



HU000230338B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **230 338**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 00 03972**(22) A bejelentés napja: **1998. 06. 26.**(51) Int. Cl.: **A61K 9/22** (2006.01)**A61K 47/42** (2006.01)(40) A közzététel napja: **2001. 08. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértékesítőben: **2016. 02. 29.**

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 98/13272

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 9900113

(30) Elsőbbségi adatok:

60/051,021	1997. 06. 27.	US
08/926,155	1997. 09. 09.	US

(73) Jogosult(ak):

Abraxis BioScience LLC, Los Angeles (US)

(72) Feltaláló(k):

Desai, Neil P., Los Angeles, Kalifornia (US)
Soon-Shiong, Patrick, Los Angeles, Kalifornia (US)
Magdassi, Shlomo, Jeruzsálem (IL)
Sahadevan, David C., Whittier, Kalifornia (US)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.,
Budapest

(54) **Gyógyászati hatóanyagokat tartalmazó új készítmények, eljárás ilyen készítmények előállítására és alkalmazására**

(57) Kivonat

A találmány paklitaxelt tartalmazó készítményre vonatkozik, amely fehérje bevonattal ellátott paklitaxelt tartalmazó nanorészecskéket tartalmaz, amely nanorészecskék átlagos átmérője nem nagyobb, mint körülbelül 200 nanométer, ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben legalább 2,0 mg/ml és ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben nem 2,0 mg/ml.

A találmány szerinti készítmény különböző rákos megbetegedések, valamint resztenózis kezelésre alkalmas.

Gyógyászati hatóanyagokat tartalmazó új készítmények, eljárás ilyen készítmények előállítására és alkalmazására

A TALÁLMÁNY SZAKTERÜLETE

A jelen találmány gyógyászatiilag hatásos szerek intravénás adagolására használható szemcsés vivőanyagok előállítására alkalmas eljárásra, valamint ilyen módon előállított új készítményekre vonatkozik. A találmány egy speciális tárgyát lényegében vízben oldhatatlan gyógyászati hatóanyagok (például a rákellenes paklitaxel) *in vivo* leadására alkalmas eljárások képezik. Egy másik vonatkozásban diszpergálható kolloid rendszereket bocsátunk rendelkezésre, amelyek vízben oldhatatlan gyógyászatiilag hatásos szereket tartalmaznak. A szuszpendált részecskék 100% hatóanyagból készülhetnek vagy egy biokompatibilis polimerből készült polimer burokba foglalhatók, és általában átmérőjük körülbelül 1 mikronnál kisebb. A találmány szerinti kolloid rendszereket hagyományos felületaktív anyag vagy bármilyen polimer magmátrix alkalmazása nélkül állíthatjuk elő. A találmány egyik jelenleg előnyös megvalósítási módjának megfelelően eljárást bocsátunk rendelkezésre rendkívül kis részecskék előállítására, amelyek sterilre szűrhetők. A polimer burok a gyógyászatiilag hatásos szer részecskéit tartalmazza, és kívánt esetben egy biokompatibilis diszpergáló szert is magában foglal, amelyben a gyógyászatiilag hatásos szer oldható vagy szuszpendálható. Ily módon a találmány egy hatóanyagleadó rendszert bocsát rendelkezésre folyadék vagy újradiszpergálható por alakjában. Mindkét forma biológiailag azonnal felhasználható hatóanyag molekulákat (azaz olyan hatóanyag molekulákat, amelyek molekulárisan egy fehérjéhez kötődnek) és tisztá hatóanyagrészecskéket tartalmaz, amelyek egy fehérjével vannak bevonva.

A találmány tárgyát képezi hatóanyagokat, így a rákellenes szer paklitaxelt tartalmazó készítmények (formulák) alkalmazási és előállítási eljárása is. Az egyik vonatkozásban a paklitaxel készítmény, amely CapxolTM néven ismert, szignifikánsan kevésbé toxikus és hatékonyabb, mint a Taxol®, amely egy kereskedelemben kapható paklitaxel készítmény. Egy másik vonatkozásban az új CapxolTM készítmény bizonyos szövetekben lokalizálódik parenterális adagolást követően, ezáltal növeli az ilyen szövetekkel kapcsolatos rák kezelésének hatékonyságát.

A TALÁLMÁNY SZAKIRODALMI HÁTTERE

Az intravénás adagolás hatására a hatóanyag gyorsan és közvetlenül egyensúlyba kerül a vérárammal, amely a gyógyszert a test többi részébe szállítja. Az intravaszkuláris injekció után röviddel kialakuló csúcs szérumszintek elkerülése céljából a hatóanyag stabil hordozókban történő adagolása lehetővé tenné a hatóanyag intravaszkuláris szakaszban való fokozatos felszabadulását a terápiás nanorészecskéket tartalmazó bőlus intravénás injekciója után.

Injektálható szabályozott hatóanyagleadású nanorészecskék egy előre programozott hatásidőtartamot biztosíthatnak, amely napoktól hetekig-hónapokig tarthat egyetlen injekció formájában beadva. Ezek több jelentős előnyt is szolgáltathatnak a hagyományosan adagolt gyógyszerekkel szemben, például a beteg automatikusan biztosított együttműködését az adagolási renddel, valamint a hatóanyagnak a specifikus szövetekhez vagy szervekhez történő célbajuttatását [Tice and Gilley, *Journal of Controlled Release*, 2, 343-352 (1985)].

A vérben jelenlevő mikrorészecskék és idegen testek általában a keringésből a "vérszűrő szervek", neve-

zetesen a lép, tüdők és a máj révén ürülnek ki. A normális teljes vérben levő alakos anyagok a vörös vérszettek (átmérőjük jellemzően 8 mikron), a fehér vérszettek (átmérőjük jellemzően 6-8 mikron) és a vérlemezkék (átmérőjük jellemzően 1-3 mikron). A mikrokeringés a legtöbb szervben és szövetben lehetővé teszi ezen vérszettek szabad átjárását. Amikor 10-15 mikronnál nagyobb mikrotrombusok (vérrögök) vannak jelen a keringésben, infarktus vagy a kapillárisok elzáródásának veszélye alakul ki, ami isémiához vagy oxigénhiányhoz és esetleges szövetelhaláshoz vezet. A 10-15 mikronnál nagyobb átmérőjű részecskéknél a keringésbe való injektálását ezért el kell kerülni. A 7-8 mikronnál kisebb részecskék szuszpenziója azonban aránylag biztonságos, és már alkalmaztak ilyeneket gyógyászati hatások szereknek liposzómák vagy emulziók formájában, tápszereknek és léképezéses alkalmazáshoz kontrasztanyagoknak a bevitelére.

A részecskék mérete és beadásuk módja meghatározza biológiai viselkedésüket. Strand és munkatársai a "*Microspheres-Biomedical Applications*" című könyvben [szerk. A. Rembaum, pp 193-227, CRC Press (1988)] leírták, hogy a részecskék sorsa a méretüktől függ. A néhány nanométer (nm) és 100 nm közötti méretű részecskék az intersticiális injekció után bekerülnek a nyirok kapillárisokba és a nyirokmirigyeken belül fagocitózis következhet be. Intravénás/intraarteriális injekciót követően a körülbelül 2 mikronnál kisebb részecskék gyorsan ki-kerülnek a véráramból a retikuloendoteliális rendszer (RES) révén, amelyet mononukleáris fagocita rendszerként is ismernek (MPS). A körülbelül 7 mikronnál nagyobb részecskéket intravénás injektálást követően a tüdőkapillárisok fogják be. Intraarteriális injektálást követően a részecskék az először elért kapilláris ágyban maradnak. Az inhalált részecskéket az alveoláris makrofágok tartják vissza.

Az olyan gyógyszerek, amelyek vízben oldhatatlanok vagy rosszul oldódnak, és a gyomorban levő savas környezetre érzékenyek, nem adagolhatók a hagyományos módon (például intravénás injekció alakjában vagy orálisan). Az ilyen gyógyszerek parenterális adagolását úgy oldották meg, hogy az olajban szolubilizált hatóanyagot egy vizes fázissal (például normál sóoldattal) felületaktív anyagok vagy emulzióstabilizátorok jelenlétében emulgeálták stabil mikroemulziók képződése közben. Ezek az emulziók intravénásan injektálhatók, feltéve, hogy az emulzió komponensei farmakológiailag közömbösek. A 4 073 943 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban vízben oldhatatlan gyógyászati hatóanyagok adagolását ismertetik, amelyeket olajban oldottak és vízzel felületaktív anyagok, például tojás foszfatidok, pluronic-ok (polipropilénglikol és polietilénglikol kopolimerek), poliglicerin-oleát és hasonlóak jelenlétében emulgeáltak. A WO85/00011 számú nemzetközi közzétételi iratban egy érzéstelenítő szer gyógyászati mikrocspepecskéit írják le, amelyek foszfolipiddel, így dimirisztoil-foszfatidil-kolinnal vannak bevonva, és méretük az intradermális vagy intravénás injektálásra alkalmas.

A vízben oldhatatlan hatóanyagra példaként a paklitaxel említjük, amely természetes termék, és először a *Taxus brevifolia*-ból különítették el Wani és munkatársai [*J. Am. Chem. Soc.*, 93, 2325 (1971)]. A mitózisgátló szerek között a paklitaxel, amely diterpén szénvázat tartalmaz, egyedülálló hatást fejt ki a mikrotubulus fehérjékre, amelyek a mitózis orsó képződéséért felelősek. Más mitózisellenes szerekkel, például a vinblasztinnal vagy kolhicinnel szemben, amelyek megakadályozzák a tubulin összeállását, a paklitaxel az egyetlen olyan növényi termék, amelyről tudjuk, hogy gátolja a tubulin depolimerizációs folyamatát, így megakadályozza a sejtreplikáció folyamatát.

A paklitaxelről, amely egy természetben előforduló diterpenoid, kimutatták, hogy szignifikáns daganatel-

lenes és rákellenes hatást fejt ki a gyógyszerek ellenálló petefészekrákban. A paklitaxel kiváló daganatellenes hatást mutatott tumor modellek széles körében, így a B16 melanóma, az L1210 leukémiák, az MX-1 emlőtumorsejt és a CS-1 vastagbél-tumor xenograftok esetében. Néhány újabb megjelent közleményben a paklitaxelt az új rákellenes csodagyógyszernek nevezik. Valóban, a paklitaxelt nemrégiben a Federal Drug Administration engedélyezte petefészekrák kezelésére. A paklitaxel vízben való rossz oldódása azonban problémát jelent a humán adagolás szempontjából. Tény, hogy az olyan hatóanyagok beadását, amelyek maguk oldhatatlanok vagy rosszul oldódnak vizes közegben, hátrányosan befolyásolja, ha az orális adagolás nem hatékony. Ennek megfelelően a jelenleg alkalmazott paklitaxel készítmények (azaz a Taxol®) egy cremophort igényelnek a hatóanyag szolubilizálásához. A humán klinikai dózis 200-500 mg. Ezt a dózist etanol:cremophor = 1:1 arányú elegyben oldják, és az oldatot körülbelül 300-1000 ml sóoldattal hígítják, amely folyadékot intravénásan adagolnak. A jelenleg alkalmazott cremophor polietoxilezett ricinusolaj. Az ebben a készítményben jelenlevő cremophor súlyos túlérzékenységi reakciókkal hozták összefüggésbe állatokban [Lorenz és munkatársai, *Agents Actions* 7, 63-67 (1987)] és emberekben [Weiss és munkatársai, *J. Clin. Oncol.* 8, 1263-68 (1990)], és ennek következtében a beteg kortikoszteroidokkal (dexametazon) és antihisztaminokkal történő előzetes gyógyszeres kezelését teszi szükségessé. A nagy hígítás nagy infúziós térfogatokat eredményez (a jellemző dózis 175 mg/m²), amely elérheti az 1 litert, és az infúzió ideje 3 és 24 óra között változik. Ily módon szükség van egy alternatív, kevésbé toxikus paklitaxel készítményre.

A klinikai kipróbálás I fázisában a paklitaxel maga nem mutatott túlzottan toxikus hatásokat, de súlyos allergiás reakciókat okoztak az emulgeálószer, amelyeket a hatóanyag szolubilizálásához használtak. Az adagolás jelenlegi rendje szerint a beteget a hatóanyag injektálása előtt antihisztaminokkal és szteroidokkal kell kezelni a cremophor allergiás mellékhatásainak csökkentésére.

Langer és munkatársai [Seminars in Oncology, 22/4, 9. kieg., 18-29 (1995); *Seminars in Oncology*, 23/6, 16. kieg., 35-41 (1996)], valamint Paccagnella és munkatársai [Seminars in Oncology, 23/6, 16. kieg., 76-79 (1996)] paklitaxel és karboplatin kombinált kezelését ismertetik előrehaladott nem kisesejtű tüdőrák kezelésében. A paklitaxelt Taxol formában használják.

Az EP-A-526666 számú európai szabadalmi leírásban 1 mikronnál kisebb átmérőjű szilárd lipid mikrogömböket ismertetnek. Az így előállított lipid mikrogömbök méretbeli eloszlása keskeny. A WO93/25195 számú nemzetközi közzétételi iratban módosított ciklodextrin nanogömbök koloid oldatát tartalmazó nanorészecske-rendszert ismertetnek, amely gyógyszerek, kozmetikumok vagy vegyszerek hordozójaként használható.

A WO98/14174 számú nemzetközi közzétételi iratban (közzétéve 1998. április 9-én, a jelen bejelentés előbbis napja után), lényegében vízoldhatatlan gyógyászati hatóanyagok, például a rák ellenes paklitaxel hatóanyag *in vivo* bejuttatására alkalmas készítményeket ismertetnek. Olyan nanorészecske készítményeket írnak le, amelyek fehérjével, például albuminnal bevont vízoldhatatlan hatóanyag nanorészecskéket tartalmaznak.

A paklitaxel vízoldékonyságának javítására tett erőfeszítésekben több kutató a vegyület kémiai szerkezetét funkcionális csoportokkal módosította, amely csoportok fokozták a vegyület vízoldhatóságát. Ezek között vannak szulfonált származékok [Kingston és munkatársai, 5 059 699 számú (1991) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás] és aminosav-észterek [Methew és munkatársai, *J. Med. Chem.*, 35, 145-151 (1992)], amelyek

szignifikáns biológiai hatást mutatnak. A vízdoldható származékok előállítására szolgáló módosítások elősegítik egy ártalmatlan hordozóban, így normál sóoldatban oldott paklitaxel intravénás adagolását. Az ilyen módosítások azonban a hatóanyag előállítási költségeit növelik, nemkívánt mellékreakciókat és/vagy allergiás reakciókat indukálhatnak és/vagy csökkenthetik a gyógyszer hatékonyságát.

Fehérje mikrogömbökről, mint farmakológiai vagy diagnosztikai szerek hordozóiról számoltak be az irodalomban. Albumin mikrogömböket állítottak elő hővel végzett denaturálással vagy kémiai térhálósítással. A hővel denaturált mikrogömböket egy emulgeált elegyből (például albuminból, a befoglalandó szerből és egy megfelelő olajból) 100°C és 150°C közötti hőmérsékleten alakítják ki. A mikrogömböket ezután alkalmas oldószerrel mossák és tárolják. Leucuta és munkatársai az *International Journal of Pharmaceutics*, 41, 213-217 (1988) irodalmi helyen leírják a hővel denaturált mikrogömbök előállítására alkalmas eljárást.

A kémiailag térhálósított mikrogömbök előállítási eljárása során az emulziót glutaraldehiddel reagáltatják a fehérje térhálósítására, majd a terméket mossák és tárolják. Lee és munkatársai a *Science*, 213, 233-235 (1981) irodalmi helyen írják le és a 4 671 954 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik ezt az előállítási eljárást.

A fehérje mikrogömböknek, mint gyógyászati hatóanyagok hordozóinak a fenti előállítási eljárásai, noha a vízdoldható szerek esetében megfelelőek, nem alkalmasak a vízben oldhatatlan szerek befogására. Ez a korlátozás az előállítási módszerből magából következik, amely a fehérje komponensnek a víz-az-olajban emulzió vizes fázisában történő térhálósításán vagy hővel történő denaturálásán alapul. Bármilyen vízdoldható szer, amely a fehérjetartalmú vizes fázisban van oldva, befogható a képződött térháló vagy hővel denaturált fehérje mátrixba, de a vízben rosszul oldódó vagy olajban oldódó szer nem építhető be az ilyen technikákkal készített fehérje mátrixba.

Egy hagyományos, hatóanyagot tartalmazó nanorészecskék előállítására alkalmas eljárás szerint politejsavat (vagy más biokompatibilis, vízben nem oldódó polimert) egy vízzel nem elegyedő oldószerben (például metilén-dikloridban vagy más klórozott, alifás vagy aromás oldószerben) oldanak, a gyógyászati hatóanyagot a polimer-oldatban oldják, az olajfázishoz vagy a vizes fázishoz felületaktív anyagot adnak, megfelelő módon olaj-a-vízben emulziót képeznek, és az emulziót vákuumban lassan bepárolják. Ha az olajcseppecskék megfelelően kicsik és stabilak a bepárlás alatt, a polimer vizes szuszpenzióját kapják. Mivel a hatóanyag eredetileg a polimer-oldatban volt jelen, ezzel a módszerrel olyan készítményt lehet előállítani, amelyben a hatóanyag-molekulák a polimer mátrixból álló részecskébe vannak foglalva. A mikrogömbök és nanorészecskék oldószerelpárolgatással történő előállításáról már több kutató beszámolt [ld. például Tice and Gilley, *Journal of Controlled Release*, 2, 343-352 (1985); Bodmeier and McGinity, *Int. J. Pharmaceutics*, 43, 179 (1988); Cavalier és munkatársai, *J. Pharm. Pharmacol.*, 38, 249 (1985); és D'Souza és munkatársai, WO 94/10980 számú nemzetközi közzétételi irat], akik különféle hatóanyagokat alkalmaztak.

Bazile és munkatársai a *Biomaterials*, 13, 1093 (1992) irodalmi helyen és Spenlehauer és munkatársai a 2 660 556 számú francia szabadalmi leírásban két biokompatibilis polimer alkalmazásával történő nanorészecske-előállítást ismertetnek, ezek egyikét (például a polilaktidot) a szerves fázisban oldják a hatóanyag komponenssel, így a gyógyhatású anyaggal együtt, és a másik polimert, például az albumint felületaktív szerként használják. Az emulgeálás és az oldószer eltávolítása után nanorészecskék képződnek, amelyekben a hatóanyag

a polilaktid részecskék alkotta polimer mátrix belsejében van jelen.

A polimer mátrix előállításához használt polimer-oldat tulajdonságai nagyon fontosak ahhoz, hogy az első szakaszban tökéletes emulziót kapjunk. Például a polilaktid (az injektálható nanorészecskék előállítására általánosan használt polimer) olyan felületi aktivitással rendelkezik, amely lehetővé teszi, hogy a metilén-diklorid/víz fázishatáron gyorsan adszorbeálódjon, ezáltal csökkenti a határfelületi feszültséget [ld. például Boury és munkatársai, *Langmuir*, 11, 1636 (1995)], ami viszont javítja az emulgeálás folyamatát. Emellett ugyanezek a kutatók azt találták, hogy a marha szérum albumin (BSA) kölcsönhatásba lép a polilaktiddal, és az olaj-víz fázishatáron jelenlevő polilaktid monorétegbe hatol. Ezért azt várnánk, hogy a fenti hivatkozások alapján, a hagyományos oldószer-elpárologtatási eljárás alatti emulgeálódást nagymértékben elősegíti a felületaktív polimer (polilaktid) nemvízes szerves fázisban való jelenléte. Valóban, a polilaktid jelenléte nemcsak egy kielégítő feltétel, hanem valójában szükséges a megfelelő méretű nanorészecskék képződéséhez.

Egy másik eljárás, amely az oldószer-elpárologtatási módszeren alapul, abban áll, hogy a hatóanyagot hidrofób oldószerben (például toluolban vagy ciklohexánban) oldják anélkül, hogy bármilyen polimert is oldanának a szerves oldószerben, emulgeálószerként hagyományos felületaktív anyagot adnak az elegyhez, nagynyírású készülékben végzett szonikálással olaj-a-vízben emulziót állítanak elő, majd az oldószert lepárolják, így a hatóanyag száraz részecskéit kapják [ld. például Sjöstrom és munkatársai, *J. Dispersion Science and Technology*, 15, 89-117 (1994)]. A nem poláris oldószer eltávolítása után a hatóanyag az oldószer cseppecskék belsejében kicsapódik, és így szubmikron részecskéket kapnak.

Azt találták, hogy a részecskék méretét főképpen az emulzóban levő cseppecskék kezdeti mérete szabályozza. Emellett érdekes megjegyezni, hogy a végső részecskeméret csökkenthető a szerves fázisban levő hatóanyag koncentrációjának csökkentésével. Ez a felismerés ellentétben áll az itt ismertetett eredményekkel, ahol nem hagyományos felületaktív anyagot használnak a nanorészecskék előállítására (a találmány ugyanezen megvalósítási módjaiban). Emellett a Sjöstrom közlemény szerzői megjegyzik, hogy az alkalmazott gyógyászati hatóanyag, a koleszteril-acetát toluolban felületaktív, és ezért orientálódhat az olaj-víz határfelületen; ennek következtében a hatóanyag koncentrációja a határfelületen nagyobb, így növeli a potenciált a kicsapódáshoz.

Szubmikron részecskéket előállítottak már kicsapási eljárással is, amint azt Calvo és munkatársai a *J. Pharm. Sci.*, 85, 530 (1996) irodalmi helyen leírják. Az eljárás azon alapul, hogy a hatóanyagot (például az indometacint) és a polimert (a polikaprolaktont) metilén-dikloridban és acetonban oldják, és azután az oldatot egy felületaktív anyagot (Poloxamer 188-at) tartalmazó vízes fázisba öntik, így 216 nm-es szubmikron méretű részecskék képződnek. Azonban az eljárást olyan oldószer-koncentrációknál végzik, ahol nincs emulzióképződés.

A paklitaxel egy természetben előforduló vegyület, amely nagyon ígéretes rákellenes hatóanyag. Például McGuire és munkatársai azt találták, hogy a paklitaxel hatásos a gyógyszernek ellenálló petefészekrák esetében [Ld. "Taxol: A Unique Anti-Neoplastic Agent With Significant Activity Against Advanced Ovarian Epithelial Neoplasms." *Ann. Int. Med.*, 111, 273-279 (1989)]. Minden beteg, tudományos cikk és más közlemény, amit itt említünk, utalás formájában a leírás részét képezi, mintha teljes egészében reprodukálnuk volna.

Sajnos a paklitaxel rendkívül kevésbé oldódik vízben, ami nehezíti teszi egy alkalmas dózisforma előállítását. Valójában a klinikai kipróbálás I fázisában súlyos allergiás reakciókat okoztak a paklitaxellel együtt ada-

golt emulgeálószeres, amelyeket a paklitaxel kis vízoldhatóságának kompenzálására használtak; legalább egy beteg meghalt az emulgeálószeres okozta allergiás reakciók következtében. A dózist korlátozó toxikus hatás többek között a neutropénia, a perifériás neuropátia és a túlérzékenységi reakciók.

