyznačující se tím, že cílové agens je sacharid.
34. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že koncentrace SN-38 je od asi 0,01 do asi 5 mg/ml.
35. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že koncentrace SN-38 je od asi 0,1 do asi 4 mg/ml.
36. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že koncentrace SN-38 je od asi 0,5 do asi 3 mg/ml.
37. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že koncentrace SN-38 je od asi 0,8 do asi 2 mg/ml.
38. Přípravek podle nároku 18, vyznačující se tím, že koncentrace SN-38 je od asi 1 do asi 1,5 mg/ml.
39. Způsob léčení savčího onemocnění, vyznačující se tím, že zahrnuje přípravu přípravku podle nároku 18 a podání, při potřebě takového ošetření, terapeuticky účinného množství přípravku subjektu.
40. Způsob podle nároku 39, vyznačující se tím, že onemocnění je rakovina.

41. Způsob léčení podle nároku 40, vyznačující se tím, že rakovina je lymfom, rakovina vaječníků, prsou, plic nebo střeva.
42. Přípravek SN-38, vyznačující se tím, že zahrnuje SN-38 a lipid, kde asi 50 hmotn.% SN-38 nebo více je v komplexu s částí lipidu.
43. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že asi 70 hmotn.% SN-38 nebo více je v komplexu s částí lipidu.
44. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že asi 80 hmotn.% SN-38 nebo více je v komplexu s částí lipidu.
45. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že asi 90 hmotn.% SN-38 nebo více je v komplexu s částí lipidu.
46. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že SN-38 komplex je lipozóm.
47. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že lipid dále zahrnuje fosfatidylcholin, sterol a tokoferol.
48. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že lipid dále zahrnuje fosfatidylcholin vybraný ze skupiny sestávající se z dimyristoylfosfatidylcholinu, distearoylfosfatidylcholinu, dioleoylfosfatidylcholinu, dipalmitoylfosfatidylcholinu, diarachidonoylfosfatidylcholinu, vaječného fosfatidylcholinu, sojového fosfatidylcholinu, hydrogenovaného sojového fosfatidylcholinu a jejich směsí.
49. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že lipid dále zahrnuje sterol vybraný ze skupiny sestávající se z cholesterolu, polyethylenglykolových derivátů cholesterolu, koprostanolu, cholestanolu, cholestanu, cholesterol-hemisukcinátu, cholesterol-sulfátu a jejich směsí.

50. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že komplex má průměr asi 1 mikron nebo menší.
51. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že komplex má průměr asi 500 nm nebo menší.
52. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že komplex má průměr asi 200 nm nebo menší.
53. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že komplex má průměr asi 100 nm nebo menší.
54. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že přípravek dále zahrnuje farmaceuticky přijatelný excipient.
55. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že komplex dále zahrnuje cílové agens.
56. Přípravek podle nároku 55, vyznačující se tím, že cílové agens je protein.
57. Přípravek podle nároku 56, vyznačující se tím, že protein je vybrán ze skupiny proteinů sestávajících z protilátek, fragmentů protilátek, peptidů, peptidových hormonů, ligandů receptoru a jejich směsí.
58. Přípravek podle nároku 55, vyznačující se tím, že cílové agens je sacharid.
59. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že koncentrace SN-38 je od asi 0,01 do asi 5 mg/ml.
60. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že koncentrace SN-38 je od asi 0,1 do asi 4 mg/ml.

61. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že koncentrace SN-38 je od asi 0,5 do asi 3 mg/ml.
62. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že koncentrace SN-38 je od asi 0,8 do asi 2 mg/ml.
63. Přípravek podle nároku 42, vyznačující se tím, že koncentrace SN-38 je od asi 1 do asi 1,5 mg/ml.
64. Způsob léčení savčího onemocnění, vyznačující se tím, že zahrnuje přípravu přípravku podle nároku 42 a podání, při potřebě takového ošetření, terapeuticky účinného množství přípravku subjektu.
65. Způsob podle nároku 64, vyznačující se tím, že onemocnění je rakovina.
66. Způsob léčení podle nároku 65, vyznačující se tím, že rakovina je lymfom, rakovina vaječníků, prsou, plic nebo střeva.