Brown és munkatársai ["A Phase I Trial of Taxol Given by A 6-Hour Intravenous Infusion", *J. Clin. Oncol.*, 9(7), 1261-67 (1991 július)] egy I fázisú kipróbálásról számolnak be, ahol a Taxolt 6 órás intravénás infúzió formájában adagolták minden 21. napon előgyógyszerezés nélkül. 31 beteg kapott 64 előírható Taxol-kúrát. Egy betegnél súlyos (vagy akut) túlérzékenységi reakció jelentkezett, amelynek következtében az infúziót meg kellett szakítani, és a beteget azonnal kezelésbe kellett venni életének megmentése érdekében. Egy másik betegnél szintén túlérzékenységi reakciót váltott ki, azonban az nem volt olyan súlyos, hogy az infúziót abba kellett volna hagyni. A mielo-szuppresszió dózis-korlátozó volt, szepszis miatt bekövetkező két halálesettel. A nem-hematológiai toxicitás 1-es és 2-es fokozatú volt, kivéve egy beteget, akinél 3-as fokozatú nyálkahártyagyulladás és két betegnél 3-as fokozatú neuropátia jelentkezett. A neuropátia reverzibilis fájdalmas paresztéziából állt, emiatt a Taxol adagolását két betegnél abba kellett hagyni. Négy részleges válasz volt megfigyelhető (3 nem-kissejtes tüdőrákos betegben és 1 ismeretlen eredetű adenokarcinómás betegben). A maximális tolerált dózis 275 mg/m^2 , és az ajánlott II fázist kezdő dózis 225 mg/m^2 volt. A túlérzékenységi reakció fellépéséről azt írták, hogy az adagolási rendtől függ, a 6-24 órás hatóanyaginfúzióknál a túlérzékenységi reakciók előfordulása 0-8% volt. Arról is beszámoltak, hogy a túlérzékenységi reakciók a hosszabb infúziós idők ellenére megmaradnak előzetes gyógyszeres kezelés mellett vagy nélkül is. Mivel ezeket az I fázisú vizsgálatokat különféle ráktól szenvedő, utolsó stádiumban levő betegekkel végezték, a Taxol kezeléseket hatékonyságát nem tudták meghatározni.

Kris és munkatársai egy kísérlet során Cremophor EL-lel, dehidratált alkoholban készült paklitaxelt alkalmaztak 3 órás intravénás infúzió formájában minden 21 napban, az adagolt dózis kilenc eszkalációs lépésben 15-ről 230 mg/m^2 -ig változott. Kris és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a túlérzékenységi reakciók súlyossága és megjósolhatatlansága miatt a Taxol® további alkalmazása ilyen hatóanyagkészítmény formájában, ilyen adagolási rendben nem ajánlott." [*Cancer Treat. Rep.*, 70(5) (1986. május)].

Mivel korábbi kipróbálások, amihez bólszusz injekciót vagy rövid (1-3 órás) infúziót alkalmaztak, anafilaxiás reakciókat vagy más túlérzékenységi válaszokat váltottak ki, a további vizsgálatokat úgy végezték, hogy a Taxolt csak szteroiddal (például dexametazonnal), antihisztaminokkal (például difenhidraminnal) és H_2 -antagonistákkal (például cimetidinnel vagy ranitidinnel) végzett előzetes kezelés után adagolták, és az infúzió idejét 24 órára hosszabbították a legsúlyosabb allergiás reakciók eliminálása érdekében. Különböző I fázisú és II fázisú vizsgálatok eredményeit közölték, amely vizsgálatokhoz 24 órás Taxol infúziót használtak 250 mg/m^2 -es maximális összes dózissal, és a kezelést általában minden 3 hétben megismételték. A betegeket dexametazonnal, difenhidraminnal és cimetidinnel előkezelték az allergiás reakciók elkerülésére. [Ld. Einzig és munkatársai, "Phase II Trial of Taxol in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma", *Cancer Investigation*, 9(2) 133-136 (1991) és A.B. Miller és munkatársai, "Reporting Results of Cancer Treatment", *Cancer*, 47, 207-214 (1981)].

Koeller és munkatársai a "Hosszan tartó infúzióval előzetes gyógyszeres kezelés nélkül adagolt Taxol I fázisú farmakokinetikai vizsgálata" című cikkben [*Proceedings of ASCO*, Vol. 8 (1989. március)] rutin gyógy-

szeres kezelést ajánlanak a feltehetően a paklitaxel infúzióhoz használt cremophor (polietoxilezett ricinusolaj) vívőanyag által okozott jelentős számú allergiás reakció elkerülésére. A betegek 175 mg/m^2 és 275 mg/m^2 közötti nagyságú dózisokat kaptak.

Wiernik és munkatársai a "Taxol I fázisú klinikai és farmakokinetikai vizsgálata" című cikkben [*Cancer Research*, 47, 2486-2493 (1987. május 1.)] szintén egy cremophor vívőanyagban intravénás infúzióval 6 órán át történő paklitaxel adagolásról számolnak be egy I fázisú vizsgálatban. A 13-ból 4 esetben váltott ki 3-4 fokozatú túlérzékenységi reakciót. A vizsgálat induló dózisa 15 mg/m^2 (a kutyákban meghatározott legkisebb toxikus dózis egyharmada) volt. A dózisokat növelték, és legalább 3 beteget kezeltek mindegyik nagyságú dózissal, amíg a toxicitást megállapították, és aztán mindegyik következő dózissal 4-6 beteget kezeltek. A vizsgálat megállapította, hogy a neurotoxicitás és leukopénia dóziskorlátozó, és a II fázisú kipróbáláshoz 250 mg/m^2 dózist ajánlottak előzetes gyógyszeres kezelés mellett.

További példák a paklitaxellel végzett vizsgálatokra a következők: Legha és munkatársai, "Phase II Trial of Taxol in Metastatic Melanoma", 65, 2478-81 (1990 június); Rowinsky és munkatársai, "Phase I and Pharmacodynamic Study of Taxol in Refractory Acute Leukemias", *Cancer Research*, 49, 4640-4647 (1989. augusztus 15.); Grem és munkatársai, "Phase I Study of Taxol Administered as a Short IV Infusion Daily For 5 Days", *Cancer Treatment Reports*, 71(12) (1987 december); Donehower és munkatársai, "Phase I Trial of Taxol in Patients With Advanced Cancer", *Cancer Treatment Reports*, 71(12) (1987 december); Holmes és munkatársai, "Phase II Study of Taxol in Patients (PT) with Metastatic Breast Cancer (MBC)" *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 10(60) (1991 március). Ld. még Suffness, "Development of Antitumor Natural Products at the National Cancer Institute", *Gann Monograph of Cancer Research*, 31, 21-44 (1989) (amely azt ajánlja, hogy a Taxol®-t csak 24 órás infúzió formájában adagolják).

Weiss és munkatársai a "Taxol által okozott túlérzékenységi reakciók" című cikkben [*Journal of Clinical Oncology*, 8(7), 1263-1268 (1990 július)] azt írják, hogy nehéz volt meghatározni a túlérzékenységi reakciók (HSR) megbízható összes előfordulását a paklitaxel dózisok és az alkalmazott adagolási rendek variációjának széles köre miatt, és amiatt, hogy nem ismert, milyen mértékben hat az infúziós rend változtatása és az előgyógyszerezés a HSR fellépésére. Például öt beteg közül, akik 3 órás infúzió formájában 190 mg/m^2 -nél nagyobb mennyiségben kaptak Taxolt előgyógyszerezés nélkül, háromnak voltak túlérzékenységi reakciói, míg abból a 30 betegből, akik még nagyobb dózisokat kaptak 6 órás infúzió formájában előgyógyszerezés nélkül, csupán egynél lépett fel ilyen reakció. Ezért ez azt feltételezi, hogy az infúzió 6 óránál hosszabb időtartamra való meghosszabbítása elegendő a HSR fellépésének csökkentésére. Weiss és munkatársai mégis azt találták, hogy a 24 órás infúzió formájában 250 mg/m^2 Taxolt kapott betegeknél is határozott túlérzékenységi reakciók jelentkeztek. Ily módon, noha a hatóanyag infúziójának 6 órára vagy 24 órára történő hosszabbítása csökkentheti egy akut reakció fellépését, ez a következtetés nem bizonyítható, mivel a túlérzékenységi reakciók 78%-a a Taxol infúzió megkezdését követően 10 percen belül jelentkezett, ami arra utal, hogy a teljes infúzió tervezett hossza erre nem lenne hatással. Emellett az infúzióban a paklitaxel koncentrációja szintén nem okozhat különbséget, mivel jelentős számú betegnél különböző kis Taxol dózisok váltottak ki reakciókat. Végül, nemcsak a Taxol HSR mechanizmusa ismeretlen, hanem az sem tisztázott, hogy maga a paklitaxel indukál-e túlérzékenységi reakciókat, vagy a túlérzékenységi reakciók csak a segédanyagnak [Cremophor EL; Badische Anilin und Soda Fabrik AG

(BASF), Ludwigshafen, Federal Republic of Germany] tulajdoníthatók. Annak ellenére, hogy bizonytalan, vajon az előgyógyszerezésnek van-e valamilyen hatása a túlérzékenységi reakciók súlyosságának vagy számának csökkentésére, megelőző terápiát ajánlottak, mivel annak alkalmazásából ismert veszély nem következett.

A technika állásában található ellentmondó javaslatok, amelyek arra vonatkoztak, hogy előgyógyszerezést kell-e használni a túlérzékenységi reakciók elkerülésére, amikor hosszabb infúziós időtartamokat alkalmaznak, és a 6 órát meghaladó infúziókra vonatkozó hatékonysági adatok hiánya elfogadott rákkezelési protokollként nagy (170 mg/m^2 feletti) paklitaxel dózisok Cremophor EL emulzióban 24 órán át történő infúziójának alkalmazásához vezetett.

Noha lehetségesnek látszik a paklitaxel mellékhatásainak minimálisra csökkentése egy hosszú infúziós időtartam alkalmazásával, a hosszú infúziós idő a betegek számára kényelmetlen és költséges, mivel a betegeket figyelni kell a teljes 6-24 órás infúzió alatt. Továbbá a hosszú infúziós idő szükségessé teszi, hogy a betegek legalább egy éjszakát a kórházban vagy a klinikán töltsenek.

A paklitaxel nagyobb dózisait is leírták az irodalomban. A paklitaxel maximális tolerált dózisának (MTD) meghatározására nagy dózisú ciklofoszfamiddal és ciszplatinnal kombinációban, majd autológ vérképző progenitor-sejt támogatással (autologous hematopoietic progenitor-cell support, AHPCS), Stemmer és munkatársai ["High-dose paclitaxel, cyclophosphamide, and cisplatin with autologous hematopoietic progenitor-cell support: A phase I trial", *J. Clin. Oncol.*, 14, 1463-1472 (1996)] I fázisú vizsgálatot végeztek 44 rossz prognózisú mellrákos, non-Hodgkin limfómás (NHL) vagy petefészekrákos beteggel, ahol a paklitaxel növekvő dózisait 24 órás infúzió formájában, majd $5,625 \text{ mg/m}^2$ ciklofoszfamidot, 165 mg/m^2 ciszplatint és AHPCS-t adagoltak. A dózis-korlátozó toxicitást két betegben 825 mg/m^2 paklitaxelnél találták; az egyik beteg több szerv elégtelensége miatt halt meg, a másikonál 3-as fokozatú légzési, központi idegrendszeri és vesetoxicitás fejlődött ki, ami normalizálódott. 3-as fokozatú polineuropátiát és 4-es fokozatú központi idegrendszeri toxicitást szintén megfigyeltek. Ennek a kombinációnak a maximális tolerált dózisa 775 mg/m^2 paklitaxelnek, $5,625 \text{ mg/m}^2$ ciklofoszfamidnak és 165 mg/m^2 ciszplatinnak adódott, amit AHPCS követett. Az érzékelési polineuropátia és a nyálkahártyagyulladás kiugró toxicitások voltak, de mindkettő megfordítható és tolerálható volt. A 33 mellrákos beteg közül 18 (54%) mutatott részleges választ. Válaszokat figyeltek meg az NHL betegeknél (öt közül négyenél) és a petefészekrákos betegeknél (kettőből kettőnél) is.

Az 5 641 803 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban 175 és 135 mg/m^2 Taxol 3 órás infúzió formájában való alkalmazását ismertetik. Az infúziós előírások előzetes gyógyszeres kezelést tesznek szükségessé, és a betegek 35%-ánál számolnak be túlérzékenységi reakciók előfordulásáról. Neurotoxicitás a betegek 51%-ánál jelentkezett, ezek közül 66% a nagyobb dózisú csoportban, míg 37% a kisebb dózisú csoportban volt. Azt is megfigyelték, hogy a neurotoxicitást mutató betegek 48%-a a hosszabb, a 24 órás, míg az 54%-a a rövidebb, a 3 órás infúziós csoportba tartozott.

Az irodalomban bizonyíték van arra, hogy a paklitaxel nagyobb dózisa nagyobb válaszarányt eredményeznek. A paklitaxel optimális dózisait és adagolási rendjét még mindig vizsgálják. Annak a lehetőségnek a felmérésére, hogy a paklitaxel dózis-intenzitás fontos lehet-e a betegség-válasz kiváltásában, Reed és munkatársai az NCI-ben [Reed E., Bitton R., Sarosy G. and Kohn E., "Paclitaxel dose intensity", *Journal of Infusional Chemotherapy*, 6, 59-63 (1996)] analizálták a petefészekrák és a mellrák II fázisú vizsgálatokban kapott, hasz-

nosítható kezelési adatait. Az eredményeik azt feltételezik, hogy az objektív betegség-válasz és a paklitaxel dózis-intenzitás közötti összefüggés kiújult petefészekrákban statisztikailag igen szignifikáns, a kétoldali p értéke 0,022. A mellrák esetében az összefüggés még kifejezettebb, a kétoldali p -érték 0,004. A $135 \text{ mg/m}^2/21$ nap esetében az objektív válaszarány 13,2% volt; és a $250 \text{ mg/m}^2/21$ nap esetében 35,9%. A válaszarány a közbelső 175 mg/m^2 dózisonál lineáris volt a 135 mg/m^2 és a 250 mg/m^2 eredményekkel, és a lineáris regressziós analízis szerint ezekre az adatokra a korrelációs koefficiens 0,946 (Reed és munkatársai, 1996).

Holmes és munkatársai egy vizsgálatban ("Phase II trial of Taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer", *J. Natl. Cancer Inst.*, 83, 1797-1805, (1991)) és az MSKCC-nél [Reichman B.S. és munkatársai, "Paclitaxel and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as initial chemotherapy for metastatic breast cancer", *J. Clin. Oncol.*, 11, 1943-1951 (1993)] kimutatták, hogy a paklitaxel nagyobb, egészen 250 mg/m^2 -ig terjedő dózisa nagyobb választ (60%) eredményeznek, mint a 175 mg/m^2 dózis (26%), amely jelenleg a paklitaxel esetében engedélyezett. Ezeket az eredményeket azonban ezeknek a nagy dózisoknak a nagyobb toxicitása miatt nem reprodukálták. Ezek a vizsgálatok azonban bizonyítják a paklitaxel emelt dózisai esetén a válaszarány potenciális növekedését.

Mivel a Taxol esetében az előzetes gyógyszeres kezelésre szükség van, ami a beteg egy éjszakai kórházban tartózkodását teszi szükségessé, nagyon kívánatos olyan paklitaxel készítmény kifejlesztése, amely elhárítja az előzetes gyógyszeres kezelés szükségességét.

Mivel a Taxol esetében előgyógyszerezés szükséges a hatóanyag adagolásával járó túlérzékenységi reakciók miatt, nagyon kívánatos olyan paklitaxel készítmény kifejlesztése, amely nem okoz túlérzékenységi reakciókat. Olyan paklitaxel készítmény kifejlesztése is kívánatos, amely nem okoz neurotoxicitást.

Mivel a Taxol infúziókat általában előgyógyszerezés előzi meg, és a kezelés az infúzió után megfigyelést és jegyzetkészítést igényel, ami gyakran szükségessé teszi, hogy a beteg egy éjszakát kórházban töltsön, nagyon kívánatos olyan paklitaxel készítmény kifejlesztése, amely lehetővé tenné a beteg számára az ambuláns kezelést.

Mivel kimutatták, hogy nagyobb Taxol dózisokkal jobb klinikai válaszok érhetők el, jöllehet nagyobb toxicitással, kívánatos olyan paklitaxel készítmény kifejlesztése, amely ezeket a dózisokat enélkül a toxicitás nélkül éri el.

Miután kimutatták, hogy a Taxol dózisát korlátozó toxicitás cerebrális és neurotoxicitás, kívánatos olyan paklitaxel készítmény kidolgozása, amely csökkenti ezt a toxicitást.

Az előzetes gyógyszeres kezelés eliminálása szintén kívánatos, mivel ez növeli a beteg kényelmetlenségét, és növeli a kezelés költségét és időtartamát.

A paklitaxel-infúzió idejének rövidítése is kívánatos, ami jelenleg 3 óra és 24 óra között van, hogy a beteg kórházban vagy klinikán töltött idejét minimálisra csökkentsük.

Mivel a Taxol adagolása jelenleg 0,6 és $1,2 \text{ mg/ml}$ közötti koncentrációban engedélyezett, és jellemző dózisa emberekben körülbelül 250-350 mg, ez általában 300 ml-nél nagyobb infúziós térfogatokat eredményez. Kívánatos ezen infúziós térfogatok csökkentése olyan paklitaxel készítmények kifejlesztésével, amelyek nagyobb koncentrációban stabilak, és így csökkenthető az adagolás ideje.

Mivel a Taxol infúziója speciális intravénás csövek és zsákok vagy üvegek használatára korlátozódik, mert a Taxol készítményben levő cremophor a lágyítókat kioldja, kívánatos olyan paklitaxel készítmény kifej-

lesztése, amelyben nincs cremophor és potenciálisan nem old ki mérgező anyagokat az intravénás infúzióhoz hagyományosan használt műanyag csövekből vagy zsákokból.

A TALÁLMÁNY RÖVID ISMERTETÉSE

A jelen találmány célja tehát gyógyászatiilag hatásos szerek (például paklitaxel, taxán, taxotér és hasonló) módosítatlan formában és olyan készítményben történő adagolása, amely nem okoz allergiás reakciókat a hozzáadott emulgeáló és szolubilizáló szerek jelenléte miatt, amelyeket jelenleg alkalmaznak a készítményben.

A jelen találmány további célja gyógyászatiilag hatásos szerek mikorészecskékből vagy nanorészecskékből álló készítmény formájában, kívánt esetben alkalmas biokompatibilis folyadékkal készült szuszpenzióban történő adagolása.

A jelen találmány egy még további célja gyógyászatiilag hatásos szerek szubmikron részecskéinek (nanorészecskéinek) olaj-a-vízben emulzióból oldószerlepirási technikával történő előállítására alkalmas eljárás rendelkezésre bocsátása. Bizonyos eljárások fehérjéket alkalmaznak stabilizálószerként. Más eljárások bármilyen hagyományos felületaktív anyag távollétében és bármilyen polimer maganyag távollétében kerülnek megvalósításra.

A találmány ezen és más céljai a leírás és az igénypontok alapján válnak nyilvánvalóvá.

Felismertük, hogy lényegében vízben oldhatatlan farmakológiailag hatásos szerek mikrorészecskék vagy nanorészecskék formájába hozhatók, amelyek alkalmasak vizes szuszpenzióban történő parenterális adagolásra. Ez a kikészítési mód elhárítja azt, hogy lényegében vízben oldhatatlan gyógyászatiilag hatásos szerek (például a paklitaxel) adagolásához olyan emulzió legyen szükséges, amely például etanol és polietoxilezett ricinusolajat tartalmaz normális sóoldattal hígított formában (ld. például Norton és munkatársai, *Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus*, 1992. szeptember 23-24.). Az ilyen ismert készítmények hátránya, hogy hajlamosak allergiás mellékhatások kiváltására.

A jelen találmány olyan paklitaxel készítményekre vonatkozik, amelyek fehérje bevonatokkal ellátott paklitaxelt tartalmazó nanorészecskéket tartalmaz, amely nanorészecskék átlagos átmérője nem nagyobb, mint körülbelül 200 nanométer, ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben legalább 2,0 mg/ml és ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben nem 20 mg/ml.

Eljárásokat ismertettünk gyógyászatiilag hatásos szerek nanorészecskéinek előállítására különféle körülmények között készített olaj-a-vízben emulzióból történő oldószerlepirási technikával. Például nagy nyíró erőt (például szonikálást, nagynyomású homogenizálást) használhatunk hagyományos felületaktív anyagok távollétében és bármilyen polimer maganyag nélkül a nanorészecske mátrix előállítására. Ezek helyett fehérjéket (például humán szérum albumint) alkalmazunk stabilizálószerként. Egy alternatív eljárásban nanorészecskék képződhetnek anélkül, hogy nagy nyíró erőkre szükség lenne, egyszerűen olyan anyagok kiválasztásával, amelyek spontán képeznek mikroemulziókat.

Bemutatunk egy szokatlanul kicsi (200 nm-nél kisebb átmérőjű) nanorészecskék reprodukálható előállítására alkalmas eljárást is, amely részecskék egy 0,22 mikronos szűrőn sterilre szűrhetők. Ezt úgy érjük el, hogy egy vízben oldódó oldószert (például etanol) adunk a szerves fázishoz, és gondosan választjuk meg a szerves fázis típusát, a fázis frakciót és a szerek a szerves fázisbeli koncentrációját. Nagy jelentőségű és fontosságú, hogy

0,22 mikronos szűrőn szűrhető méretű részecskéket tudunk előállítani, mivel a bármilyen fehérjét (például albumint) jelentős mennyiségben tartalmazó készítmények a hagyományos módszerekkel, így autoklavozással nem sterilizálhatók a fehérje hő hatására történő koagulációja miatt.

A jelen találmány egy másik megvalósítási módjának megfelelően olyan készítményeket fejlesztettünk ki, amelyek lényegében vízben oldhatatlan gyógyászatiilag hatásos szerek *in vivo* adagolására alkalmasak. A találmány szerinti készítmények lényegében vízben oldhatatlan gyógyászatiilag aktív szereket (szilárd vagy folyadék formában) tartalmaznak egy polimer burokban. A polimer burok egy térhálósított biokompatibilis polimer. A polimer burok, amely a lényegében vízben oldhatatlan gyógyászatiilag hatásos szert foglalja magában, az adagoláshoz egy biokompatibilis vizes folyadékban szuszpendálható.

A találmány a továbbiakban olyan hatóanyagleadó rendszert bocsát rendelkezésre, amelyben a gyógyászatiilag hatásos szer molekuláinak egy része fehérjéhez (például humán szérum albuminhoz) van kapcsolva, és ezért az emiós számára az adagolást követően azonnal biológiaiilag hasznosítható. A gyógyászatiilag hatásos szer másik részét fehérjével bevont nanorészecskék foglalják magukban. A nanorészecskék a gyógyászatiilag hatásos szert tiszta aktív komponens formájában tartalmazzák bármilyen polimer mátrixszal történő hígítás nélkül.

A hagyományos gyógyászatiilag hatásos szerek nagy száma a véráramban hordozó-fehérjékhez (hidrofób vagy ionos kölcsönhatások révén) kötődve cirkulál, ezen fehérjék közül leggyakoribb a szérum albumin. A találmány szerinti eljárások és az azokkal előállított készítmények egy gyógyászatiilag hatásos szer számára biztosítják, hogy az adagolást megelőzően már egy fehérjéhez legyen kötve (hidrofób vagy ionos kölcsönhatások révén).

A jelen leírás bemutatja a biológiai hasznosíthatóságnak mindkét fentebb leírt módját a paklitaxel esetében, amely egy, a humán szérum albuminhoz kötődni képes rákellenes szer [ld. például Kumar és munkatársai, *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 80, 337 (1993)]. A találmány szerinti részecskékben az albumin nagy koncentrációja a Taxol®-hoz viszonyítva (amely a Bristol-Myers Squibb paklitaxel készítménye) a hatóanyag jelentős részét albuminhoz kötött molekulák formájában biztosítja, amely a véráramban a hatóanyagának a természetes hordozója is.

Emellett előnyös, hogy a humán szérum albumin képes megkötni a paklitaxelt, valamint más hatóanyagokat is, ami fokozza a paklitaxelnek a részecskék felületén történő abszorbeálódását. Mivel az albumin jelen van a kolloidális hatóanyag részecskéken (amelyek a szerves oldószer eltávolítása után képződnek), elősegíti egy kolloidális diszperzió kialakulását, amely hosszabb ideig stabil az elektromos taszítás és a szterikus stabilizáció kombinációjának következtében.

A jelen találmánynak megfelelően por formában levő szubmikron részecskéket is rendelkezésre bocsátunk, amelyeket vízzel vagy sóoldattal könnyen szuszpenzióvá alakíthatunk. A port a víz liofilizálással történő eltávolításával kapjuk. A humán szérum albumin bizonyos találmány szerinti nanorészecskékben szerkezeti komponensként, valamint krioprotektív és rekonstitúciós segédanyagként szolgál. A 0,22 mikronos szűrőn át szűrhető részecskék jelen találmány szerinti eljárással történő előállítása, majd szárítása vagy liofilizálása után steril szilárd készítményt kapunk, amely intravénás injektlásra alkalmas.

A találmány egy speciális vonatkozásban rákellenes szereket, például paklitaxelt tartalmazó készítményt bocsát rendelkezésre nanorészecskék formájában folyékony diszperzióban vagy szilárd formában, amely az ada-

goláshoz könnyen rekonstituálható. Bizonyos hatóanyagok, például a paklitaxel speciális tulajdonságai következtében az ilyen készítményeket nem kaphatjuk meg hagyományos oldószerleptárlási eljárásokkal, amelyek felületaktív anyagok alkalmazásán alapulnak. Különböző felületaktív anyagok jelenlétében nagyon nagy (például körülbelül 5 mikron és több száz mikron közötti méretű) hatóanyag-kristályok képződnek az előállítási eljárást követő néhány perces tárolás alatt. Az ilyen kristályok mérete jellemzően sokkal nagyobb annál, mint amilyen méret az intravénás injektlás esetében megengedett.

Noha felismertük, hogy a találmány szerint előállított részecskék lehetnek kristályosak, amorfak vagy ezek keveréke, általában előnyös, ha a hatóanyag a készítményben amorf formában van jelen. Ez könnyebb oldódáshoz és abszorpcióhoz vezet, ami javítja a biológiai hasznosíthatóságot.

A paklitaxel rákellenes szer figyelemreméltó klinikai aktivitást mutat számos humán rákban, így a petefészek, mell, tüdő, nyelőcső, fej és nyak régióban, a hólyag- és nyirokútrákban. Jelenleg petefészekrák kezelésére engedélyezett, ahol ciszplatinnal kombinációban alkalmazzák, és áttételes mellrák esetében, ahol előzőleg egy kombinációs kemoterápiás kezelés nem volt sikeres. A Taxol® fő korlátozója a rossz oldhatósága, és ennek következtében a BMS készítmény 50% Cremophor EL-t és 50% etanolt tartalmaz szolubilizáló vívbányagként. Ezen készítmény mindegyik flakója 30 mg paklitaxelt tartalmaz 6 mg/ml koncentrációban, oldott állapotban. Az intravénás adagolás előtt ezt a készítményt sóoldattal 1:10 arányban hígítani kell, így az adagolásra kerülő oldat 0,6 mg/ml paklitaxelt tartalmaz. Ez a készítmény súlyos túlérzékenységi reakciókat váltott ki állatokban [Lorenz és munkatársai, *Agents Actions*, 7, 63-67 (1987)] és embereknél [Weiss és munkatársai, *J. Clin. Oncol.*, 8, 1263-68 (1990)], és ennek következtében a beteg kortikoszteroidokkal (például dexametazonnal) és antihisztaminokkal történő előzetes gyógyszeres kezelését teszi szükségessé. A nagy hígítás nagy infúziós térfogatokat (jellemző dózis 175 mg/m^2) eredményez, ami elérheti az 1 litert, továbbá 3 órától 24 óráig terjedő infúziós időt eredményez. Ily módon szükség van egy alternatív, kevésbé toxikus paklitaxel készítményre.

A Capxol™ a rákellenes paklitaxel hatóanyag egy új, cremophor-mentes készítménye. A felhalálók az állatkísérletek alapján azt gondolják, hogy a cremophor-mentes készítmény szignifikánsan kevésbé lesz toxikus és nem igényli a betegek előzetes gyógyszeres kezelését. Az előzetes gyógyszeres kezelés a túlérzékenység és anafilaxia csökkentéséhez szükséges, amelyet a cremophor okoz a jelenleg engedélyezett és Taxol® néven forgalomban levő paklitaxel készítményben. A Capxol™ egy liofilizált por, amely rekonstituálható és intravénásan adagolható. Amikor megfelelő vizes közeggel, például 0,9%-os injekciós nátrium-klorid-oldattal vagy 5%-os injekciós dextróz-oldattal rekonstituáljuk, a Capxol™-ból stabil kolloidális paklitaxel-oldat képződik. A kolloidális szuszpenzió mérete 20 nm és 8 mikron közötti, az előnyös tartomány körülbelül 20-400 nm. A Capxol™ két fő komponense a módosított paklitaxel és a humán szérum albumin (HSA). Mivel a HSA vízben jól oldódik, a Capxol™ bármilyen paklitaxel koncentrációra rekonstituálható, a koncentrációnak csak a HSA oldhatósága szab határt. Ily módon a Capxol™ a koncentrációk széles, a hígítól (0,1 mg/ml paklitaxel) a töményig (20 mg/ml paklitaxel) terjedő tartományába rekonstituálható. Ez meglehetősen kis adagolási térfogatokat eredményezhet.

A jelen találmánnyal összhangban biológiai anyagok *in vivo* adagolására használható készítményeket és eljárásokat hozsátunk rendelkezésre nanorészecskék formájában, amelyek vizes szuszpenzióként parenterális adagolásra alkalmasak. A találmány szerinti készítmények egy stabilizáló polimert tartalmaznak. A polimer egy

biokompatibilis anyag, például az albumin fehérje. A biológiai anyagok adagolására alkalmas találmány szerinti készítmények alkalmazása nem teszi szükségessé a biológiai anyagok toxikus hígítószerekben vagy vívőanyagokban, például etanolban és polietoxilezett ricinusolajban normál sóoldattal hígított formában történő adagolását (ld. például Norton és munkatársai, *Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus*, 1992. szeptember 23-24.). Az ilyen ismert készítmények hátránya, hogy hajlamosak súlyos allergiás és más mellékhatások előidézésére.

Ismeretes, hogy biológiai anyagok részecske-szuszpenzió formájában történő adagolása lehetővé teszi egyes szervek, például a máj, a tüdők, a lép és a nyirokkeringés célbavételét, mivel ezek a szervek a részecskéket a sejtek retikuloendoteliális (RES) rendszere által felveszik. A RES tartalmú szervek célbavétele az alkalmazott részecskék méretének változtatásával és különféle módon történő adagolással szabályozható. Azonban, amikor a Capxol™-t patkányoknak adagoltuk, váratlanul és meglepő módon azt találtuk, hogy más, a RES-t tartalmazóktól eltérő szövetekben, így a prosztatában, a hasnyálmirigyben, a herékben, a spermaképző tubulusokban, a csontban jelentősen nagyobb mennyiségben akumulálódtak, mint a Taxol® hasonló dózisa.

Ily módon nagyon meglepő, hogy a találmány szerinti paklitaxel készítmény, a Capxol™, amely nanorészecske-készítmény, olyan szövetekben, mint a prosztata, hasnyálmirigy, herék, spermaképző tubulusok és a csont, azaz olyan szervekben, amelyek nem tartalmaznak RES-t, szignifikánsan nagyobb koncentrációban akumulálódnak, mint a paklitaxel nem-részecske készítménye, például a Taxol®. Ezért a Capxol™-t ezen szövetek kezelésére nagyobb hatékonysággal használható, mint a Taxol®. Azonban sok más szövetben hasonló a Capxol™ és a Taxol® eloszlása, ezért várható, hogy a Capxol™ más szövetekben megtartja a paklitaxel rákellenes hatását legalább a Taxol®-éval azonos szinten.

A prosztatán belüli lokalizáció alapja lehet a készítmény részecskemérete (20-400 nm) vagy a készítményben a fehérje albumin jelenléte, amely specifikus membrán receptorok révén (például gp 60, gp 18 és gp 13) okozhatja a prosztata szövetben a lokalizációt. Az is valószínű, hogy más, az albumintól eltérő biokompatibilis, biológiailag lebontható polimerek bizonyos szövetekre, például a prosztatára vonatkozóan mutatnak specifitást, aminek eredménye ezekben a szövetekben a paklitaxel nagy helyi koncentrációja, a fentebb leírt tulajdonságok következtében. Az ilyen biokompatibilis anyagokat a jelen találmány körébe tartozónak tekintjük. A prosztatában nagy helyi paklitaxel koncentráció elérésére alkalmas készítmény egyik előnyös megvalósítási módja olyan készítmény, amely paklitaxelt és albumint tartalmaz, a részecskék mérete 20-400 nm, és a készítmény cremophortól mentes. Erről a kiviteli alakról azt is kimutattuk, hogy nagyobb paklitaxel koncentrációt alakít ki a hasnyálmirigyben, vesében, tüdőben, szívben, csontban és a lépben, mint a Taxol® ekvivalens dózisa. Ezek a tulajdonságok ezen paklitaxel készítmény új alkalmazásait teszik lehetővé, beleértve a tesztoszteron szintek csökkentését, az orvosi hereeltávolítás elérését, resztenózis kezelésében nagy helyi koncentrációkat biztosítva a koszorúserekben.

Az is nagyon meglepő, hogy amikor a paklitaxelt Capxol™-ként adagolják, sokkal kisebb sebességgel metabolizálódik metabolitjaira, mint amikor Taxol®-ként adagoljuk. Ez hasonló paklitaxel dózis mellett megnövekedett rákellenes hatást jelent hosszabb időn át.

Az is nagyon meglepő, hogy amikor Capxol™-t és Taxol®-t ekvivalens paklitaxel dózisokban adagolunk patkányoknak, sokkal nagyobb mértékű mieloszuppresszió következik be a Taxol® csoport esetében a Capxol™

csoporthoz viszonyítva. Ez a fertőzések és lázas események (például lázzal járó neutropénia) kisebb arányú előfordulását eredményezheti. Csökkentheti a kezelések közötti ciklusidőt is, ami jelenleg 21 nap. Így módon a CapxolTM alkalmazása lényeges előnyt biztosíthat a Taxol[®]-al szemben.

Arra a meglepő eredményre jutottunk, hogy a Taxol[®] vivőanyaga (cremophor/etanol sóoldattal hígítva) önmagában erős mielosuppressziót és súlyos túlérzékenységi reakciókat, valamint néhány dóziscsoportban halált okozott egerekben. Ilyen reakciókat nem figyeltünk meg a CapxolTM csoportokban ekvivalens vagy nagyobb dózisokban. Így módon a CapxolTM egy olyan paklitaxel készítmény, amely mentes a Taxol[®] vivőanyagától, jelentős előnnyel rendelkezik.

Az is nagyon meglepő, hogy amikor Capxol[®]-t és Taxol[®]-t adagolunk patkányoknak azonos paklitaxel dózisokban, sokkal alacsonyabb toxicitást találunk a CapxolTM esetében a Taxol[®]-hoz viszonyítva, amit a jelentősen nagyobb LD₅₀ értékek bizonyítanak. Ez lehetővé teszi, hogy a betegeknek nagyobb, terápiásan hatásosabb paklitaxel dózisokat adagoljunk. Az irodalomban van arra bizonyíték, hogy a nagyobb paklitaxel dózisok esetében megnő a válaszok aránya. A Capxol[®] készítmény lehetővé teheti ilyen nagyobb dózisok adagolását a kisebb toxicitás miatt, és ezáltal ezen hatóanyag teljes hatékonyságának a kihasználását.

Az is meglepő, hogy a CapxolTM, amely egy lényegében vízóldhatatlan hatóanyagot, paklitaxelt tartalmazó készítmény, stabil, amikor vizes közeggel különböző, például, de nem kizárólag 0,1 és 20 mg/ml közötti koncentrációjú folyékony készítménnyé re-konstituáljuk. Ez lényeges előnyt biztosít a Taxol[®]-al szemben a hatóanyag adagolása során, mivel kisebb infúziós térfogatokat eredményez, kiküszöböli a Taxol[®] esetében ismert instabilitási kérdéseket, így a csapadékkiválást, és elkerüli egy in-line szűrő alkalmazását az infúziós vezetékben. Így módon a CapxolTM nagyban egyszerűsíti és javítja a paklitaxel betegeknek történő adagolását.

Az is meglepő, hogy a CapxolTM-t, amikor patkányoknak a Taxol[®]-al azonos paklitaxel dózisban adagoljuk, a neurotoxicitásnak nincs jele, míg a Taxol[®] esetében, még kis dózisok alkalmazásakor is neurotoxikus hatások jelentkeznek.

A találmány szerinti készítmény továbbá a paklitaxel és más, vízben oldhatatlan, gyógyászatiilag hatásos szerek adagolását sokkal kisebb folyadéktérfogat alkalmazásával és az adagolási térfogatokkal arányosan nagymértékben csökkentett adagolási idővel teszi lehetővé a technika állásához tartozó leadó-rendszerek által igényelt adagolási térfogatokhoz és időkhöz viszonyítva.

Egy biokompatibilis polimer mátrixszal kombinálva a találmány szerinti készítmény (CapxolTM) lehetővé teszi a paklitaxel helyi, nyújtott leadását kisebb toxicitás és tartósabb hatás mellett.

A CapxolTM-ra vonatkozó fenti meglepő felismerések lehetővé teszik, hogy a paklitaxellel kezelt betegek életminősége lényegesen javuljon.

A CapxolTM egy liofilizált por, amely csak paklitaxelt és humán szérum albumint tartalmaz. A liofilizált por rekonstitúciójakor képződött kolloid oldat természete következtében toxikus emulgeálószer, mint a cremophor (a BMS paklitaxelt tartalmazó készítményében) vagy polisorbát 80 (a Rhone Poulenc doketaxel nevű készítményében) és oldószer, így például etanol nem szükségesek a hatóanyag szolubilizálásához. A toxikus emulgeálószer eltávolítása csökkenti a súlyos túlérzékenységi és anafilaxiás reakciókat, amelyekről tudott, hogy a Taxol készítményeknél előfordulnak.

Emellett nem kell szteroidokkal és antihisztaminokkal előgyógyszerezést végezni a gyógyszer adagolását megelőzően.

A csökkent toxicitásnak köszönhetően, amit az LD_{50}/LD_{10} vizsgálatok igazolnak, nagyobb dózisok alkalmazhatók a nagyobb hatékonyság elérése érdekében.

A mieloszuppresszió csökkentése (a BMS készítménnyel összevetve) feltehetően csökkenti a kezelési ciklus idejét (ami jelenleg 3 hét) és javítja a terápiás eredményt.

A jelen találmány olyan paklitaxel készítményekre vonatkozik, amelyek fehérje bevonatokkal ellátott paklitaxelt tartalmazó nanorészecskéket tartalmaz, amely nanorészecskék átlagos átmérője nem nagyobb, mint körülbelül 200 nanométer, ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben legalább 2,0 mg/ml és ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben nem 20 mg/ml.

A CapxolTM sokkal nagyobb (akár 20 mg/ml) koncentrációban adagolható a BMS készítményhez viszonyítva (0,6 mg/ml), ami sokkal kisebb térfogatú infúziókat és intravénás bolusz formájában történő adagolást tesz lehetővé.

A Taxol®-nak van egy további hátránya, hogy csak nitroglicerinnel poliolefin infúziós készülékben adagolható, mivel a standard infúziós vezetékből a lágyítók a készítménybe oldódnak. A CapxolTM esetében nincs kioldódás, és bármilyen standard infúziós vezetékeken keresztül beadható. Emellett csak üveg vagy poliolefin tartályok használhatók minden cremophort tartalmazó oldat tárolására. A CapxolTM készítmény esetében nincsenek ilyen korlátozások.

A Taxol®-al kapcsolatban egy másik felismert probléma a paklitaxelnek a csapadék formájában történő kiválása a bevezető katéterekben. Ez hibás és rosszul szabályozható adagolást eredményez. Az új készítmény, a CapxolTM kolloidális oldatának saját stabilitása következtében a csapadékkiválás problémája enyhül. Emiatt a kicsapódási probléma miatt a Taxol® adagolásánál in-line szűrő alkalmazására van szükség a csapadék és más részecske formájú anyag eltávolítására. A CapxolTM esetében nincs ilyen követelmény a saját stabilitásnak köszönhetően.

Az irodalom azt feltételezi, hogy a részecskék a néhány száz nanométeres mérettartományban kedvezően kerülnek a tumorokba a szivárgó vérereken keresztül. A paklitaxel kolloidális részecskéi a CapxolTM készítményben ezért egy kedvező célbajuttató hatást mutathatnak, nagyban csökkentve a Taxol® készítményben adagolt paklitaxel mellékhatásait.

Ezért a jelen találmány első célja olyan új paklitaxel készítmény rendelkezésre bocsátása, amely a fenti kívánatos jellemzőkkel rendelkezik.

A jelen találmány egy másik célja olyan új paklitaxel készítmény rendelkezésre bocsátása, amely bizonyos szövetekben lokalizálja a paklitaxelt, ezáltal ezeken a helyeken nagyobb rákellenes hatást biztosít.

A találmány egy további célja a paklitaxel körülbelül 2 mg/ml koncentrációnál nagyobb koncentrációban történő adagolása az infúziós térfogatok csökkentése érdekében.

A találmány célja továbbá olyan paklitaxel készítmény rendelkezésre bocsátása, amely mentes a Taxol® vívőanyagától.

A találmány egy még további célja olyan paklitaxel készítmény rendelkezésre bocsátása, amely javítja azoknak a betegnek az életminőségét, akik a rák kezelésére paklitaxelt kapnak.

AZ ÁBRÁK RÖVID LEÍRÁSA

Az 1. ábrán a paklitaxel nanorészecskék daganatos egereknek ($n = 5$ minden csoportban) történő intravénás adagolására vonatkozó eredmények láthatók, amelyek a tumor teljes visszafjlődését mutatják a kezelt csoportban (fekete négyzettel jelölve) a sóoldatot kapott kontroll csoporthoz hasonlítva (fekete ponttal jelölve). Tényleges szabályozatlan tumor növekedés látható a kontroll csoportban. A kezelési csoportnál 20 mg/kg paklitaxelt alkalmaztunk intravénás bólusz formájában öt egymást követő napon.

A 2. ábrán paklitaxel nanorészecskék intraperitoneális adagolásának eredményei láthatók patkányokban, amelyeknek a mancsában kollagén intradermális injekcióját követően ízületi gyulladás alakult ki. A mancsérfogatókat mértük, és a méret mutatja a betegség súlyosságát. A mancsérfogatókat 100%-ra normalizáltuk a kezelés kezdetén. A 0. nap jelenti a kezelés kezdetét. Három csoport van, a kontroll csoport, amely sóoldatot kap ($n = 2$, az ábrán vékony vonal mutatja és a "nem kezelt" felírat); az első kezelt csoport, amely paklitaxel-nanorészecskéket kap 1 mg/kg dózisban ($n = 4$, vastag vonal mutatja és a felírat: "paklitaxel-nanorészecskék 1,0 mg/kg"), és a második kezelt csoport, amely kombinációs terápiát kap, paklitaxel nanorészecskéket 0,5 mg/kg dózisban és prednizont 0,2 mg/kg dózisban ($n = 4$, vastag vonal mutatja, és a felírat: "prednizon 0,2 mg/kg + paklitaxel-nano-részecskék 0,5 mg/kg"). A két kezelt csoport esetében a mancsérfogató az idővel jelentősen csökken, ami az ízületi gyulladás visszafjlődésére utal, míg a kontroll csoportban ugyanezen idő alatt nő a mancsérfogató.

A 3. ábra patkányokkal végzett mieloszuppressziós vizsgálatok eredményeit mutatja. Egy 3 patkányból álló első csoport CapxolTM-t, egy szintén 3 patkányból álló második csoport Taxol[®]-t kapott egyaránt 7 ml készítmény/kg testtömeg dózisban, ahol a készítmények 5 mg/kg paklitaxelt tartalmaztak. Minden dózist i.v. bólusz formájában adtuk be a farokvénán keresztül. A 3. ábra a fehér vérsejtek (WBC) számának %-os változását mutatja a mieloszuppresszió indikátoraként.

A 4. ábra egy CapxolTM-al, a céldózistartomány és hatékonyság meghatározása céljából végzett kísérleti vizsgálatot mutat. Egerekbe ($n = 10$) szubkután MX-1 emlőtumort implantáltunk, és a kezelést akkor kezdtük meg, amikor a tumor elérte a körülbelül 150-300 mg méretet. Ez a 12. napon következett be, és a kezelést a beültetés után 13 nappal kezdtük. A CapxolTM-ból sóoldattal paklitaxel nanorészecskéket tartalmazó kolloid oldatot készítettünk. A daganatos egereket ($n = 5$) 20 mg/kg dózis paklitaxelnek megfelelő rekonstituíált CapxolTM-al kezeltük (VIV-1), bólusz injekció formájában beadva a farokvénába minden nap, öt egymást követő napon. A kontroll daganatos csoport ($n = 5$) csak sóoldatot kapott ugyanilyen adagolási rend mellett. A tumorok méretét az idő függvényében követtük. A kontroll csoportban hatalmas növekedést mutatót a tumor tömege, a középérték a 4500 mg-ot is meghaladta, és ebben a csoportban minden állatot leöltünk a 28. és 39. nap közötti időben. A kezelt csoport viszont figyelemreméltó hatékonyságot mutatott, és a 25. napon már egyik állatnak sem volt mérhető daganata. Minden ebbe a csoportba tartozó állatot leöltünk a 39. napon, amikor a tumor kiújulásának és jelenlétének semmilyen jele nem volt látható.

A TALÁLMA NY RÉS ZLETES ISMERTETÉSE

A jelen találmány olyan paklitaxel készítményekre vonatkozik, amelyek fehérje bevonatokkal ellátott paklitaxelt tartalmazó nanorészecskéket tartalmaz, amely nanorészecskék átlagos átmérője nem nagyobb, mint

körülbélül 200 nanométer, ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben legalább 2,0 mg/ml és ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben nem 20 mg/ml.

A jelen találmánnyal összhangban eljárásokat bocsátunk rendelkezésre a paklitaxel toxicitásának csökkentésére paklitaxel-lel kezelt egyedekben, az eljárás abban áll, hogy a paklitaxelt szisztémásan adagoljuk az egyednek gyógyászatiilag elfogadható készítményben legalább 175 mg/m² dózisban két óránál nem hosszabb adagolási időszak alatt.

A jelen találmánnyal összhangban eljárást bocsátunk rendelkezésre a paklitaxel adagolására ilyen adagolást igénylő egyednek, anélkül, hogy a paklitaxel adagolása előtt gyógyszeres előkezelésre lenne szükség, az eljárásra jellemző, hogy a paklitaxelt szisztémásan adagoljuk az egyednek gyógyászatiilag elfogadható készítményben legalább 135 mg/m² dózisban 2 óránál nem hosszabb adagolási időszak alatt.

A jelen találmány egy további megvalósítási módjának megfelelően eljárást bocsátunk rendelkezésre paklitaxel adagolására ilyen kezelést igénylő egyednek, az eljárásra jellemző, hogy a paklitaxelt szisztémásan adagoljuk az egyednek egy gyógyászatiilag elfogadható készítményben legalább 135 mg/m² dózisban, 2 óránál nem hosszabb adagolási időszak alatt, 3 hétnél rövidebb kezelési ciklusok mellett.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően eljárást bocsátunk rendelkezésre paklitaxel adagolására egy ilyen kezelést igénylő egyednek, az eljárásra jellemző, hogy a paklitaxelt szisztémásan adagoljuk az egyednek egy gyógyászatiilag elfogadható készítményben legalább 250 mg/m² dózisban.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően eljárást bocsátunk rendelkezésre paklitaxel adagolására egy ilyen kezelést igénylő egyednek, az eljárásra jellemző, hogy a paklitaxelt szisztémásan adagoljuk az egyednek olyan készítményben, amely biztonságosan adagolható extrahálható komponenseket tartalmazó anyagokból készült orvosi segédeszközök alkalmazásával.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően eljárást bocsátunk rendelkezésre paklitaxel adagolására egy ilyen kezelést igénylő egyednek, az eljárásra jellemző, hogy a paklitaxelt szisztémásan adagoljuk az egyednek egy olyan készítményben, amely biztonságosan adagolható in-line szűrő alkalmazása nélkül.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően eljárást bocsátunk rendelkezésre paklitaxel adagolására egy ilyen kezelést igénylő egyednek, az eljárásra jellemző, hogy szisztémásan adagolunk az egyednek egy teljes paklitaxel dózist 250 ml-nél kisebb térfogatban.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően eljárást bocsátunk rendelkezésre paklitaxel adagolására egy ilyen kezelést igénylő egyednek, az eljárásra jellemző, hogy a paklitaxelt szisztémásan adagoljuk az egyednek legalább 50 mg/m²/óra sebességgel.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően egy paklitaxel készítményt bocsátunk rendelkezésre, amelynek csökkentett mértékű a hematológiai toxicitása a paklitaxellel kezelt egyed számára, a készítmény a paklitaxelt gyógyászatiilag elfogadható készítményben tartalmazza, amely legalább 175 mg/m² dózisban, 2 óránál nem hosszabb adagolási időszak alatt történő szisztémás adagolásra alkalmas.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően egy olyan paklitaxel készítményt bocsátunk rendelkezésre, amely alkalmas paklitaxel adagolására egy ilyen kezelést igénylő egyednek, anélkül, hogy a paklitaxel adagolás előtt gyógyszeres előkezelés lenne szükséges, a készítmény a paklitaxelt gyógyászati-

lag elfogadható készítményben tartalmazza, amely a paklitaxel legalább 135 mg/m^2 dózisban, 2 óránál nem hosszabb adagolási időszak alatt történő szisztémás adagolására alkalmas.

A találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően olyan paklitaxel készítményt bocsátunk rendelkezésre, amely alkalmas a paklitaxel egy ilyen kezelést igénylő egyednek három hétnél rövidebb kezelési ciklusok melletti adagolására, a készítmény a paklitaxelt olyan gyógyászati lag elfogadható készítményben tartalmazza, amely legalább 135 mg/m^2 dózisban, 2 óránál nem hosszabb adagolási időszak alatt történő szisztémás adagolásra alkalmas.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően olyan paklitaxel készítményt bocsátunk rendelkezésre, amely alkalmas a paklitaxel adagolására egy ilyen kezelést igénylő egyednek, ahol a készítmény a paklitaxelt egy gyógyászati lag elfogadható, cremophortól mentes készítményben tartalmazza.

A jelen találmány még további megvalósítási módjának megfelelően a paklitaxel egy liofilizált készítményt bocsátjuk rendelkezésre, amely rekonstitúció után a paklitaxel egy ilyen kezelést igénylő egyednek történő adagolására alkalmas.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően fagyasztott paklitaxel készítményt bocsátunk rendelkezésre, amely kiengedés után alkalmas a paklitaxel ilyen kezelést igénylő egyednek történő adagolására.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően egy folyékony paklitaxel készítményt bocsátunk rendelkezésre, amely vizet és legalább $2,0 \text{ mg/ml}$ koncentrációban paklitaxelt tartalmaz.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően egy hatóanyagleadó rendszert bocsátunk rendelkezésre, amely lényegében vízben oldhatatlan, fehérjével bevont gyógyászati lag hatásos szer szilárd vagy folyadék részecskéit tartalmazza, ahol a fehérjebevonathoz szabad fehérje tapad,

ahol a gyógyászati lag hatásos szer egy része a fehérjebevonatban van, és a gyógyászati lag hatásos szer egy része szabad fehérjéhez kapcsolódik, és

ahol a részecskék átlagos átmérője körülbelül 1 mikron nál nem nagyobb.

A találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően egy hatóanyagkészítményt bocsátunk rendelkezésre, amely alkalmas egy hatóanyagnak ilyen kezelést igénylő egyednek inhalálással történő adagolására, a készítmény körülbelül $1\text{--}10 \text{ }\mu\text{m}$ méretű fehérje mikrorészecskéket tartalmaz, ahol a fehérje mikrorészecskék körülbelül $50\text{--}1000 \text{ nm}$ méretű hatóanyagnanorészecskéket és kívánt esetben segédanyagot tartalmaznak.

A jelen találmánnyal összhangban eljárásokat bocsátunk rendelkezésre lényegében vízben oldhatatlan gyógyászati lag hatásos szerek *in vivo* leadására, az eljárásra jellemző:

- a)
 - i) egy szerves oldószert, amelyben a hatóanyag fel van oldva;
 - ii) vizet vagy vizes oldatot;
 - iii) felületaktív anyagot; és
 - iv) társ-felületaktív anyagot kombinálunk, amelyek spontán mikroemulziót képeznek; és
- b) eltavolítjuk a szerves oldószert, így a hatóanyag nanorészecskéinek vizes szuszpenzióját kapjuk.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően eljárást bocsátunk rendelkezésre hatóanyagot tartalmazó nanorészecskék előállítására, az eljárásra jellemző, hogy egy nem-illékony fázist, egy illékony fázist, és egy felületaktív anyagot kombinálunk, amely anyagok spontán mikroemulziót képeznek, ahol az

illékony fázis tartalmazza a hatóanyagot, és az illékony fázist eltávolítjuk, ezáltal a szilárd nanorészecskéknél a nem-illékony fázissal alkotott szuszpenzióját kapjuk, ahol a nanorészecskék tartalmazzák a hatóanyagot, és átlagos átmérőjük 100 nm-nél kisebb.

A jelen találmány egy még további megvalósítási módjának megfelelően eljárást bocsátunk rendelkezésre hatáson szert tartalmazó nanorészecskék előállítására, az eljárásra jellemző, hogy egy nem-illékony fázist és egy illékony fázist kombinálunk, amelyek spontán mikroemulziót képeznek, ahol a nem-illékony fázis tartalmazza a hatáson szert, és eltávolítjuk a nem-illékony fázist, ezáltal az illékony fázisban szilárd nanorészecskéket kapunk, ahol a nanorészecskék tartalmazzák a hatáson szert, és átlagos átmérőjük 100 nm-nél kisebb.

A fentebb leírt eljárásokkal kapott készítmények különösen előnyösek, mivel úgy találtuk, hogy különböző gyógyászati hatáson szereket igen kis toxicitású formában tesznek felhasználhatóvá. Más módszereket is leírunk itt gyógyászati hatáson szerek, például a paklitaxel kis toxicitású formáinak előállítására.

Az egyik előnyös megvalósítási módban a fentebb leírt részecskék átlagos átmérője körülbelül 200 nm-nél nem nagyobb. Az ilyen részecskék különösen előnyösek, mivel sterilre szűrhetők, ezáltal további erőteljes kezelés szükségessége kerülhető el a kívánt farmakológiailag hatáson szert tartalmazó oldatok sterilizálásához.

A jelen leírásban, amennyiben másképpen nem utalunk rá, a "paklitaxel" kifejezés magában foglalja a paklitaxel minden formáját, módosulatát és származékát, például a taxotert és hasonlókat is.

A CapxolTM annak a paklitaxel készítménynek a védjegye,

amelyet a bejelentők meghatalmazottjai hoznak forgalomba. A CapxolTM, ahogy itt használjuk, tulajdonképpen egy rövidítés, ami az 1. Példa szerinti eljárással előállított fehérjebevonatú paklitaxel nanorészecskékre utal. A CapxolTM a paklitaxel rákellenes szernek egy saját új, cremophor-mentes készítménye. A felalálók az állatkísérletek alapján úgy gondolják, hogy a cremophormentes készítmény szignifikánsan kevésbé toxikus, és nem teszi szükségessé a betegek előzetes gyógyszeres kezelését. Az előzetes gyógyszeres kezelés a túlérzékenység és anafilaxia csökkentéséhez szükséges, amit a paklitaxelt tartalmazó, jelenleg engedélyezett és forgalmazott Taxol[®] készítményben levő cremophor idéz elő. A CapxolTM egy liofilizált por, amely rekonstituálható és intravénásan adagolható. Minden CapxolTM flia 30 mg paklitaxelt és megközelítőleg 400 mg humán szérum albumint tartalmaz. Egy alkalmas vizes közeggel, például 0,9%-os injekciós nátrium-klorid-oldattal vagy 5%-os injekciós dextróz-oldattal történő rekonstitúció után a CapxolTM-ból stabil, kolloidális paklitaxel-oldat képződik. A kolloidális nanorészecskék mérete jellemzően 400 nm-nél kisebb. A nanorészecskéket USP humán szérum albumin oldatának és paklitaxel szerves oldószereivel készült oldatának nagy nyomáson végzett homogenizálásával állítjuk elő. Az oldószert ezután eltávolítjuk a paklitaxel kolloidális szuszpenziójának vagy oldatának humán albuminban történő előállítására. Ez a szuszpenzió sterilre szűrhető és liofilizálható, így kapjuk a CapxolTM-t. A készítmény más segédanyagot vagy stabilizálószeret nem tartalmaz. A termék sterilizálását az aszeptikus előállítási eljárás és/vagy a sterilre szűrés biztosítja. A CapxolTM két fő komponense a módosítatlan paklitaxel és a humán szérum albumin (HSA). Mivel a HSA vízben jól oldódik, a CapxolTM-t a paklitaxel bármilyen kívánt koncentrációjára rekonstituálhatjuk, amely koncentrációt csak a HSA oldhatósági határai korlátoznak. Így módon a CapxolTM így koncentrációhatárok között, a hígól (0,1 mg/ml paklitaxel) a töményig (20 mg/ml paklitaxel) terjedő tartományban rekonstituálható. Ez igen kis adagolási térfogatokat eredményezhet.

A jelen leírásban az "in vivo leadás" egy gyógyászati hatáson szer orális, intravénás, szubkután,

intraperitoneális, intratekális, intramuszkuláris, inhalációs, topikális, transzdermális, rektális (kúp), vaginális (pesszárium), intrauretrális, intraportális, intrahepatikus, intraarteriális, intrabunotális adagolási módon történő leadására utal.

A jelen leírásban a "mikron" a milliméter egy-ezredrészének megfelelő mértékegységre utal.

A leírásban a "biológiailag kompatibilis" meghatározás olyan anyagot jelent, amely észrevehetően nem változtatja meg vagy hat káros módon a biológiai rendszerre, amelybe bevezetik.

A lényegében vízben oldhatatlan gyógyászatiilag hatásos szerek, amelyeknek az alkalmazására a jelen táblamány gyakorlati megvalósítása során gondolunk, többek között gyógyászatiilag hatásos szerek, diagnosztikai szerek, tápértékkel rendelkező szerek és hasonlóak. A gyógyászatiilag hatásos szerekre példaként a következőket említjük:

fájdalomcsillapítók/lázcsillapítók (például aszpirin, acetaminofen, ibuprofen, naproxen-nátrium, buprenorfin-hidroklorid, propoxifén-hidroklorid, propoxifén-napszilát, meperidin-hidro-klorid, hidromorfen-hidroklorid, morfin-szulfát, oxikodon-hidro-klorid, kodein-foszfát, dihidrokódein-bitartarát, pentazocin-hidroklorid, hidrokodon-bitartarát, levorfanol-tartarát, diflu-nizál, trolamin-szalicilát, nalbufin-hidroklorid, mefenaminsav, butofanol-tartarát, kolin-szalicilát, butalbital, fenitiloxamin-citrát, difenhidramin-citrát, metotrineprazin, cinamedrin-hidroklorid, meprobamat és hasonlóak);

érzéstelenítők (például ciklopropán, enflurán, halotán, izoflurán, metoxiflurán, nitrogén-oxid, propofol és hasonlóak);

asztmaellenes szerek (például azelasztin, ketotifen, traxanox, anlexanox, kromolin, ibudilaszt, montelukaszt, nedokromil, oxatomid, pranlukaszt, seratrodaszt, szuplataaszt-tozilát, tiaramid, zafirlukaszt, zileuton, beklometazon, budezonid, dexametazon, flunizolid, trimkinolon-acetonid és hasonlóak);

antibiotikumok (például neomicin, sztreptomycin, kloramfenikol, cefalosporin, ampicillin, penicillin, tetraciklin és hasonlóak);

depresszióellenes szerek (például nefopam, oxipertin, doxe-pin-hidroklorid, amoxapin, trazodon-hidroklorid, amitriptilin-hidroklorid, maprotilin-hidroklorid, fenelzin-szulfát, dezi-pramin-hidroklorid, nortriptilin-hidroklorid, tranilcipromin-szulfát, fluoxetin-hidroklorid, doxepin-hidroklorid, imipramin-hidroklorid, imipramin-pamoát, nortriptilin, amitriptilin-hidroklorid, izokarboxazid, dezipramin-hidroklorid, trimipramin-maleát, protriptilin-hidroklorid és hasonlóak);

cukorbetegség elleni szerek (például biguanidok, hormonok, szulfonil-karbamid-származékok és hasonlóak);

gombaellenes szerek (például grizeofulvin, kelokonazol, amfotericin B, nisztatin, kandicidin és hasonlóak);

vényomáscsökkentő szerek (például propranolol, propafenon, oxiprenolol, nifedipin, reszerpin, trimetafán-kamszilát, fenoxi-benzamin-hidroklorid, pargilin-hidroklorid, deszerpidin, diazoxid, guanetidin-monoszulfát, minoxidil, reszcinamin, nátrium-nitroprusszid, rauwolfia serpentina, alszeroxilon, fentolamin-mezilát, reszerpin és hasonlóak);

gyulladásellenes szerek [például (nem-szteroid) indometa-cin, naproxen, ibuprofen, ramiifenazon, piroxikám (szteroid) kortizon, dexametazon, fluazakort, hidrokortizon, prednizon, prednizon és hasonlóak];

rákellenes szerek (például adriamicin, ciklofoszfamid,

aktinomycin, belomicin, duanorubicin, doxorubicin, epirubicin, mitomicin, metotrexát, fluoruracil, karboplatin, karmusztin (BCNU), metil-CCNU, ciszplatin, etopozid, interferonok, kamptotecin és származékai, feneszterin, paklitaxel és származékai, taxoter és származékai, vinblasztin, vinkrisztin, tamoxifen, etopozid, pipszulfán és hasonló);

szorongásgátló szerek (például lorazepán, buspiron-hidro-klorid, prazepám, klordiazepoxid-hidroklorid, oxazepám, klorazepát-dikálium, diazepám, hidroxizin-pamoát, hidroxidin-hidro-klorid, alprazolam, droperidol, halazepám, klormezanon, dantrolén és hasonló);

immunszuppresszív szerek (például ciklosporin, azatioprin, mizoribin, FK506 (takrolimus) és hasonló);

migrénellenes szerek (például ergotamin-tartarát, propranolol-hidroklorid, izometheptén-mukát, dikloralfenazon és hasonló);

altatók/hipnotikumok (például barbiturátok, így a pentobarbitál, pentobarbitál-nátrium, szekobarbitál-nátrium, benzodia-zepinek (például flurazepám-hidroklorid, triazolám, tomazepam, midazolam-hidroklorid és hasonló);

anginaellenes szerek [például béta-adrenerg blokkolók, kalcium-csatorna blokkolók (például nifedipin, diltiazem-hidroklorid és hasonló), nitrátok (például nitroglicerín, izoszorbid-dinitrát, pentaeritrit-tetranitrát, eritritil-tetranitrát) és hasonló];

antipszichotikus szerek (például haloperidol, loxapin-szukcinát, loxapin-hidroklorid, tioridazin, tioridazin-hidroklorid, tiotixén, flufenazin-hidroklorid, flufenazin-dekanoát, flufenazin-önantát, trifluoperazin-hidroklorid, klórpromazin-hidroklorid, perfenazin, lítium-citrát, proklórperazin és hasonló);

mániaellenes szerek (például lítium-karbonát);

aritmiaellenes szerek (például bretilium-tozilát, ezmolol-hidroklorid, verapamil-hidroklorid, amiodaron, encainid-hidro-klorid, digoxin, digitoxin, mexiletin-hidroklorid, dizopiramid-foszfát, prokainamid-hidroklorid, guanidin-szulfát, guanidin-glükonát, guanidin-poligalakturonát, flekainid-acetát, tokainid-hidroklorid, lidokain-hidroklorid és hasonló);

ízületi gyulladás elleni szerek (például fenilbutazon, szulindak, penicillamin, szalszalat, piroxikám, azatioprin, indometacin, meklofenamát-nátrium, arany-nátrium-tiomalát, ketoprofen, aurano-fin, aurotioglükóz, tolmetin-nátrium és hasonló);

köszvényellenes szerek (például kolchicin, allopurinol és hasonló);

alvadásgátlók (például heparin, heparin-nátrium, warfarin-nátrium és hasonló);

trombolitikus szerek (például urokináz, sztreptokináz, altepláz és hasonló);

antifibrinolitikus szerek (például aminokapronsav);

hemoreológiai szerek (például pentoxifillin);

vérelezkegátló szerek (például aszpirin, empirin, aszkriptin és hasonló);

gőrcsoldó szerek (például valproesav, divalproát-nátrium, fentoin, fentoin-nátrium, klorazepám, primidon, fenobarbitol, fenobarbitol-nátrium, karbamazepin, amobarbitál-nátrium, metszuximid, metarbitál, mefobarbitál, mefenitoin, fenszuximid, parametadion, etotoin, fenacemid, szekobarbitol-nátrium, klora-zepát-dikálium, trimetadion és hasonló);

parkinsonellenes szerek (például etoszuximid és hasonló);

antihisztaminok/antipruritikumok (például hidroxizin-hidroklorid, difenhidramin-hidroklorid, klórfeniramin-maleát, brómfeniramin-maleát, ciproheptadin-hidroklorid, terfenadin, klemasztin-fumarát, triprolidin-hidroklorid, karbinoxamin-maleát, difenilpiralin-hidroklorid, fenindamin-tartarát, azatadin-maleát, tripelemamin-hidroklorid, dexklórfeniramin-maleát, metdilazin-hidroklorid, trimprazin-tartarát és hasonló);

a kalcium szabályzására használható szerek (például kalcitonin, paratiroid hormon és hasonló);

baktériumellenes szerek (például amikacin-szulfát, aztreonám, kloramfenikol, kloramfenikol-palmitát, kloramfenikol-nátrium-szukcinát, ciprofloxacín-hidroklorid, klindamicin-hidroklorid, klindamicin-palmitát, klindamicin-foszfát, metronidazol, metronidazol-hidroklorid, genatimicin-szulfát, linkomicin-hidroklorid, tobramicin-szulfát, vankomicin-hidroklorid, polimixín-B-szulfát, kolisztimetát-nátrium, kolisztin-szulfát és hasonló);

vírusellenes szerek (például gamma-interferon, zidovudin, amantadin-hidroklorid, ribavirin, aciklovir és hasonló);

mikrobalelnes szerek [például cefalosporinok (például cefazolin-nátrium, cefradin, cefaklór, cefapirin-nátrium, ceftizoxim-nátrium, cefoperazon-nátrium, cefotetan-dinátrium, cefutxim-azotil, cefotaxim-nátrium, cefadroxil-monohidrát, ceftazidim, cefalexin, cefalotin-nátrium, cefalexin-hidroklorid-monohidrát, cefamandol-naftát, cefoxitin-nátrium, cefonicid-nátrium, ceforanid, ceftriaxon-nátrium, ceftazidim, cefadroxil, cefradin, cefuroxim-nátrium és hasonló), penicillinek (például ampicillin, amoxicillin, G penicillin-benzatin, ciklacillin, ampicillin-nátrium, G penicillin-kálium, V penicillin-kálium, piperacillin-nátrium, oxacillin-nátrium, bakampicillin-hidroklorid, kloxacillin-nátrium, tikarcillin-nátrium, azlocillin-nátrium, karbencillin-indanil-nátrium, G penicillin-kálium, G penicillin-prokain, meticillin-nátrium, nafcillin-nátrium és hasonló), eritromicin (például eritromicin-etil-szukcinát, eritromicin, eritromicin-esztoát, eritromicin-laktobionát, eritromicin-szearát, eritromicin-etil-szukcinát és hasonló), tetraciklinek (például tetraciklin-hidroklorid, doxiciklin-hiklát, minociklin-hidroklorid és hasonló) és hasonló];

fertőzés-gátló szerek (például GM-CSF);

hőrgőtágítók [például szimpatomimetikumok (például epinefrin-hidroklorid, metaproterenol-szulfát, terbutalin-szulfát, izoetarin, izoetarin-mezilát, izoetarin-hidroklorid, albuterol-szulfát, albuterol, bitolterol-mezilát, izoproterenol-hidro-klorid, terbutalin-szulfát, epinefrin-bitartarát, metaproterenol-szulfát, epinefrin, epinefrin-bitartarát), antikolinerg szerek (például ipratropium-bromid), xantinok (például amino-fillin, difillin, metaproterenol-szulfát, aminofillin), húzósejt stabilizátorok (például kromolin nátrium); inhalálható kortikoszteroidok (például flurizolid-beklometazon-dipropionát, beklometazon-dipropionát-monohidrát), szalbutamol, beklometazon-dipropionát (BDP), ipratropium-bromid, budezonid, ketotifen, szalmeterol, xinafoát, terbutalin-szulfát, triamkinolon, teofilin, nedokromil-nátrium, metaproterenol-szulfát, albuterol, flunizolid és hasonló);

hormonok [például androgének (például danazol, tesztoszteron-cipionát, fluoximeszteron, etil-tesztoszteron, tesztoszteron-enanhiát, metiltesztoszteron, fluoximeszteron, tesztoszteron-cipionát), ösztrogének (például ösztradiol, ösztropipát, konjugált ösztrogének), progesztinek (például metoxiprogesztinon-acetát, noretindron-acetát), kortikoszteroidok (például triamkinolon, betametazon, betametazon-nátrium-foszfát, dexametazon, dexametazon-nátrium-foszfát, dexametazon-acetát, prednizon, metilprednizolon-acetát szuszpen-

zió, triamkinolon-acetonid, metilprednizolon, prednizolon-nátrium-foszfát, metilprednizolon-nátrium-szukcinát, hidrokortizon-nátrium-szukcinát, metilprednizolon-nátrium-szukcinát, triamkinolon-hexaketonid, hidrokortizon, hidrokortizon-cipionát, prednizolon, fluorokortizon-acetát, parametazon-acetát, prednizolon-tebulát, prednizolon-acetát, prednizolon-nátrium-foszfát, hidrokortizon-nátrium-szukcinát és hasonló), tiroid hormonok (például levotiroxin-nátrium és hasonló) és hasonló);

hipoglikémiás szerek (például humán inzulin, tisztított marha inzulin, tisztított sertés inzulin, gliburid, klorpropanid, glipizid, tolbutamid, tolazamid és hasonló);

hipolipidémiás szerek (például klofibrát, dextrotiroxin-nátrium, probukol, lovasztatin, niacin és hasonló);

fehérjék (például DNáz, algináz, szuperoxid dizmutáz, lipáz és hasonló);

nukleinsavak (például szenz vagy antiszensz nukleinsavak, amelyek bármely terápiásan hasznos fehérjét kódolnak, ezen belül az itt leírt fehérjéket, és hasonló);

vörösvérsejtképzés stimulálására alkalmas szerek (például eritropoietin);

fekélyellenes/refluxellenes szerek (például famitidin, cimetidin, ranitidin-hidroklorid és hasonló);

émelygésellenes/hányásellenes szerek (például meklizin-hidroklorid, nabilon, proklorperazin, dimenhidrinát, prometazin-hidroklorid, tietilperazin, szkopolamin és hasonló);

olajban oldódó vitaminok (például A, D, E, K vitaminok és hasonló); és

más gyógyszerek, így mitotán, vizadin, halonitrozokarbamidok, antrociklinek, ellipticin és hasonló.

A diagnosztikai szerek, amelyek a jelen találmány gyakorlati megvalósításánál használhatók, például az ultrahang-kontrasztanyagok, radiokontrasztanyagok (például jódoktánok, halokarbonok, renografin és hasonló), mágneses kontrasztszerek (például fluorkarbonok, zsírolldó paramágneses vegyületek és hasonló), valamint más diagnosztikai szerek, amelyek bizonyos fizikai és/vagy kémiai módosítás nélkül nem adagolhatók a lényegében vízben való oldhatatlanságuk miatt.

A tápláló értékkel rendelkező szerekre, amelyek a jelen találmány gyakorlati megvalósítása során alkalmazhatók, példaként az aminosavakat, cukrokat, fehérjéket, szénhidrátokat, zsírolldó vitaminokat (például az A, D, E, K vitamint és hasonlókat) vagy zsírt, vagy a fentiek közül bármelyik kettőnek vagy többnek a kombinációját említjük.

A) Nanorészecskék előállítása nagynyírású homogenizálással

A döntő különbség a találmány szerinti polimer burokból levő gyógyászati hatóanyagok és a technika állásához tartozó fehérje mikrogömbök között a készítmény természetében és a fehérjének a részecskéképzés utáni állapotában és abban van, hogy képes vízben rosszul oldódó vagy lényegében vízben oldhatatlan szereket hordozni. A jelen találmánnyal összhangban a polimer (például egy fehérje) téhálósítható a nagynyírású körülmények következtében egy nagynyomású homogenizálóban. A nagy nyírást egy gyógyászati hatóanyag szert oldott vagy szuszpendált formában tartalmazó diszpergáló szernek egy biokompatibilis polimer vizes oldatába történő diszpergálására alkalmazzuk, amely polimer kívánt esetben szulfhidril- vagy diszulfid-csoportokat hordoz (például az albumin), ezáltal a nem-vizes közeg finom cseppjei körül egy téhálós polimer burok alakul ki. A

nagynyírású körülmények a folyadékban kavitációt hoz létre, ami roppant nagy helyi felmelegedést okoz, és szuperoxid ionok képződését eredményezi, amelyek képesek a polimer, például a szulfidrilcsoportok oxidálása (és/vagy a meglévő diszulfidkötések szétszakítása) révén új, keresztkapcsolású diszulfid kötések kialakítani.

A találmány szerinti eljárással szemben a technika állása szerinti glutáraldehid térhálósító eljárás nem specifikus, és az aldehid lényegében bármilyen, a fehérje-szerkezetben jelenlevő nukleofil csoporttal (például amino- és hidroxilcsoportokkal) képes reagálni. A hő hatására bekövetkező denaturálódás a technika állása szerint jelentősen és visszafordíthatatlanul megváltoztatja a fehérje-szerkezetet. Ezzel szemben, a jelen találmány szerinti diszulfidképzés lényegesen nem denaturálja a fehérjét. Emellett a lényegében vízdoldhatatlan gyógyászatilag hatásos szerek részecskéi, amelyek a burokban találhatók, különböznek a technika állása szerinti térhálósított vagy hővel denaturált fehérje mikrogömböktől, mivel a jelen találmány szerinti eljárással előállított polimer burok a bevont részecske átmérőjéhez viszonyítva aránylag vékony. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálattal megállapítottuk, hogy a polimer bevonat "burokvastagsága" megközelítőleg 25 nanométer egy 1 mikronos (1000 nanométeres) bevont részecske esetén. Ezzel szemben a technika állása szerinti mikrogömböknek nincs fehérje-burkuk, hanem inkább a mikrogömb belsejében van a fehérje diszpergálva.

Így, a jelen találmánnyal összhangban egy gyógyászatilag hatásos szert alkalmas oldószerben (például kloroformban, metilén-dikloridban, etil-acetáthban, etanolban, tetrahydrofuránban, dioxánban, butanolban, butil-acetáthban, acetonnitrilben, acetonban, dimetil-szulfoxidban, dimetil-formamidban, metil-pirrolidinonban vagy hasonlóban, valamint a fentiek közül kettőnek vagy többnek az elegyében) oldunk. A jelen találmány gyakorlati megvalósítása során alkalmasnak tartott további oldószerek többek között a szójaolaj, kókuszdióolaj, olívaolaj, sáfrányolaj, gyapotmagolaj, szézámolaj, narancsolaj, limonénolaj, 1-20 szénatomos alkoholok, 2-20 szénatomos észterek, 3-20 szénatomos ketonok, polietilén-glikolok, alifás szénhidrogének, aromás szénhidrogének, halogénezett szénhidrogének és ezek kombinációi.

A nanorészecskék hagyományos előállítási eljárásától eltérően egy polimert (például politejsavat) nem oldunk az oldószerben. A találmány szerinti készítmények előállításánál alkalmazott olajfázis jellemzően csak a gyógyászatilag hatásos szert tartalmazza oldószerben oldva.

Ezután, egy fehérjét (például humán szérum albumint) adunk a vizes fázisba azért, hogy stabilizálószerként működjön közre stabil nanocseppecskék képződésénél. A fehérjét körülbelül 0,05-25 tömeg/térfogat%-ban, előnyösebben 0,5-5 tömeg/térfogat%-ban alkalmazzuk. A nanorészecskék hagyományos előállítási eljárásától eltérően felületaktív anyagot (például nátrium-lauril-szulfátot, lecitint, Tween 80-t, pluronic F-68-t és hasonlókat) nem adunk az elegyhez.

Ezt követően nagy nyomás és nagy nyíró erők hatása alatt végzett homogenizálással emulziót képzünk. Az ilyen homogenizálást kényelmesen egy nagynyomású homogenizálóban valósítjuk meg, amely körülbelül 20,69-413,7 MPa nyomástartományban működik. Előnyösen az ilyen eljárásokat körülbelül 41,37 és 275,8 MPa közötti nyomáson valósítjuk meg. A képződött emulzió a nemvizes oldószer (amely az oldott gyógyászatilag hatásos szert tartalmazza) nagyon kicsi nanocseppecskéit és a fehérje stabilizálószer nagyon kicsi nanocseppecskéit tartalmazza. A homogenizálás elfogadott módszerei többek között a nagy nyíró erőt és kavitációt átvivő, így nagynyomású homogenizálást, nagynyírású keverést, szonikálást, nagynyírású keverőlapátokat és hasonlókat alkalmazó eljárások.

Végül, az oldószert csökkentett nyomáson lepároljuk, így egy kolloidális rendszer alakul ki, amely a gyógyászatilag hatásos szer fehérjével bevont nanorészecskéit és fehérjét tartalmaz. A bepárlás elfogadott módszerei a forgó bepárlók, filmbepárlók, permetezve szárítók, fagyaszíva szárítók és hasonló alkalmazását foglalják magukban. Ultraszűrés szintén használható az oldószer eltávolítására.

Az oldószer lepárlása után a folyékony szuszpenziót megsűrítjük, így gyógyászatilag hatásos szert és fehérjét tartalmazó port kapunk. A képződött port bármelyik alkalmas időpontban egy megfelelő vizes közegben, így sóoldatban, puffertelt sóoldatban, vízben, puffertelt vizes közegben, aminosavak oldataiban, vitaminok oldataiban, szénhidrátok oldataiban vagy hasonlóban, valamint a fentiek közül kettőnek vagy többnek bármilyen kombinációjában ismételten diszpergálhatjuk, így emulósoknak adagolható szuszpenziót kapunk. A por előállítására alkalmasnak tartott módszerek például a fagyaszíva szárítás vagy a permetezve szárítás.

A jelen találmány egy másik megvalósítási módjának megfelelően egy másik eljárást bocsátunk rendelkezésre szokatlanul kicsi szubmikron részecskék (nanorészecskék), azaz olyan részecskék előállítására, amelyeknek átmérője 200 nanométernél kisebb. Az ilyen részecskék folyékony szuszpenzió formájában való felhasználás előtti sterilre szűrhetők. Nagy jelentősége van annak, hogy a találmány szerinti előállítási eljárás végterméke, azaz a hatóanyag-részecskék sterilre szűrhetők, mivel fehérjét (például szérum albumint) nagy koncentrációban tartalmazó diszperziók sterilizése a szokásos eljárásokkal, így autoklávozással lehetetlen.

Annak érdekében, hogy sterilre szűrhető (azaz 200 nm-nél kisebb részecskéket) kapjunk, a gyógyászatilag hatásos szerből először egy lényegében vízzel nem elegyedő szerves oldószerben (például egy olyan oldószerben, amelynek a vízben való oldhatósága körülbelül 5%-nál kisebb, ilyen például a kloroform) nagy koncentrációjú oldatot készítünk, ezáltal egy olajfázis képződik, amely a gyógyászatilag hatásos szert tartalmazza. Alkalmas oldószereket már az előzőekben felsoroltunk. A nanorészecskék hagyományos előállítási eljárásaitól eltérően egy polimert (például politejsavat) nem oldunk az oldószerben. A jelen találmány szerinti eljárásban alkalmazott olajfázis csak az oldószerben oldott gyógyászatilag hatásos szert tartalmazza.

Ezután egy vízzel elegyedő szerves oldószert (például egy olyan oldószert, amelynek körülbelül 10%-nál nagyobb az oldékonysága vízben, például etanolt) adunk az olaj fázishoz körülbelül 1 és körülbelül 99, előnyösebben 5 és 25 térfogat% közötti végkoncentrációban a teljes szerves fázisra számítva. A vízzel elegyedő szerves oldószert például az etil-acetát, etanol, tetrahidrofurán, dioxán, acetonitril, butanol, aceton, propilén-glikol, glicerin, dimetil-szulfoxid, dimetil-formamid, metilpirrolidinon és hasonlók közül választjuk. Más esetben a vízzel nemelegyedő oldószer és a vízzel elegyedő oldószer elegyét állítjuk először elő, majd a gyógyászatilag hatásos szert az elegyben oldjuk.

Ezután humán szérum albumint vagy bármilyen más alkalmas, fentebb leírt stabilizálószerrel vízes közegben oldunk. Ez a komponens működik stabilizálószerként a stabil nanocseppecskék képződésénél. Kivánt esetben az első szerves oldószer (például kloroform) megfelelő mennyiségét oldjuk a vízes fázisban a telítési koncentrációhoz közeli koncentráció elérésére. A szerves fázisnak (amely mostmár a gyógyászatilag hatásos szert, az első szerves oldószert és a második szerves oldószert tartalmazza) egy külön, mért mennyiségét adjuk a telített vízes fázishoz, úgyhogy a szerves fázis fázisfrakciója körülbelül 0,5 és 15 térfogat%, előnyösebben 1 és 8 térfogat% közötti.

Ezután alacsony nyíró erővel végzett homogenizálással mikro- és nanocseppecskékből álló keveréket ál-

litunk elő. Ez különféle módon, amelyeket a szakemberek jól ismernek, például hagyományos laboratóriumi homogenizátorokkal történhet, amelyek körülbelül 2000 és körülbelül 15 000 rpm közötti tartományban működnek. Ezután következik a nagy (azaz a körülbelül 20,68 és 413,7 MPa közötti) nyomáson végzett homogenizálás. A kapott elegy egy fehérje (például humán szérum albumin) vizes oldatából, a vízben oldhatatlan gyógyászati hatóanyagból, az első oldószerből és a második oldószerből áll. Végül az oldószert vákuumban gyorsan lepároljuk, így egy kolloid diszperz rendszer képződik, amely gyógyászati hatóanyagot és fehérjét tartalmaz rendkívül kicsi nanorészecskék (azaz körülbelül 10 nm és 200 nm közötti átmérőjű részecskék) formájában, amely rendszer sterilre szűrhető. A részecskék előnyös mérettartománya körülbelül 50-170 nm, a készítménytől és a működtetési paraméterektől függően.

A jelen találmány szerint előállított kolloid rendszereket a bennük levő víz eltávolításával, például liofilizálással vagy permetezve szárítással megfelelő hőmérséklet-idő profil mellett por alakba hozhatjuk. A fehérje (például a humán szérum albumin) maga krioprotektív vagy liooprotektív hatású anyagként működik, és a por víz, sóoldat vagy puffer hozzáadásával, a szokásos krioprotektív anyagok, például mannit, szacharóz vagy glicin alkalmazása nélkül könnyen rekonstituálható. Noha nem feltétlenül szükséges, kívánt esetben természetesen adhatunk hagyományos krioprotektív szereket a találmány szerinti készítményekhez.

A gyógyászati hatóanyag szer kolloid rendszere lehetővé teszi a gyógyászati hatóanyag aránylag kis térfogatban, nagy dózisokban történő adagolását. Ez a nagy dózis és az aránylag kis térfogatban történő adagolás minimálisra csökkenti a betegnek a nagy folyadéktérfogatok adagolásával járó kényelmetlenségét és minimálisra csökkenti a kórházi tartózkodást. Emellett a polimer burrok vagy bevonat fala proteolitikus enzimek (amikor például a polimer fehérje) által *in vivo* általában teljesen lebontható, emiatt a leadórendszerből lényegében semmilyen mellékhatás nem származik, ami éles ellentétben van a jelenleg alkalmazott készítmények által okozott jelentős mellékhatásokkal.

Számos biokompatibilis polimer alkalmazható a jelen találmány gyakorlati megvalósításában a lényegében vízben oldhatatlan gyógyászati hatóanyag szereket körülvevő polimer burrok előállítására. Lényegében bármely, természetes vagy szintetikus polimer, amely adott esetben szulfhidril-csoportokat vagy diszulfid kötések hordoz a szerkezetében, használható a lényegében vízben oldhatatlan gyógyászati hatóanyag szer körüli diszulfidkötésekkel térhálósított burrok előállítására. A szulfhidrilcsoportok vagy diszulfid kötések már a polimer szerkezetben eleve benne lehetnek vagy alkalmas kémiai módosítással bevezethetők. Például az olyan természetes polimerek, mint a fehérjék, peptidok, polinukleinsavak, poliszacharidok (például keményítő, cellulóz, dextránok, alginátok, kitozán, pektin, hialuronsav), proteoglikánok, lipoproteinek és hasonlóak a jelöltek az ilyen módosításra.

A jelen találmány szerint stabilizálószerként használható fehérjék többek között az albuminok (amelyek 35 ciszteincsoportot tartalmaznak), az immunoglobulinok, kazeinek, inzulinok (amelyek 6 ciszteincsoportot tartalmaznak), hemoglobinek (amelyek 6 ciszteincsoportot tartalmaznak $\alpha_2\beta_2$ egységenként), lizozimek (amelyek 8 ciszteincsoportot tartalmaznak), immunoglobulinok, alfa-2-makroglobulin, fibronectinek, vitronectinek, fibrinogének, lipázok és hasonlóak. A fehérjék, peptidok, enzimek, anti-testek és ezek kombinációi képezik azoknak a stabilizátoroknak a csoportjait, amelyeket a jelen találmányban alkalmazni szándékozunk.

Egy stabilizáló szerként jelenleg előnyösnek tartott fehérje az albumin. Kívánt esetben olyan fehérjék,

mint az alfa-2-makroglobulin, amely egy ismert opszonin, használhatók a burokba foglalt, lényegében vízben oldhatatlan gyógyszerileg hatásos szerek a makrofágyszerű sejtek általi felvételének növelésére, vagy a burokba foglalt részecskének a máj és lép általi felvételének növelésére. Specifikus antitestek szintén használhatók a nanorészecskének a specifikus helyekre történő irányítására. További funkcionális fehérjék, így antitestek vagy enzimek, amelyek elősegíthetik a biológiai szerek a kívánt helyre történő jutását, szintén használhatók a stabilizáló fehérje komponenseként.

A szintetikus polimerek hasonlóképpen jó jelöltek polimer burokkal rendelkező részecskék előállítására. Emellett polialkilénglikolok (például egyenes vagy elágazó láncúak), polivinil-alkohol, poliakrilátok, polihidroxiethylmetakrilátok, poliakrilsav, polietiloxazolin, poliakrilamidok, polizopropilakrilamidok, polivinil-pirrolidon, polilaktid/glikolid és hasonlóak, továbbá ezek kombinációi is szóba jöhetnek a találmány szerinti készítményben biokompatibilis polimerként.

A lényegében vízben oldhatatlan gyógyszerileg hatásos szerek stabilizálására szintetikus polipeptidok is jól használhatók. Emellett a jelen találmány gyakorlati megvalósításában olyan anyagokat is alkalmazhatónak találunk, mint a ciszteinscsoportokat és/vagy diszulfidcsoportokat tartalmazó szintetikus poliaminosavak; szabad szulfhidrilcsoportokkal és/vagy diszulfidcsoportokkal módosított polivinilalkohol; szabad szulfhidrilcsoportokkal és/vagy diszulfidcsoportokkal módosított polihidroxiethyl-metakrilát; szabad szulfhidrilcsoportokkal és/vagy diszulfidcsoportokkal módosított poliakrilsav; szabad szulfhidrilcsoportokkal és/vagy diszulfidcsoportokkal módosított polietil-oxazolin; szabad szulfhidrilcsoportokkal és/vagy diszulfidcsoportokkal módosított poliakrilamid; szabad szulfhidrilcsoportokkal és/vagy diszulfidcsoportokkal módosított polivinilpirrolidion; szabad szulfhidrilcsoportokkal és/vagy diszulfidcsoportokkal módosított polialkilénglikolok; szabad szulfhidrilcsoportokkal és/vagy diszulfidcsoportokkal módosított polilaktidok, poliglikolidok, polikaprolaktonok vagy ezek kopolimerjei; vagy a fentiek közül kettőnek vagy többnek a keveréke.

A találmány szerinti készítmények előállításánál a lényegében vízben oldhatatlan gyógyszerileg hatásos szer szuszpendálására vagy oldására a szerves közegek széles választéka alkalmazható. A jelen találmány gyakorlati megvalósítására szóba jövő szerves közeg bármilyen nemvízes foyadék lehet, amely a gyógyszerileg hatásos szert szuszpendálni vagy oldani képes, de kémiaiilag nem reagál sem a burok kialakításához használt polimerrel, sem magával a gyógyszerileg hatásos szerrel. Példaként a növény olajokat (például a szójaolajat, olívaolajat és hasonlókat), a kókuszdióolajat, a sáfrányolajat, gyapotmagolajat, szezámolajat, narancsolajat, limonénolajat, a 4-30 szénatomos alifás, cikloalifás vagy aromás szénhidrogéneket (például a n-dodekánt, n-dekánt, n-hexánt, ciklohexánt, toluolt, benzolt és hasonlókat), a 2-30 szénatomos alifás vagy aromás alkoholo-kat (például az oktanoolt és hasonlókat), a 2-30 szénatomos alifás vagy aromás észtereket (például az etil-kaprilátot (oktanoátot) és hasonlókat), a 2-30 szénatomos alkil-, aril- vagy gyűrűs étereket (például a dietil-étert, tetrahydrofuránt és hasonlókat), az 1-30 szénatomos alkil- vagy aril-halogenideket (és adott esetben egynél több halogénhelyettesítőt tartalmazó vegyületeket, például a klórmétánt, diklórmétánt, az 1,2-diklór-etánt és hasonlókat), a 3-30 szénatomos ketonokat (például az acetont, metil-etil-ketont és hasonlókat), a polialkilénglikolokat (például a polietilénglikolt és hasonlókat) vagy ezek közül kettőnek vagy többnek a kombinációját említjük.

A jelen találmány gyakorlati megvalósításában való alkalmazásra számításba jöhető szerves közegek különösen előnyös kombinációi azok, amelyeknek a forráspontja jellemzően körülbelül 200°C-nál nem magasabb,

és illékony komponenseket, így diklórmetánt, kloroformot, etil-acetátot, benzolt, etanolt, butanolt, butil-acetátot és hasonlókat (azaz olyan oldószereket, amelyekben a gyógyászatilag hatásos szer nagy mértékben oldódik és amelyek oldódnak az alkalmazott másik szerves közegben) és nagyobb molekulatömegű (kevésbé illékony) szerves közeget foglalnak magukban. Amikor ezeket a másik szerves közeghez adjuk, az illékony adalékok javítják a gyógyászatilag hatásos szernek a szerves közegben való oldhatóságát. Ez kívánatos, mivel ez a lépés általában időigényes. Az oldódást követően az illékony komponenst lepárlással (kívánt esetben vákuumban) eltávolíthatjuk.

A gyógyászatilag hatásos szer részecskéi, amelyek polimer burokkal vannak ellátva, és a fenti módon kerülnek előállításra, egy biokompatibilis vizes folyadékban szuszpenzióként kerülnek felhasználásra. Ezt a folyadékot víz, sóoldat, megfelelő pufferekkel tartalmazó oldat, tápláló szereket, így aminosavakat, cukrokat, fehérjéket, szénhidrátokat, vitaminokat vagy zsírt tartalmazó oldatok és hasonlóak közül választjuk.

Ezeket a biokompatibilis anyagokat különféle fizikai formákban, így térhálós vagy nem térhálós gélként is alkalmazhatjuk, amely olyan mátrixot biztosít, amelyből a gyógyászatilag hatásos komponens, például a paklitaxel diffúzió és/vagy a mátrix lebomlása révén szabadul fel. Hőérzékeny anyagokat is használhatunk diszpergáló mátrixként a találmány szerinti készítményben. Ily módon a Capxol™ egy hőérzékeny anyagot (például poliakrilamidok kopolimerjeit vagy polialkilénglikolok és polilaktid/glikolidok kopolimerjeit) tartalmazó folyékony készítményben is injektálható, amely gél a tumor helyén a Capxol™ lassú felszabadulását biztosítja. A Capxol™ készítmény a fentebb említett biokompatibilis polimer mátrixába is diszpergálható, ami egy szabályozott hatóanyagleadású paklitaxel készítményt biztosít, amely a Capxol™ készítmény (albumin paklitaxellel társítva) tulajdonságai révén az agyszövetek szempontjából csökkent toxicitást, valamint kisebb szisztémás toxicitást eredményez, amint azt az alábbiakban tárgyaljuk. A Capxol™ ezen kombinációja vagy a Capxol™-hoz hasonlóan formulált más kemoterápiás szerek a biokompatibilis polimer mátrixszal együtt alkalmasak lehetnek a kemoterápiás szerek szabályozott helyi leadására az agyban és a medencében levő szilárd tumorok (petefészekrák) kezelésére, és más szilárd tumorok helyi kezelésére. Ezek a kombinációs készítmények nem korlátozódnak a paklitaxel alkalmazására, hanem a gyógyászatilag hatásos komponensek széles körénél, ezen belül fertőzésgátlók, immunuszuppresszív szerek és más kemoterápiás szerek és hasonlóak esetében is használhatók.

A kolloid részecskéket, amelyek lényegében teljesen egy polimer stabilizáló rétegen belül vannak vagy azzal társulnak, és amelyeket az itt leírt módon állítunk elő, tisztán vagy kívánt esetben egy biokompatibilis közeggel készült szuszpenzió formájában adagolhatók. Ezt a közeget víz, pufferezt vizes közegek, sóoldat, pufferezt sóoldat, aminosavak kívánt esetben pufferezt oldatai, fehérjék kívánt esetben pufferezt oldatai, cukrok kívánt esetben pufferezt oldatai, szénhidrogének kívánt esetben pufferezt oldatai, vitaminok kívánt esetben pufferezt oldatai, szintetikus polimerek kívánt esetben pufferezt oldatai, lipídtartalmú emulziók és hasonlóak közül választjuk.

Emellett a kolloidális részecskéket kívánt esetben megfelelő szerrel módosíthatjuk, ahol a szer a polimer réteghez egy tetszőleges kovalens kötésen keresztül kapcsolódik. Az ilyen kapcsolatok esetében számításba jöhető kötés az észter, éter, uretán, diészter, amid, szekunder vagy tercier amin, foszfát-észter, szulfát-észter és hasonló kötés lehet. Megfelelő szerek, amelyekkel a polimer buroknak ez a tetszés szerinti módosítása megvalósítható, például a szintetikus polimerek [polialkilénglikolok (például az egyenes vagy elágazó láncú polietilén-

glikol), polivinilalkohol, polihidroxietilmetakrilát, poliakrilsav, polietiloxazolin, poliakrilamid, polivinil-pirrolidinon és hasonló), foszfolipidek (például foszfatidil-kolin (PC), foszfatidil-etanolamin (PE), foszfatidil-inozit (PI), szfingo-mielin és hasonló), fehérjék (így enzimek, antitestek és hasonló), poliszacharidok (például keményítő, cellulóz, dextránok, alginátok, káozán, pektin, hialuronsav és hasonló), kémiai módosító szerek (így például piridoxál-5'-foszfát, piridoxál-származékok, dialdehidek, diaszpirin-észterek és hasonló) vagy a fentiek közül bármely kettőnek vagy többnek a kombinációja.

A stabilizált kolloidális részecskék általános témájára variációik lehetségesek. Egy gyógyhatású szer fő-
 nom részecskéinek egy biokompatibilis diszpergáló szerben készült szuszpenziója (egy oldott biológiai anyagot
 tartalmazó biokompatibilis diszpergáló szer helyett) alkalmazható egy olyan polimer burok kialakítására, amely
 a biológiai anyag diszpergálószerben szuszpendált részecskéit tartalmazza. Más szóval, a polimer burok tartal-
 mazhatja egy biológiai anyag diszpergálószerrel készült telített oldatát. Egy másik variáció az, amikor a polimer
 burok egy biológiai anyagból álló szilárd magot tartalmaz, amely úgy készül, hogy a biológiai anyagot először
 egy illékony szerves oldószerben (például benzolban) oldjuk, ezután kialakítjuk a polimer burkot, és vákuumban
 lepároljuk az illékony oldószert például egy lepárlóban, permetezve szárító vagy fagyasztva szárító készülékben,
 így egy szuszpenziót kapunk. Ez olyan szerkezetet eredményez, amelyben a biológiai anyagból álló szilárd ma-
 got egy polimer bevonat veszi körül. Ez utóbbi módszer különösen alkalmas biológiai anyagok nagy dózisainak
 aránylag kis térfogatban történő adagolására. Bizonyos esetekben a biokompatibilis anyag, amely a mag körül a
 burkot alkotja, maga is lehet terápiás vagy diagnosztikai szer, például az inzulin esetében, amelyet a fentebb leírt
 eljárással előállított polimer burok részeként adhatunk be. Egy másik esetben a burkot képező polimer részt ve-
 het a biológiai anyag, például a célbajuttatáshoz használt antitestek szállításában, vagy a hemoglobin esetében,
 amely a fentebb leírt ultrahangos besugárzási eljárásban képződött polimer burok részeként adagolható, ezáltal
 egy vérhelyettesítőt biztosít, amelynek nagy az oxigénmegkötő képessége.

A szakemberek felismerik, hogy a találmány ezen vonatkozásának körében és szellemében több variáció
 lehetséges. A polimer burkon belüli szerves közeg változtatható, a gyógyszeratilag hatásos szerek széles köre al-
 kalmazható, és fehérjék, valamint más természetes és szintetikus szerek használhatók a polimer burok falának a
 kialakításában. Az alkalmazások is igen változatosak. Az orvosi biológiai alkalmazásoktól, így a hatóanyagok, di-
 agnosztikai szerek (leképező alkalmazásokhoz), mesterséges vér és parenterális tápláló szerek adagolásától eltérő-
 rően, a találmány szerinti polimer burok szerkezetek kozmetikai készítményekbe, így bőrkremekbe vagy hajápo-
 ló termékekbe, illatszeripari készítményekbe, nyomásérzékelő tintákba és hasonlóba foglalhatók.

A találmány ezen vonatkozását a következő, nem korlátozó példákra való utalással nagyobb részletessé-
 gel írjuk le.

1. Példa

Nanorészecskék előállítása nagy nyomáson végzett homogenizálással

30 mg paklitaxel 3,0 ml metilén-dikloridban oldunk. Az oldatot 27,0 ml 1 tömeg/térfogat%-os humán
 szérum albumin-oldathoz adjuk. Az elegyet 5 percig alacsony fordulatszám mellett (Vitris homogenizátor, mo-
 dell: Tempest LQ.) homogenizáljuk egy nyers emulzió előállítására, és azután átviszük egy nagynyomású
 homogenizátorba (Avestin). Az emulgeálást 62-275,8 MPa nyomáson végezzük, miközben az emulziót legalább
 5 ciklusban visszavezetjük. A képződött rendszert átvisszük egy forgó bepárlókészülékbe, és a metilén-

-dikloridot 40°C-on, csökkentett (3,99 kPa) nyomáson gyorsan, 20-30 perc alatt eltávolítjuk. A kialakult diszperzió áttetsző, és a képződött paklitaxel részecskék jellemző átmérője 160-220 nm (Z-átlag, Malvern Zetasizer).

A diszperziót 48 órán át tovább liofilizáljuk krioprotektív anyag hozzáadása nélkül. A képződött pogácsa könnyen rekonstituálható az eredeti diszperzióvá steril víz vagy sóoldat hozzáadásával. A részecskeméret a rekonstitúció után azonos a liofilizálás előttivel.

2. Példa

Hagyományos felületaktív anyagok és fehérjék alkalmazása nagy kristályok képződéséhez vezet

A következő példa szemlélteti olyan hozzáadott felületaktív anyagok hatását, amelyeket a hagyományos bepárlási eljárásban alkalmaznak. Egy sor kísérletet végeztünk el az 1. példában leírthoz hasonló eljárás alkalmazásával, de a szerves oldószerhez (1-10%) Tween 80 felületaktív anyagot adtunk. Azt találtuk, hogy a metilén-diklorid eltávolítása után nagyszámú paklitaxel kristályt kaptunk, amelyek átlagos mérete 1-2 mikron volt, amint azt fénymikroszkóp segítségével és polarizált fényben megnéztük. A kristályok néhány óra alatt nagyon nagy tűkristályokká nőttek, amelyek mérete körülbelül 5-15 mikron volt. Hasonló jelenséget figyeltünk meg más gyakran használt felületaktív anyag, így a Pluronic F-68, Pluronic F-127, Cremophor EL és a Brij 58 alkalmazásakor is.

Ezekből az eredményekből arra a következtetésre juthatunk, hogy a hagyományos oldószerlepárlási eljárások, amelyek hagyományos felületaktív anyagokat használnak egy fehérjével, így albuminnal kombinációban, nem alkalmasak szubmikron hatóanyag-részecskék (például paklitaxel) polimer mag nélküli előállítására, poláris oldószer (például metilén-diklorid) alkalmazásakor.

3. Példa

Hagyományos felületaktív anyagok önmagában való alkalmazása nagy kristályok képződéséhez vezet

Ez a példa azt szemlélteti, hogy nem lehetséges nanorészecskéket előállítani hagyományos felületaktív anyagok alkalmazásával polimer maganyag nélkül olyan farmakológiai hatóanyag esetében, amelyek poláris, vízzel nem elegyedő oldószerekben (például kloroformban) oldódnak.

30 mg paklitaxelt 0,55 ml kloroformban és 0,05 ml etanolban oldunk. Az oldatot 29,4 ml 1 tömeg/térfogat%-os Tween 80-oldathoz adjuk, amelyet előzőleg 1% kloroformmal telítettünk. Az elegyet 5 percig kis fordulatszám mellett (Vitrís homogenizátor, modell: Tempest I.Q.) homogenizáljuk egy nyers emulzió előállítására, majd az elegyet egy nagynyomású homogenizátorba (Avestin) visszük át. Az emulgeálást 62-275,8 MPa nyomáson végezzük, miközben az emulziót legalább 6 ciklusra visszavezetjük. A kialakult rendszert egy forgó bepárlókészülékbe visszük át, és a kloroformot 40°C-on, csökkentett (3,99 kPa) nyomáson gyorsan, 15-30 perc alatt eltávolítjuk. A képződött diszperzió átlátszatlan, és a hatóanyag nagy, tűalakú kristályait tartalmazza. A kristályok kezdeti mérete (polarizált fényben is megfigyelve) 0,7-5 mikron. A diszperziót néhány órán át szobahőmérsékleten tároljuk, ezalatt a kristályok mérete tovább nő, és végül csapadék képződik.

4. Példa

200 nm-nél kisebb, sterilre szűrhető nanorészecskék előállítása

Ez a példa egy olyan eljárást ír le, amellyel sterilre szűrhető hatóanyag részecskék kaphatók. Így 30 mg paklitaxelt 0,55 ml kloroformban és 0,05 ml etanolban oldunk. Az oldatot 29,4 ml 1 tömeg/térfogat%-os humán

szérum albumin-oldathoz adjuk, amelyet előzőleg 1% kloroformmal telítettünk. Az elegyet 5 percig alacsony fordulatszám mellett (Vitrís homogenizátor, modell: Tempest I.Q.) homogenizáljuk egy nyers emulzió előállítására, majd egy nagynyomású homogenizátorba (Avestin) visszük át. Az emulgeálást 62-275,8 MPa nyomáson végezzük, miközben az emulziót legalább 6 ciklusra visszavezetjük. A kialakult rendszert forgó bepárlókészülékbe visszük át, és a kloroformot 40°C-on, csökkentett (3,99 kPa) nyomáson gyorsan, 15-30 perc alatt eltávolítjuk. A kialakult diszperzió áttetsző, és a képződött részecskék jellemző átmérője 140-160 nm (Z-átlag, Malvern ZetaSizer). A diszperziót egy 0,22 mikronos (Millipore) szűrőn át szűrjük anélkül, hogy a zavarosságban vagy a részecskeméretben lényeges változás következne be. A paklitaxel-tartalom HPLC analízise szerint szűrés után a paklitaxel több mint 97%-a megmaradt, így steril paklitaxel diszperziót kapunk.

A steril diszperziót 48 órán át tovább liofilizáljuk bármilyen krioprotektív anyag hozzáadása nélkül. A kialakult pogácsa steril vízzel vagy sóoldattal könnyen az eredeti diszperzióvá alakítható vissza. A részecskeméret a rekonstitúció után azonos a liofilizálás előttivel.

5. Példa

200 nm-nél kisebb méretű sterilre szűrhető nanorészecskék előállítása

Ez a példa egy olyan eljárást ír le, amellyel sterilre szűrhető hatóanyag-részecskék kaphatók.

225 mg paklitaxelt 2,7 ml kloroform és 0,3 ml etanol elegyében oldunk. Az oldatot 97 ml 3 tömeg/térfogat%-os humán szérum albumin-oldathoz adjuk. Az elegyet 5 percig alacsony fordulatszám mellett (Vitrís homogenizátor, modell: Tempest I.Q.) homogenizáljuk egy nyers emulzió előállítására, amelyet azután egy nagynyomású homogenizátorba (Avestin) viszünk át. Az emulgeálást 62-275,8 MPa nyomáson végezzük, miközben az emulziót legalább 6 ciklusra visszavezetjük. A kialakult rendszert egy forgó bepárlókészülékbe visszük át, és a kloroformot 40°C-on, csökkentett (3,99 kPa) nyomáson, gyorsan, 15-30 perc alatt eltávolítjuk. A kialakult diszperzió áttetsző, és a képződött részecskék jellemző átmérője 140-160 nm (Z-átlag, Malvern ZetaSizer). A diszperziót egy 0,22 mikronos szűrőn (Sartorius, Sartobran 300) át szűrjük a zavarosság vagy részecskeméret bármilyen jelentős változása nélkül. A paklitaxeltartalom HPLC analízise azt mutatja, hogy a paklitaxel 70-100%-a visszanyerhető a szűrés után, az alkalmazott körülményektől függően. Így steril paklitaxel diszperziót kapunk.

A steril diszperziót aseptikusan steril üvegfiolákba töltjük, és bármilyen krioprotektív anyag hozzáadása nélkül liofilizáljuk. A kialakult pogácsa steril vízzel vagy sóoldattal könnyen az eredeti diszperzióvá alakítható vissza. A rekonstitúció utáni részecskeméret azonos a liofilizálás előttivel.

6. Példa

A szerves oldószer fázisfrakciójának hatása a részecskeméretre

A következő példa azt szemlélteti, milyen fontos, hogy a rendszerben a szerves oldószer fázisfrakciója szokatlanul alacsony legyen.

Egy sor kísérletet végeztünk, lényegében a 4. példában leírtához hasonló eljárást követve, azzal az eltéréssel, hogy a szerves oldószer fázisfrakcióját változtattuk, és az etanoltartalmat a szerves fázisban 10 térfogat%-on tartottuk. Azt találtuk, hogy a fázisfrakció növekedése a részecskeméret jelentős növekedéséhez vezetett: 4 térfogat% fázisfrakció (a telítési koncentráció felett, vagy 5 térfogat% összes kloroform-koncentráció) esetén a képződött részecskék átmérője 250 nm; 3 térfogat% fázisfrakció esetén a részecskék átmérője 200 nm, és 2 tér-

fogat% fázisfrakció esetén a részecskék átmérője 150 nm volt.

Világos, hogy csak a nagyon alacsony fázisfrakció mellett készített részecskék sterilizálhatók szűréssel.

7. Példa

A hatóanyag koncentrációjának hatása a részecskeméretre

A szerves fázisban levő hatóanyag koncentrációjának sze

repét szemlélteti a következő példa. Két kísérletet végeztünk, ahol a paklitaxel koncentrációja a szerves fázisban 50 mg/ml illetve 75 mg/ml volt, miközben minden más paraméter azonos volt a 2. példában leírttal. Azt találtuk, hogy az alacsony hatóanyag-koncentráció mellett képződött részecskék átmérője körülbelül 150 nm, míg a nagyobb hatóanyagkoncentráció mellett képződött részecskék átmérője kisebb, azaz 130-138 nm volt. Amikor hasonló kísérletet végeztünk, azonban az etanol koncentrációja a szerves fázisban körülbelül 50% volt, hasonló tendenciát figyeltünk meg, azaz a részecskék átmérője 210 illetve 156 nm volt a 25 mg/ml illetve az 50 mg/ml hatóanyagkoncentrációk esetén.

Ezek a megfigyelések közvetlenül ellentmondanak annak, amit Sjoström és munkatársai (supra) a nanorészecskék felületaktív anyagok jelenlétében történő képződéséről írtak.

8. Példa

Egy modell hatóanyag nanorészecskéinek előállítása

30 mg izoreszerpint (egy modell hatóanyagot) 3,0 ml metilén-dikloridban oldunk. Az oldatot 27,0 ml 1 tömeg/térfogat%-os humán szérumban albumin-oldathoz adjuk. Az elegyet 5 percig alacsony fordulatszám mellett (Vitris homogenizátor, modell: Tempest I.Q.) homogenizáljuk egy nyers emulzió előállítására, amelyet azután egy nagynyomású homogenizátorba (Avestin) viszünk át. Az emulgeálást 62-124,1 MPa nyomáson végezzük, miközben az emulziót legalább 5 ciklusra visszavezetjük. A kialakult rendszert egy forgó bepárlókészülékbe visszük át, és a metilén-dikloridot 40°C-on, csökkentett (3,99 kPa) nyomáson, gyorsan, 20-30 perc alatt eltávolítjuk. A kialakult diszperzió áttetsző, és a képződött paklitaxel részecskék jellemző átmérője 120-140 nm (Z-átlag, Malvern Zetasizer). A diszperziót egy 0,22 mikronos szűrőn (Millipore) át szűrjük.

A steril diszperziót 48 órán át tovább liofilizáljuk bármilyen krioprotektív anyag hozzáadása nélkül. A képződött pogácsa steril vízzel vagy sóoldattal könnyen az eredeti diszperzióvá alakítható. A részecskeméret a rekonstitúció után azonos a liofilizálás előttivel.

9. Példa

Rendkívül kicsiny részecskék előállítása egy modell hatóanyagból

Az etanol hozzáadásának a részecskeméret csökkenésére gyakorolt hatását az izoreszerpint esetében mutatjuk be.

30 mg izoreszerpint 2,7 ml metilén-diklorid és 0,3 ml etanol elegyében oldunk. Az oldatot 27,0 ml 1 tömeg/térfogat%-os humán szérumban albumin-oldathoz adjuk. Az elegyet 5 percig alacsony fordulatszám mellett (Vitris homogenizátor, modell: Tempest I.Q.) homogenizáljuk egy nyers emulzió előállítására, amelyet azután egy nagynyomású homogenizátorba (Avestin) viszünk át. Az emulgeálást 62-275,8 MPa nyomáson végezzük, miközben az emulziót legalább 5 ciklusra visszavezetjük. A kialakult rendszert egy forgó bepárlókészülékbe visszük át, és a metilén-dikloridot 40°C-on, csökkentett (3,99 kPa) nyomáson, gyorsan, 20-30 perc alatt eltávolítjuk. A kialakult diszperzió áttetsző, és a képződött részecskék jellemző átmérője 90-110 nm (Z-átlag, Malvern

Zetasizer). A diszperziót 0,22 mikronos szűrőn (Millipore) át szűrjük.

A steril diszperziót 48 órán át tovább liofilizáljuk bármilyen krioprotektív anyag hozzáadása nélkül. A képződött pogácsa steril víz vagy sóoldat hozzáadásával könnyen az eredeti diszperzióvá alakítható. A részecskeméret a rekonstitúció után azonos a liofilizálás előttivel.

10. Példa

Vízzel elegyedő, a hatóanyaggal túltelített oldószer önmagában való alkalmazása nem megfelelő a találmány szerinti eljáráshoz

30 mg paklitaxel 0,6 ml etanolban diszpergálunk. Ennél a koncentrációnál (50 mg/ml) a paklitaxel nem oldódik teljesen és túltelített diszperziót képez. A diszperziót 29,4 ml tömeg/térfogat%-os humán szérumban albumin-oldathoz adjuk. Az elegyet 5 percig alacsony fordulatszám mellett (Vitrís homogenizátor, modell: Tempest I.Q.) homogenizáljuk egy nyers emulzió előállítására, amelyet azután egy nagynyomású homogenizátorba (Avestin) viszünk át. Az emulgeálást 62-275,8 MPa nyomáson végezzük, miközben az emulziót legalább 6 ciklusra visszavezetjük. A kialakult rendszert egy forgó bepárlókészülékbe visszük át, és a kloroformot 40°C-on, csökkentett (3,99 kPa) nyomáson, gyorsan, 15-30 perc alatt eltávolítjuk. A kialakult diszperzió részecskemérete rendkívül tág határok között, körülbelül 250 nm és néhány mikron között változik.

A mikroszkóp alatti megfigyelés paklitaxel nagy részecskéinek és jellemzően tüllakú kristályainak a jelenlétét mutatta. Ezek a részecskék túl nagyok intravénás injekcióhoz.

Ez a kísérlet azt szemlélteti, hogy az olyan oldószer, mint az etanol, amely korlátlanul elegyedik a vízzel, a találmány szerinti eljárásban nagy részecskék képződéséhez vezet nagyon széles részecskeméret eloszlás mellett, és így önmagában nem használható a találmány szerinti eljárásban. Ily módon a találmány szerinti eljárás speciálisan kizárja a vízzel elegyedő oldószerek alkalmazását, ha azokat a hatóanyag komponens oldására vagy diszpergálására önmagában alkalmazzák. A találmány szerinti eljáráshoz az ilyen oldószereket, amennyiben alkalmazásra kerülnek, lényegében vízzel nemelegyedő oldószerekkel kell keverni ahhoz, hogy a találmány szerinti nanorészecskék előállíthatók legyenek.

11. Példa

Vízzel elegyedő, oldott hatóanyagot tartalmazó oldószer önmagában való alkalmazása nem megfelelő a találmány szerinti eljáráshoz

30 mg paklitaxel 1,3 ml etanolban diszpergálunk. Ennél a koncentrációnál (megközelítőleg 24,5 mg/ml) a paklitaxel teljesen oldódik etanolban. Az oldatot 28,7 ml 1 tömeg/térfogat%-os humán szérumban albumin-oldathoz adjuk. Az elegyet 5 percig alacsony fordulatszám mellett (Vitrís homogenizátor, modell: Tempest I.Q.) homogenizáljuk egy nyers emulzió előállítására, amelyet azután egy nagynyomású homogenizátorba (Avestin) viszünk át. Az emulgeálást 62-124,1 MPa nyomáson végezzük, miközben az emulziót legalább 6 ciklusra visszavezetjük. A kialakult rendszert egy forgó bepárlókészülékbe visszük át, és a kloroformot 40°C-on, csökkentett (3,99 kPa) nyomáson, gyorsan, 15-30 perc alatt eltávolítjuk. A kialakult diszperzió részecskemérete rendkívül tág határok között, körülbelül 250 nm és néhány mikron között változik. A mikroszkóp alatti megfigyelés a paklitaxel nagy részecskéinek és jellemző tüllakú kristályainak jelenlétét mutatta. Ezek a részecskék túl nagyok intravénás injekcióhoz.

Ez a példa az előző 10. Példa mellett azt szemlélteti, hogy az olyan oldószer, mint az etanol, amely kor-

látlanul elegyedik a vízzel, a találmány szerinti eljárásban nagy részecskék képződéséhez vezet nagyon széles részecskeméret-eloszlás mellett, és így önmagában nem használható a találmány szerinti eljárásban. Ily módon a találmány szerinti eljárás speciálisan kizárja a vízzel elegyedő oldószerek alkalmazását, ha azokat a hatóanyag komponens oldására vagy diszpergálására önmagukban alkalmazzák. A találmány szerinti eljáráshoz az ilyen oldószereket, amennyiben alkalmazásra kerülnek, lényegében vízzel nemelegyedő oldószerekkel kell keverni ahhoz, hogy a találmány szerinti nanorészecskék előállíthatók legyenek.

12. Példa

A paklitaxel fizikai állapotának meghatározása nanorészecske formában röntgensugár pordiffrakcióval

A paklitaxel nyersanyag rendszerint különböző, jellemzően 5-500 mikron méretű tüllakú kristályok alakjában van jelen. Egy intravénásan injektálható hatóanyagkészítményben kristályok jelenléte nyilvánvalóan káros, ha a jelenlevő kristályok mérete néhány mikron feletti, a kapillárisok esetleges elzárása miatt. Emellett a hatóanyag kristályainak oldékonysága általában kisebb, mint az amorf hatóanyagoké, ezáltal csökkentik az intravénás adagolást követően a hatóanyag biológiai hasznosíthatóságát. Az is ismert, hogy ahogy a hatóanyag mennyisége egy készítményben nő, a kristályosodási hajlam is nő. Így előnyös, ha a készítmény a hatóanyagot lényegében amorf formában tartalmazza.

Röntgensugár pordiffrakciót használtunk a liofilizált porkészítményben levő paklitaxel kristályos vagy nemkristályos természetének meghatározására. A következő mintákat analizáltuk: 1. minta - paklitaxel por; 2. minta - liofilizált szérum albumin; 3. minta - paklitaxel és albumin fizikai keveréke; és 4. minta - készítményre alakított paklitaxel. Mindegyik mintát 2° -tól 70° -ig változó 2θ szöggel sugároztuk be CuK α sugárzás, 40 KeV/30 mA gyorsítófeszültség, $0,05^\circ$ 2θ lépésméret és 2,0 másodperc adatgyűjtési idő alkalmazásával. A 1. minta egy kristályos anyagra jellemző erős csúcsokat mutatott. A legintenzívebb paklitaxel csúcs $5,1^\circ$ 2θ -nál jelentkezett. A 2. minta amorf anyagra jellemző széles púpokat mutatott. A 3. minta nagyjából a 2. mintához hasonló púpokat mutatott, de mellette a paklitaxel $5,1^\circ$ 2θ -nál jelentkező csúcsa is látható volt. A 4. minta, a készítményre alakított paklitaxel nem mutatta a paklitaxelre jellemző kristályosságot és a 2. mintával mutatkozott azonosnak, a készítmény-mintában a lényegében amorf gyógyszerhatásos szer jelenlétére utalva.

A találmány szerint előállított nanorészecskék amorf természete közvetlen ellentétben áll a szakterületen a nanorészecskék előállítására alkalmazott eljárásokkal előállított termékekével. Például őrlési technikák alkalmazásával, amint azt Liversidge és munkatársai az 5 145 684 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban és Liversidge-Merisko és munkatársai a *Pharmaceutical Research*, 13(2), 272-278 (1996) irodalmi helyen leírták, lényegében kristályos terméket kapnak.

13. Példa

Ciklosporin (Cyclosporin I.V.) nanorészecskék előállítása nagynyomású homogenizálással

30 mg ciklosporint 3,0 ml metilén-dikloridban oldunk. Az oldatot 27,0 ml 1 tömeg/térfogat%-os humán szérum albumin-oldathoz adjuk. Az elegyet 5 percig alacsony fordulatszám mellett (Vitris homogenizátor, modell: Tempest I.Q.) homogenizáljuk egy nyers emulzió előállítására, amelyet azután egy nagynyomású homogenizátorba (Avestin) viszünk át. Az emulgeálást 62-275,8 MPa nyomáson végezzük, miközben az emulziót legalább 6 ciklusra visszavezetjük. A kialakult rendszert egy forgó bepárlókészülékbe visszük át, és a meti-

lén-dikloridot 40°C-on, csökkentett (3,99 kPa) nyomáson, gyorsan, 20-30 perc alatt eltávolítjuk. A kialakult diszperzió áttetsző, és a képződött ciklosporin részecskék jellemző átmérője 160-220 nm (Z-átlag, Malvern Zetasizer).

A diszperziót 48 órán át tovább liofilizáljuk bármilyen krioprotektív anyag hozzáadása nélkül. A kialakult pogácsa steril víz vagy sóoldat hozzáadásával könnyen az eredeti diszperzióvá alakítható vissza. A rekonstitúció utáni részecskeméret azonos a liofilizálás előttivel.

14. Példa

Ciklosporin (Cyclosporine Oral) nanocseppecskék előállítása nagy nyomású homogenizálással

30 mg ciklosporint 3,0 ml megfelelő olajban (10% narancsolajat tartalmazó szezámolajban) oldunk. Az oldatot 27,0 ml 1 tömeg/térfogat%-os humán szérum albumin-oldathoz adjuk. Az elegyet 5 percig alacsony fordulatszám mellett (Vitrís homogenizátor, modell: Tempest I.Q.) homogenizáljuk egy nyers emulzió előállítására, amelyet azután egy nagynyomású homogenizátorba (Avestin) viszünk át. Az emulgeálást 62-275,8 MPa nyomáson végezzük, miközben az emulziót legalább 5 ciklusra visszavezetjük. A kialakult diszperzióban a jellemző átmérő 160-120 nm (Z-átlag, Malvern Zetasizer).

A diszperziót közvetlenül felhasználhatjuk vagy 48 órán át liofilizálhatjuk, kívánt esetben megfelelő krioprotektív anyag hozzáadásával. A kialakult pogácsa steril vízzel vagy sóoldattal könnyen az eredeti diszperzióvá alakítható vissza.

15. Példa

Asztmaellenes hatóanyag inhalálására alkalmas készítménybe foglalva

Asztmaellenes gyógyszereket már állítottak elő mikrorészecske technikával, így száraz por inhalátorban (dry powder inhaler, DPI) alkalmazható hatékony készítményeket kaptak. Egy szteroid hatóanyagból (például beklometazonból, beklometazon-dipropionáttól, budenozidból, dexametazonból, flunizolidből, triamkinolon-acetonidból és hasonlókból) kiindulva megfelelő részecskeméretű és felszabadulási jellemzőjű száraz készítményt állítunk elő a légzőrendszerbe történő hatékony leadás biztosításra.

A készítményt szonikálási technikákkal vagy homogenizálással állítjuk elő, ahol az oldószerben oldott hatóanyagot egy vizes fehérje-oldatba diszpergáljuk nanorészecskék emulziójának előállítására. Ezt az emulziót azután bepároljuk az oldószerek eltávolítására, így a hatóanyag fehérjével bevonva oldatban marad. Ezt a folyadékmintát, amely koloidális hatóanyagrészecskéket tartalmaz, Malvern Zetasizer segítségével mérjük, és a Z-átlag értéke 260 nm. Egy előnyös megvalósítási módban ezen koloid részecskék mérete körülbelül 50-1000 nm, és előnyösebben körülbelül 70-400 nm.

Ebben a folyékony formában más segédanyagok is oldhatók. Ilyen segédanyagok például (de nem kizárólag) a 0,5-15% mannit, a 0,1-5% laktóz és a maltodextrin. Ebben a szakaszban a hatóanyag, fehérje és segédanyag oldata permetezve szárítható vagy liofilizálható és száraz porrá őrölhető. Permetezve szárítás után a száraz részecskék mérete Malvern Mastersizer segítségével meghatározva $D(v,0.5)$ körülbelül 1-10 μm . Ezeknek a részecskének az előnyös mérettartománya 0,5-15 μm , előnyösebben 0,7-0,8 μm .

Ezt a permetezve szárított port azután egy segédanyag hordozó porral keverjük. Itt is különféle hordozók, például laktóz, trehalóz, Pharmatose 325 M, szacharóz, mannóz és hasonlóak használhatók. A hordozó por mérete jelentősen nagyobb, mint a készítménybe foglalt hatóanyagrészecskéké (kb. 63-90 μm a laktóz, 40-100 μm a

Pharmatose esetében).

A száraz porkészítmény hatékonyságát egy Andersen nyolc-szakaszos kaszkád impaktor segítségével vizsgáljuk. Az impaktorról végzett vizsgálatok eredménye körülbelül 60% finom részecskefrakciót (fine particle fraction, FPF) mutat. Ez olyan részecskék hatékony felszabadulására utal, amelyek a légzőrendszerben való leválásra megfelelő méretűek. Ez az FPF meglepő módon nagy és egy olyan készítményösszetétel eredménye, amely a hatóanyag kolloidális nanorészecskéit nagyobb készítmény-részecskékben tartalmazza.

Ez a készítmény mutatja a mikrorészecskék és a permetezve szárítási technikák alkalmazhatóságát DPI-n keresztül történő aeroszol adagolásra alkalmas száraz por készítmények előállításában és összeállításában. A nagy FPF eredmények a DPI készítmények egy hatékony és ígéretes megközelítésére utalnak.

16. Példa

A jelenleg előnyben részesített gyártási eljárás összefoglalása: 1 g paklitaxelből mint BDS-ből kiindulva 3%-os humán szérum albumin oldat előállítása:

51,7 ml 25%-os Albuteinhez adjunk 379,3 ml injekciós vizet. Az elegyet alaposan keverjük össze, és az oldatot steril 0,22 µm-es Nalgene eldobható szűrőn át szűrjük. A szűrletet tartjuk 4°C-on a felhasználásig.

Mérjük ki 1,0 g paklitaxelt egy üveglombikba. Elegyítsünk kloroformot és etil-alkoholt megfelelő arányban egy flolában. A komponenseket keverjük jól össze. A paklitaxelhez adjunk 13,33 ml-t a kloroform/etil-alkohol elegyből. Keverjük a komponenseket, hogy az összes paklitaxel oldatba menjen. Szűrjük az oldatot egy 0,22 mikronos steril Teflon szűrőn, és a szűrletet egy steril üveglombikba gyűjtjük.

Az üveglombikban levő paklitaxel-oldathoz adjuk hozzá a HSA-oldatot. Használjunk Sentry Microprocessor keverőt a paklitaxel/HSA oldat keverésére. Az oldat keverése után a lombik tartalmát öntsük a homogenizátor kamrájába. Keringessük az elegyet a homogenizátoron át nyomás alatt addig, amíg a kívánt részecskeméretet elérjük. A homogenizált mintát egy steril Kontes gömblombikba gyűjtjük.

A végső mintát tartalmazó lombikot kapcsoljuk a forgó bepárlókészülethez. Állítsuk a vákuumot és a forgást a maximumra

a forgó készülékben, és pároljuk le a szerves oldószert. Ennek eredményeként a paklitaxel kolloid oldatát kapjuk humán albuminban. Tegyük félre körülbelül 3 ml-t ebből a bepárolt mintából a részecskeméret analízisére.

Egy steril flüskében szűrjük a kolloid oldatot egy steril 0,45/0,2 µm-es szűrő alkalmazásával, és a szűrletet egy steril edénybe gyűjtjük. Tegyük félre körülbelül 3 ml szűrt mintát a paklitaxel koncentrációjának HPLC eljárással történő vizsgálatához.

Határozzuk meg a töltési térfogatot úgy, hogy a flola 30 mg (vagy más, osztott mennyiségű) paklitaxelt tartalmazzon. Töltsük a sterilre szűrt mintákat autoklávozott Wheaton 30 ml-es flolákba, körülbelül 17 ml mennyiségben (a meghatározás alapján). Zárjuk le a flolákat autoklávozott Wheaton szérum flola dugókkal. Mind-egyik flolában megközelítőleg 30 mg paklitaxelnek kell lennie.

Liofilizáljuk a mintát az FTS System Stoppering tálcás liofilizálóban előre meghatározott liofilizációs ciklus alkalmazásával. A minta liofilizálása után a flolákat dugjuk be és zárjuk le 20 mm-es Wheaton alumínium letéphető sapka beperemezésével. Címkezzük fel a mintákat megfelelően. Az egész eljárást tiszta helyiségben aszeptikus körülmények között végezzük.

A liofilizált minták <1000 ppm mennyiségű, előnyösebben 500 ppm, vagy méginkább 100 ppm mennyiségű maradék oldószert tartalmaznak.

A végtermék sterilre szűrése: az oldószert lepárlással történő eltávolítása után a paklitaxel kolloid oldatát a lombikban egy 0,45/0,2 mikronos sterilizáló szűrőkombináción át szűrjük. A szűrt oldatot egy steril lombikban gyűjtjük és sterilén 30 ml-es fiolába töltjük. A fiolákat ezután a liofilizálóba helyezzük. A liofilizálási ciklus befejezése után a fiolákat száraz steril nitrogéngázzal fedjük és nitrogénréteg alatt bedugjuk.

Megjegyezni kívánjuk, hogy nagynyomású homogenizációs eljárásokat alkalmaznak baktérium- és más sejtek roncsolására és elpusztítására azok tartalmának kinyerése céljából.

17. Példa

Nanorészecskék képzése szonikálással

Olajat tartalmazó fehérjeburok előállítása

A nagynyomású homogenizálás alkalmazásához hasonlóan úgy gondoljuk, hogy szonikálás alkalmazása is megfelelő vízben oldhatatlan gyógyszerhatóanyagok hatásos szerek fehérjével bevont nanorészecskéinek előállítására a fehérjéknek az intermolekuláris diszulfid-kötések kialakításával történő térhálósításával. Számos előny, amellyel a fentebb leírt nagynyomású homogenizálási módszerek rendelkeznek a korábbiakhoz viszonyítva, azonos mértékben fennáll a következőkben leírt szonikálási eljárások esetében is.

A szerves oldószerek, fehérjék és nem-fehérje polimerek vonatkozásában, amelyek a szonikálási eljárásban használhatók, a fentebb a nagynyomású homogenizálási eljárással kapcsolatban leírtakra utalunk. Mind-egyik komponensről feltételezzük, hogy azonosan jól működik mindkét eljárásban.

A találmány ezen vonatkozását nagyobb részletességgel a következő nem korlátozó példákra hivatkozva írjuk le.

3 ml USP (United States Pharmacopía) 5%-os humán szérum albumin oldatot (Alpha Therapeutic Corporation) egy hengeres edénybe helyezünk, amely egy szonikáló szondához kapcsolható (Heat Systems, Model XL2020). Az albumin-oldatra 6,5 ml USP minőségű szójaolajat rétegezzük. A szonikátor-szonda tetejét a két oldat határfelületére állítjuk, és a készüléket hűtőfürdőben 20°C-on tartjuk. A rendszert hagyjuk, hogy egyensúlyba kerüljön, és a szonikátort 30 másodpercre bekapcsoljuk. Élénk keveredés történik, és fehér tejes szuszpenziót kapunk. A szuszpenziót normál sóoldattal 1:5 arányban hígítjuk. Egy részecskeszámlálót (Particle Data Systems, Elzone Model 280 PC) használunk a részecskéeloszlás és az olajtartalmú fehérjeburok koncentrációjának meghatározására. A képződött fehérjeburok maximális keresztmetszetmérete körülbelül $1,35 \pm 0,73$ mikron, és a teljes koncentráció körülbelül 10^7 burok/ml az eredeti szuszpenzióban.

Kontrollként, a fenti komponensek fehérje távollétében nem képeznek stabil mikroemulziót, amikor ultrahanggal besugározzuk. Ez az eredmény arra utal, hogy a fehérje lényeges a mikroemulzió képződése szempontjából. Ezt a pásztázó elektronmikrográffal és transzmissziós elektronmikrográffal végzett vizsgálatok igazolják, amelyeket a későbbiekben ismertetünk.

18. Példa

Oldott paklitaxelt tartalmazó polimer burkok előállítása

Paklitaxelből USP minőségű szójaolajjal 2 mg/ml koncentrációjú oldatot készítünk. 3 ml USP minőségű 5%-os humán szérum albumin-oldatot egy hengeres edénybe helyezünk, amely egy szonikáló szondához kap-

csolható. Az albumin-oldatra 6,5 ml szójaolaj/paklitaxel oldatot rétegeztünk. A szonikátor-szonda tetejét a két oldat közötti határfelületre helyeztük, a készüléket egyensúlyban tartjuk, és a szonikátort 30 másodpercre bekapcsoljuk. Élénk keveredés történik, és stabil fehér tejes szuszpenziót kapunk, amely fehérjefalú polimer burkokat tartalmaz, amely burkok olaj/paklitaxel oldatot foglalnak magukban.

Annak érdekében, hogy nagyobb mennyiségű hatóanyag kerüljön a térhálós fehérjeburokba, az olajat és a hatóanyagot egyaránt oldó oldószert (amelyben a hatóanyagnak jelentősen nagyobb az oldhatósága) keverhetünk össze az olajjal. Feltéve, hogy ez az oldószert aránylag nem-toxikus (például etil-acetát), az eredeti hordozóval együtt injektálhatjuk. Más esetekben a polimer burkok előállítását után a folyadék vákuumban történő lepárlásával eltávolíthatjuk.

Azt tudjuk, hogy több különböző módszer alkalmazható a találmány szerinti készítmény fizikai jellemzőinek elérésére. A biológiai tulajdonságok, amelyek ehhez a készítményhez kötődnek, a specifikus szerv helyeken (prostatata, tüdő, hasnyálmirigy, csont, vese, szív) kialakult nagyobb helyi koncentrációk, valamint a kisebb toxicitások (megnövekedett LD_{50} , csökkent mielo-szuppresszió, csökkent cerebrális toxicitás), amelyek nagyobb hatékonysággal társulnak, függetlenek az előállítási eljárástól.

19. Példa

Nanorészecskék előállítása szonikálással

20 mg paklitaxelt 1,0 ml metilén-dikloridban oldunk. Az oldatot 4,0 ml 5 tömeg/térfogat%-os humán szérum albumin-oldathoz adjuk. Az elegyet 5 percig alacsony fordulatszám mellett (Vitrís homogenizátor, modell: Tempest I.Q.) homogenizáljuk egy nyers emulzió előállítására, amelyet azután egy 40 kHz-es szonikátor cellába viszünk át. A szonikátort 60-90% erővel 0 fokozatban 1 percig működtetjük (550 Sonic Dismembrator). Ezután az elegyet egy forgó bepárlókészülékbe visszük át, és a metilén-dikloridot 40°C-on, csökkentett (3,99 kPa) nyomáson gyorsan, 20-30 perc alatt eltávolítjuk. A képződött paklitaxel részecskék jellemző átmérője 350-420 nm (Z-átlag, Malvern Zetasizer).

A diszperziót 48 órán át tovább liofilizáljuk bármilyen krioprotektív anyag hozzáadása nélkül. A képződött pogácsa steril vízzel vagy sóoldattal könnyen az eredeti diszperzióvá alakítható. A részecskeméret a rekonstitúció után azonos a liofilizálás előttivel.

20. Példa

Egy fluorofort tartalmazó térhálósított fehérjeburok *in vivo* bieloszlása

A fehérje polimer burkokba zárt folyadék intravénás injektálás utáni felvételének és bieloszlásának meghatározására egy fluoreszcens színezéket (rubrént, az Aldrich cégtől szerezhető be) humán szérum albumin (HSA) fehérje polimer burkokba zártunk és markerként használtunk. Ez úgy történt, hogy a rubrént toluolban oldottuk, és toluol/rubrént elegyet tartalmazó albumin burkokat állítottunk elő a fentebb leírt ultrahangos besugárzással. A képződött tejszerű szuszpenziót normál sóoldattal ötszörösére hígítottuk. A hígított szuszpenzióból 2 ml-t egy patkány farokvénájába injektáltunk 10 perc alatt. Egy állatot leöltünk 1 órával az injektálás után, egy másikat 24 órával az injektálás után.

100 mikronos fagyasztott tüdő-, máj-, vese-, lép- és csontvelőmetszetet vizsgáltunk fluoreszcens mikroszkóp alatt a polimer burkokba zárt fluoreszcens festék vagy felszabadult festék jelenlétének meghatározására. Egy óra eltelte után a polimer burkok többsége érintetlennek látszott (azaz körülbelül 1 mikron átmérőjű, élén-

ken fluoreszkáló részecskék voltak jelen), és a tüdőben és a májban helyezkedtek el. A 24 órás mintában a festék a májban, tüdőben, lépben és a csontvelőben is látható volt. A szövet teljes festődése is megfigyelhető volt, ami arra utal, hogy a polimerburkok fala elemészódott, és a festék kiszabadult belőle. Ez az eredmény összhangban van a várakozással, és a találmány szerinti készítmények potenciális használhatóságát mutatja a befoglalt gyógyászatiilag hatásos szer, így a paklitaxel készletietti vagy szabályzott leadására való alkalmazásra.

21. Példa

Szójaolajat (SBO-t) tartalmazó polimer burkok toxicitása

Szójaolajat tartalmazó polimer burkokat állítottunk elő a 15. példában leírt módon. A képződött szuszpenziót normál sóoldattal hígítottuk két különböző töménységre, az egyik 20%, a másik 30% szójaolajat tartalmazott.

Az Intralipid, egy kereskedelemben kapható TPN szer 20% SBO-t tartalmaz. Az Intralipid LD₅₀ értéke egerekben 120 ml/kg, vagy körülbelül 4 ml egy 30 g testtömegű egérre nézve, amikor 1 ml/perc sebességgel injektáljuk.

Két, egyenként 3-3, körülbelül 30 g testtömegű egérből álló csoportot kezeltünk az SBO-t tartalmazó találmány szerinti készítménnyel a következők szerint. Mindegyik egérbe 4 ml-t injektáltunk az előállított, SBO-t tartalmazó polimer burkok szuszpenziójából. Az egyik csoport mindegyik tagja 20% SBO-t tartalmazó, míg a másik csoport mindegyik tagja 30% SBO-t tartalmazó szuszpenziót kapott.

Mind a három egér, amely a 20% SBO-t tartalmazó szuszpenziót kapta, túlélte a kezelést, és nem mutattott szemmel látható toxicitást semelyik szövetben vagy szervben, amikor azt egy héttel az SBO-val végzett kezelés után megvizsgáltuk. A 30% SBO-t tartalmazó szuszpenzióval kezelt három egér közül csak egy pusztult el az injektálás után. Ezek az eredmények világosan mutatják, hogy a jelen találmány szerinti polimer burkokban lévő olaj nem toxikus az LD₅₀ értékénél, ha a kereskedelemben kapható SBO készítményhez (Intralipid) viszonyítjuk. Ez a hatás annak tulajdonítható, hogy az olaj a polimer burkból lassan szabadul fel (azaz szabályozott sebességgel válik biológiailag hasznosíthatóvá). Ily módon a lassú felszabadulás megakadályozza egy letális olaj dózis elérését, szemben a nagy olaj dózissal, amelyeket a kereskedelemben kapható emulziók alakítanak ki.

22. Példa

A polimer burkokból felszabadult szójaolaj *in vivo* biológiai hasznosíthatósága

Egy kísérletet végeztünk polimer burkokba zárt anyag lassú vagy nyújtott felszabadulásának meghatározására egy polimer burkosuszpenziónak egy patkány véráramába történő injektálása után. A szójaolajat (SBO) tartalmazó térhálósított fehérje (albumin) falú polimer burkokat a fentebb leírt módon, szonikálással állítottuk elő. Az olajtartalmú polimer burkok képződött szuszpenzióját sóoldattal úgy hígítottuk, hogy a szuszpenzióban az olaj végkoncentrációja 20% volt. Ebből a szuszpenzióból 5 ml-t patkányok kanüllel ellátott külső juguláris vénájába injektáltunk 10 perc alatt. Ezekből az állatokból az injektálást követően különböző időpontokban vért gyűjtöttünk, és a trigliceridtartalmat (a szójaolaj főként trigliceridekből áll) a vérben rutin analízissel meghatároztuk.

Öt ml, kereskedelemben kapható zsíremulziót (Intralipid, vizes parenterális táplálószer, amely 20% szójaolajat, 1,2% tojássárga foszfolipidet és 2,25% glicerint tartalmaz) használtunk. A kontroll tojás-foszfatidot alkalmaz emulgeálószerként az emulzió stabilizálására. A triglicerid-szérumszintek összehasonlítása a két eset-

ben az olaj biológiai hasznosíthatóságának közvetlen összehasonlítását adná az idő függvényében. A 20% olajat tartalmazó polimer burkok szuszpenziója mellett olajtartalmú polimer burkok sóoldattal készült mintájából is injektáltunk 3 ml-t, amely mintában az olaj végkoncentrációja 30% volt. Két patkányt használtunk mindhárom csoportban. A trigliceridek vérszintjét mindegyik esetben meghatároztuk, és az 1. táblázatban mg/dl egységben adjuk meg.

1. táblázat

Csoport	Szérum-trigliceridek (mg/dl)					
	Pre	1 óra	4 óra	24 óra	48 óra	72 óra
Intralipid kontroll (20% SBO)	11,4	941,9	382,9	15,0	8,8	23,8
Polimer burkok (20% SBO)	24,8	46,7	43,8	29,3	24,2	43,4
Polimer burkok (30% SBO)	33,4	56,1	134,5	83,2	34,3	33,9

Az injektálás előtti vérszintek láthatók a "Pre" oszlopban. Világos, hogy az Intralipid kontroll nagyon magas triglicerid-szinteket produkál az injektálást követően. A trigliceridszintek azután körülbelül 24 óra elteltével esnek vissza az injektálás előtti értékre. Így látszik, hogy az olaj az injektálást követően azonnal hasznosítható az anyagcsere számára.

Az összességében az Intralipidhez (20%) hasonló mennyiségű olajat tartalmazó polimer burkok-szuszenzió a kimutatható trigliceridek igen nagy mértékben eltérő hasznosíthatóságát mutatja a szérumban. A szint körülbelül a normál értékének kétszeresére emelkedik, és ezen az értéken marad sok órán át, ami azt mutatja, hogy a trigliceridek lassan vagy nyújtottan szabadulnak fel a vérbe, a normálhoz elég közeli szinten. A 30% olajat tartalmazó polimer burkokkal kezelt csoport magasabb trigliceridszintet mutat (a nagyobb adagolt dózisnak megfelelően), amely 48 óra alatt csökken a normális értékre. Ismételten megállapítható, hogy a triglicerid-vegszintek nem emelkednek végtelenül ebben a csoportban, az Intralipidet kapó kontroll csoporthoz viszonyítva. Ez itt is arra utal, hogy a találmány szerinti készítményből az olaj lassan és nyújtottan válik hasznosíthatóvá, aminek az az előnye, hogy elkerüli a veszélyesen magas vérszinteket a polimer burokban levő anyagok vonatkozásában, és a hasznosíthatóság egy hosszabb időszakon át elfogadható szintű. Világos, hogy a jelen találmány szerinti polimer burkokban adagolt hatóanyagok ugyanezekkel az előnyökkel rendelkeznek.

Egy olyan rendszer, mint a szójaolajat tartalmazó polimer burkok rendszere, aminosavak, lényeges elektrolitok, vitaminok és cukrok vizes oldatában szuszpendálható, és így teljes parenterális tápláló (total parenteral nutrition, TPN) szert alkot. Az ilyen TPN szerek nem formulálhatók a jelenleg rendelkezésre álló zsíremulziókból (például az Intralipidből) az emulzió elektrolitok jelenlétében mutatott instabilitása miatt.

23. Példa

Egy gyógyászatiilag hatásos szerből álló szilárd magot tartalmazó fehérjefalú polimer burkok előállítás

Egy vízben rosszul oldódó hatóanyag, például a paklitaxel polimer burokban történő adagolásának egy

másik módja, hogy egy szilárd hatóanyagmag köré készítünk burkot egy polimer anyagból. Ilyen "fehérjével bevont" hatóanyagrészecskét a következőképpen kaphatunk. A 16. Példa szerinti eljárást ismételjük, ahol egy szerves oldószert használunk a paklitaxel aránylag nagy koncentrációban történő oldására. Az általánosan használt oldószerek szervesek, ilyen a benzol, toluol, hexán, dietil-éter, kloroform, alkohol és hasonlóak. A polimer burkokat a 15. példában leírt módon állítjuk elő. Az oldott paklitaxelt tartalmazó polimer burkok tejszerű szuszpenziójából 5 ml-et normál sóoldattal 10 ml-re hígítunk. Ezt a szuszpenziót forgó bepárlókészülékbe helyezzük, és az illékony szerves komponens vákuumban eltávolítjuk. A képződött szuszpenziót mikroszkóp alatt vizsgálva átlátszatlan magokat látunk, amelyek lényegében az összes szerves oldószert eltávolítására és szilárd paklitaxel jelenlétére utalnak. A szuszpenziót lefagyaszthatjuk és végtelen ideig tárolhatjuk, közvetlenül felhasználhatjuk vagy egy későbbi időpontban liofilizálhatjuk.

Eljárhatunk úgy is, hogy a szerves oldószertben oldott hatóanyagmagot tartalmazó polimer burkokat fagyaszttva szárítjuk egy száraz szétmáloló por előállítására, amelyet sóoldatban (vagy más alkalmas folyadékban) a felhasználás előtt újra szuszpendálhatunk. Noha a jelenleg előnyben részesített fehérje a polimer burkok előállításában való alkalmazásra az albumin, más fehérjék, így α -2-makroglobulin, egy ismert opszonin, szintén használható a polimer burkok makrofágyszerű sejtek általi felvételének növelésére. PEG-hez hasonló molekulákat is beépíthetünk a részecskékbe, így olyan polimer burkot hozva létre, amelynek nagyobb az *in vivo* keringési ideje.

24. Példa

Nanorészecskék előállítása spontán mikroemulgeálással

Nanorészecskéket szonikálás, nagynyírású homogenizálás vagy bármilyen más nagyenergiájú módszer alkalmazása nélkül is előállíthatunk. Így kívánt esetben egy lényegében tiszta hatóanyag szuszpenzióját (vagy száraz porát) is elkészíthetjük.

Egy mikroemulzió egy termodinamikailag stabil emulziórendszer, amely spontán képződik, amikor az összes komponensét érintkezésbe hozzuk nagynyírású készülék vagy más kiadós keverés alkalmazása nélkül. A mikroemulziók lényegében nem átlátszatlanok, azaz átlátszóak vagy áttetszőek. A mikroemulziók egy diszpergált fázisból állnak, amelyben a jellemző cseppecskeméret 1000 angström (Å) alatt van, ezért optikailag átlátszóak. A mikroemulzióban a cseppecskék jellemzően gömbalakúak, noha más szerkezetek, így hosszúkás hengerek előfordulása is lehetséges. [További részletek miatt ld. például Rosof, *Progress in Surface and Membrane Science*, 12, 405, Academic Press (1975), Friberg, *Dispersion Science and Technology*, 6, 317 (1985)].

Amint azt az alábbiakban megmutatjuk, a jelen találmány a mikroemulziók egyedülálló tulajdonságait a rendkívül kicsi nanorészecskék előállításának első lépéseként alkalmazza az oljfázis eltávolítása után.

Amint azt az előzőekben már leírtuk, mikrorészecskék és nanorészecskék különféle eljárásokkal, többek között oldószertlepárlási eljárással állíthatók elő. Ennek az eljárásnak az alapja egy egyszerű olaj-a-vízben emulzió képződése egy felületaktív szer jelenlétében, miközben nagy nyíró erőket alkalmazunk különféle berendezések, így rotorsztátor keverők, szonikátorok, nagynyomású homogenizátorok, kolloidmalmok és hasonlóak segítségével. Egy ilyen emulzió kialakítása után, amely egy polimert és egy hatóanyagot tartalmaz a diszpergált olaj cseppecskéiben oldva, az olaj fázist bepárlással eltávolítjuk, jellemzően csökkentett nyomáson és emelt hőmérsékleten, és a feloldott hatóanyag és polimer mikrorészecskéi vagy nanorészecskéi képződnek. Természetesen a

részecskék mérete az emulziós cseppek méretétől függ, minél kisebbek a cseppek, annál kisebbek a képződő részecskék. Kis emulziós cseppeket csak nagyon nagy energia alkalmazásával kaphatunk, és még akkor is, ha a legkorszerűbb nagynyomású homogenizátorokat, például mikrofluidizátort használunk, 75 nm-nél kisebb cseppekből álló emulziót nem tudunk előállítani. Mivel az emulziók sajátosan instabil rendszerek, és olyan folyamatokon mennek keresztül, mint az aggregáció és a cseppecskék összeolvadása, az oldószerlepárlási eljárások ilyen emulziók esetében nagyobb részecskéket eredményezhetnek.

Az új módszer, amely a hagyományos emulziók oldószerlepárlással történő előállításával járó problémákat megoldja, a következő lépésekből áll:

a) feloldjuk a vízben oldhatatlan hatóanyagot egy oldószerben, amely vízben kevésbé oldódik, és a víznél nagyobb gőznyomással rendelkezik. A hatóanyagot minden további polimer kötőanyag nélkül oldjuk fel, noha elvileg ilyen kötőanyag lehet jelen;

b) az oldószert egy megfelelő felületaktív anyaggal/anyagokkal és egy vízben oldódó társ-felületaktív anyaggal/anyagokkal elegyítjük;

c) elegendő mennyiségű vizet vagy vizes oldatot adunk a fenti elegyhez, így spontán egy olaj-a-vízben mikroemulzió képződik, bármilyen nagynyomású készülék alkalmazása nélkül. A vizes oldat elektrolitokat, aminosavakat vagy bármilyen más adalékot tartalmazhat, amely a mikroemulzió képzésre hatással lehet az első előállítási szakaszban;

d) kívánt esetben fehérje-oldatot adunk a mikroemulzióhoz;

e) csökkentett nyomáson végzett lepárlással eltávolítjuk az oldószert, így a hatóanyag kicsapódását érjük el rendkívül kicsi amorf nanorészecskék alakjában, amelyeknek jellemző mérete 1000 angström alatti. A részecskék ebben a szakaszban egy olyan közegben vannak diszpergálva és stabilizálva, amely felületaktív anyagot, társ-felületaktív anyagot és kívánt esetben védőszereket, így fehérjéket, cukrokat és hasonlókat tartalmaz. A bepárláshoz forgó bepárlókészüléket, filmbepárlókat, permetezve szárítókat, fagyaszttva szárítókat és más standard bepárlókészülékeket használhatunk, amelyeket az iparban általánosan alkalmaznak;

f) kívánt esetben a felületaktív anyagot és a társ-felületaktív anyagot dialízissel, ultraszűrőssel, adszorpcióval és más módszerrel eltávolíthatjuk, így olyan nanorészecskéket kapunk, amelyek fehérjével (amennyiben ilyen alkalmazunk) vannak stabilizálva;

g) az oldószer lepárlását követően a nanorészecskék folyékony diszperzióját száríthatjuk, így olyan port kapunk, amely a gyógyászatiilag hatásos szert és kívánt esetben a fehérjét tartalmazza, és amely alkalmas vizes közegben, így sóoldatban, pufferben, vízben és hasonlóokban ismét diszpergálható, így olyan szuszpenziót kapunk, amely állatnak adagolható, és részecskemérete 1000 angström alatti. Ilyen por előállítására alkalmas módszer például a fagyaszttva szárítás, a permetezve szárítás. Ha a szilárd formává alakítás liofilizálással történik, különféle krioprotektív anyagot, így mannitot, laktózt, albumint, karboxi-metil-cellulózt, polivinilpirrolidont, maltodextrineket és/vagy polietilén-glikolt adhatunk a készítményhez.

Ezeket a nanorészecskéket azután további segéd- vagy mátrixképző anyagokkal keverhetjük olyan hatóanyagleadó rendszer előállítására, amely nagy biológiai hasznosíthatósággal, szabályzott felszabadulási jellemzőkkel és gyomorsav elleni védelemmel rendelkezik. A végterméket az egyednek tablettá, kapszulá, rekonstituált folyadék vagy hasonló formájában adagolhatjuk.

A jelen találmány szerinti készítmény előállítása jelentős előnnyel rendelkezik a nanorészecskék és mikrorészecskék előállítására korábban alkalmazott eljárásokkal és a mikroemulziók vagy "premikroemulzió-koncentrátum" alkalmazásával szemben.

Számos előny érhető el a találmány szerinti eljárás alkalmazásával. A mikroemulzió spontán képződik, ha megfelelő komponenseket választunk ki, és nincs szükség az igen költséges berendezésekre és energiabefektetésre. A cseppek mérete körülbelül egy nagyságrenddel kisebb, mint a nagynyírási berendezéssel kapott legkisebb emulziócseppeké, és ezért rendkívül kicsi nanorészecskéket kaphatunk. A mikroemulzió termodinamikailag stabil, és ezért az emulzió instabilitásával (és így a képződő részecskék méretének időtől való függésével) kapcsolatos szokásos problémák elkerülhetők. Az egész eljárás sokkal egyszerűbb, mint a hagyományos emulzió-oldószerleparlási eljárás, és kevésbé érzékeny különféle paraméterekre. Mivel az eljárás csak egyszerű keverésből áll, a nagy előállítási térfogatokig történő léptéknövelés egyszerűbb, mint például egy nagynyírási homogenizátorral történő emulgeálás esetében. Mivel az új eljárással kapott részecskék mérete igen kicsi, egy nagyságrenddel kisebb, mint a steril szűréshez használt membránok pórusmérete, a sterilizációs eljárás igen hatékony, nincs gond a membrán eltömődésével, az emiatt megnövelt szűrési nyomásokkal és a szűrés során bekövetkező nagy hatóanyagvesztéssel. Mivel az emulgeáló eljárásban nincsenek nagy nyíró erők, az emulgeálás alatt nincs hőmérsékletemelkedés, és ezért még a hőmérsékletérzékeny hatóanyagok is feldolgozhatók a találmány szerinti új eljárással. A jelen találmány szerinti folyadék készítményben a hatóanyag megnövekedett kémiai stabilitással rendelkezik, mivel a hagyományos mikroemulziókhoz képest, amelyek diszpergált nanocseppecskéket tartalmaznak, diszpergált nanorészecskéket tartalmaz, azaz több kémiai reakció megy végbe folyékony állapotban (mikrocseppecskék), mint szilárd állapotban (nanorészecskék). A jelen találmány megnövekedett kémiai stabilitással rendelkezik szilárd készítmény formájában a hagyományos mikroemulziókhoz képest, amelyek folyadékok az összefüggő mikroemulziófázisok miatt. A szilárd készítmény lehetővé teszi a hatóanyag különböző szilárd dózisformákba, így tablettákba, granulátumokba és kapszulákba foglalását a hagyományos mikroemulziókkal vagy "pre-mikroemulzió koncentrátumokkal" szemben, amelyek folyadék formában vannak jelen. A nagyon szűk méreteloszlás, ami igen kicsi átlagos részecskemérettel párosul, a hatóanyag megnövekedett és egyenletesebb felszívódását biztosítja, mint a hagyományos módszerekkel előállított mikrorészecskék vagy nanorészecskék, így megnövekedett biológiai felhasználhatóság várható.

Noha a következő szakaszban bemutatott példák két vízben oldhatatlan molekulára utalnak, a nanorészecskék előállítására alkalmasnak vélt gyógyászatiilag hatásos szerek többek között, de nem kizárólag olyan hatóanyagok, diagnosztikai szerek, terápiás szerek, tápláló szerek és hasonlóak, amelyek vízben oldhatók vagy oldhatatlanok. A hatóanyagkategóriák és vegyületek egy nem korlátozó értelmű felsorolása magában foglalja azokat a vegyületeket, amelyeket a találmány nagynyírási homogenizációs vonatkozásában már felsoroltunk, de nem korlátozódik rájuk.

A következő példákban leírt oldószerek a toluol és a butil-acetát, azonban bármilyen oldószer vagy oldószerkeverék, amely a szükséges hatóanyagot oldani képes, megfelel a találmány szerinti eljárásban való alkalmazásra, feltéve, hogy egy tökéletes mikroemulzió képezhető az oldószer eltávolítását megelőzően. Ilyen oldószer lehet a kloroform, metilén-diklorid, etil-acetát, butil-acetát, izobutil-acetát, propil-acetát, terc-butil-metil-éter, butanol, propilén-glikol, heptán, anizol, kumén, etil-formiát, etanol, propanol, tetrahidrofuran, dioxán, acetonitril,

aceton, dimetil-szulfid, dimetil-formamid, metilpirrolidinon, szójaolaj, kókuszdióolaj, ricinusolaj, olívaolaj, sáfrányolaj, gyapotmagolaj, 1-20 szénatomos alkohokok, 2-20 szénatomos észterek, 3-20 szénatomos ketonok, polietilén-glikolok, alifás szénhidrogének, aromás szénhidrogének, halogénezett szénhidrogének, d-limonén és ezek kombinációi.

Az ebben az eljárásban alkalmazott fehérjének (vagy néhány fehérje keverékének) olyannak kell lennie, amely nem válik ki csapadék formájában a kezdeti keverés vagy a bepárlási szakasz alatt. Számos ilyen fehérje van, többek között az albuminok (például BSA, HSA, tojás), zselatin, kollagén, IgG, különféle enzimek, laktoglobulin, kazein, szójafehérje és hasonló.

A jelen találmányban alkalmazott felületaktív anyagoknak képeseknek lenniük spontán olaj-a-vízben mikroemulzió képzésére megfelelő társ-felületaktív anyag és oldószer jelenlétében, anélkül, hogy a hatóanyag vagy a fehérje (amennyiben jelen van) kicsapódását okozná. A felületaktív anyagok nemionosak (Tween, Span, Triton, Phuronic, poliglicerin-észterek és hasonló), anionosak (SDS, kolátok és deoxikolátok, zsírsav-szappanok és hasonló), kationosak (cetil-trimetilammónium-klorid és hasonló) vagy ikerionosak (lecitin, aminosavak) és hasonló lehetnek.

A társ-felületaktív anyagnak képesnek kell lennie spontán mikroemulzió képzésre a kiválasztott felületaktív anyaggal, anélkül, hogy a feloldott hatóanyag molekulák (vagy fehérje, amennyiben jelen van) kicsapódását okozná, és anélkül, hogy nagy kristályos anyag képződését váltaná ki. A társ-felületaktív anyag vízdoldható vagy olajoldható, így butanol, propilén-glikol, benzilalkohol, propanol és hasonló anyag lehet.

A nanorészecskék folyadék diszperziójának liofilizálással történő konverziójához krioprotektív szerek, így mannit, laktóz, aminosavak, fehérjék, poliszacharidok és hasonló hozzáadására lehet szükség.

Világos, hogy a jelen találmányban leírt elvek több eljárás-variációban használhatók, amelyek például a következők.

1. A hatóanyag-részecskék képződése a mikroemulzióknak egy olyan megfelelő oldószerrel történő hígításával váltható ki, amellyel az oldószer nem elegyedik. Például, ha az oldószerek vízben kicsi az oldhatósága, a mikroemulziót addig lehet hígítani, ameddig az oldószer már alatta lesz a vízben való oldhatósági határának.
2. Az oldószert és a kívánt esetben jelenlevő felületaktív anyagot és társ-felületaktív anyagot olyan szelektív extrahálószer alkalmazásával távolíthatjuk el, amely a hatóanyagot nem oldja.
3. A felületaktív anyagot és a társ-felületaktív anyagot ultraszűrővel távolíthatjuk el, amihez a fehérje molekulatömege alatti molekulatömeget kizáró szűrőket használunk. Az egyszerű dialízis is egy lehetőség.
4. A készítmény csak olyan komponenseket tartalmazhat, amelyek elfogadhatók a végső készítmény szándékolt (orális, IV, topikális és hasonló) felhasználásánál, így ezeknek az eltávolítása nem szükséges.
5. Hasonlóképpen, olyan társ-felületaktív anyagokat, például glicerint, benzil-alkoholt és hasonlókat használhatunk, amelyek a végtermékben maradhatnak.
6. Különböző vízdoldható molekulák hozzáadása is lehetséges, amelyek megváltoztathatják a mikroemulzió fázisdiagramját (elektrolitok, etanol stb.), így szabályozzuk a különböző komponensek közötti arányt, és kapjuk az optimális hatóanyag-töltetet.
7. A spontán emulgeálási lépést szobahőmérséklettől eltérő hőmérsékleten is végezhetjük annak érdekében, hogy a fázisdiagrammot (és a komponensek megoszlását), amely mikroemulzió képződéséhez vezet, befo-

lyásoljuk. Közelebbről, feltehetően használhatunk hőmérsékletváltozást is (az etoxilezett felületaktív anyagokban) a rendszernek egy olaj-a-vízben mikroemulzióból egy víz-az-olajban mikroemulzióvá történő átalakítására.

8. Adhatunk más komponenseket is a folyadékfázishoz annak érdekében, hogy a hatóanyag biológiai hasznosíthatóságát befolyásoljuk. Közelebbről, előnyös például egy olaj, például szójaolaj hozzáadása az orális felszívódás növelésére és a hatóanyagnak a kémiai és enzimikus lebomlásokkal szembeni védelmére.

9. Hasonlóképpen, mátrixképző polimert (például PVP-t) is adhatunk az oldószerhez a hatóanyaggal együtt.

10. A stabilizációs és szilárd-forma tulajdonságok a fehérjétől eltérő vízoldható polimernek [CMC-nek (karboximetilcellulóz), gumiknak és hasonlóknak] a mikroemulzió külső vizes fázisához való hozzáadásával megváltoztathatók.

11. A képződött szilárd porforma folyóképesége megváltoztatható kolloid részecskék (például szilícium-dioxid) töltőanyagként való hozzáadásával vagy rekonstitúciós/agglomeráció-ellenes segédanyagok hozzáadásával.

12. Az ebben a találmányban leírt elvek alkalmazhatók víz-oldható részecskék előállítására is, miközben az emulgeálási szakaszt olyan összetétel tartományban végezzük, amelyben víz-az-olajban mikroemulzió képződik. Az eljárást például rendkívül kis fehérje nanorészecskék előállítására használhatjuk.

25. Példa

Ciklosporin A nanorészecskék előállítása

115 mg ciklosporin A-t 1 ml butil-acetátban oldunk, és az oldatot 2 g Triton X-100:n-butanol 4:1 térfogatarányú oldattal elegyítjük. Tiszta rendszer képződik. Cseppenként, gyenge rázás közben 10 g vizet adunk hozzá. Egy tiszta olaj-a-vízben mikroemulziót kapunk. Ehhez 10 g 1%-os kazein-oldatot adunk gyenge rázogatás közben. A rendszer enyhén zavarossá válik. A butil-acetátot forgó bepárlókészülékben 40°C-on 10,6 kPa nyomáson eltávolítjuk. A rendszer teljesen tisztává válik.

A részecskeméretet foton korrelációs spektroszkópia eljárással mértük. Azt találtuk, hogy a Z-átlag részecskeméret 25-33 nm, míg a szám- vagy térfogateloszlás alapján meghatározott részecskeméret csak 9 nm. Nem voltak megfigyelhetők részecskék az optikai mikroszkóp alatt, sem a polarizált fényben. Ez az eredmény kristályos részecskék távollétére utal.

Ezen nanorészecskék folyadék-diszperzióját 2 tömeg% laktóz hozzáadása után liofilizáljuk.

Fehér szilárd anyagot kapunk, amely vízzel rekonstituálva a liofilizálás előttihez hasonló tiszta rendszert eredményez. A részecskeméret ebben a rekonstituírt mintában nagyon hasonló volt az eredeti készítményéhez, a Z-átlag körülbelül 40 nm és a térfogat- és számeloszlás szerinti átmérő 10-12 nm.

26. Példa

Ciklosporin A nanorészecskék előállítása

119 mg ciklosporin A-t butil-acetátban oldunk, az oldathoz 2 g Triton X-100:propilén-glikol 4:1 térfogatarányú oldatból 2 g-ot adunk. Tiszta rendszer képződik. Ehhez 7 g vizet csepegtetünk gyenge rázogatás közben. Tiszta olaj-a-vízben mikroemulziót kapunk. Az emulzióhoz 7 g 1%-os kazein-oldatot adunk gyenge rázogatás közben. A rendszer enyhén zavarossá válik. A mintát vízzel 1:1 arányban hígítjuk az oldószer lepárlása előtt. A butil-acetátot forgó készülékben 40°C-on 10,6 kPa nyomáson eltávolítjuk. A rendszer teljesen tisztává válik.

Ennek az eljárásnak eredményeként rendkívül kicsi nanorészecskéket kapunk, a Z-átlag 45 nm, és az átmérő térfogat- és számeloszlás alapján 11 nm.

Ezeknek a nanorészecskéknél a folyadék diszperzióját 2 tömeg% laktóz hozzáadása után liofilizáljuk.

Fehér szilárd anyagot kapunk, amely vízzel rekonstituálva tiszta rendszert eredményez, amely a liofilizálás előttihez hasonló. A részecskék mérete ebben a rekonstituált mintában közel volt az eredeti készítményben levőhöz, a Z-átlag körülbelül 25 nm, és az átmérő a térfogat- és számeloszlás alapján 9-11 nm.

27. Példa

Ciklosporin-nanorészecskék

Mikroemulziókat állítunk elő a következő összetételekkel: 50 mg ciklosporin, 0,5 g butil-acetát, 3,04 g Tween 80:propilén-glikol 1:1 és 6,8 g víz. A mikroemulziót bepároljuk, így tiszta folyadékot kapunk, amely 5 mg/ml ciklosporint tartalmaz. Egy kontroll kísérletben, amelyet a fenti komponensek egyszerű keverésével, de butil-acetát nélkül végeztünk el, a ciklosporin még 17 óra elteltével sem oldódott fel.

Több lehetőség van a felületaktív anyagokra, például poliszorbátokat (Tween), szorbitán-észtereket (span), szacharóz-észtereket, lecitint, monodiglicerideket, polietilén-polipropilén blokk-kopolimereket (pluronic), szappanokat (nátrium-sztearát), nátrium-glikolát-epesav-sókat, etoxilezett ricinusolajat, nátrium-sztearoil-laktátot, etoxilezett zsírsavakat (myrj), etoxilezett zsíralkoholokat (Brij), nátrium-dodecilszulfátot (SDS) és hasonlókat használhatunk. Általában a biopolimerek, így például a keményítő, zselatin, cellulóz-származékok szintén használhatók. Orális alkalmazás esetén élelmiszer minőségű felületaktív anyagokat, valamint a McCutcheon Handbook of Surfactants kézikönyvben vagy a CTFA Indexben szereplő felületaktív anyagokat is a készítménybe foglalhatunk. A mikroemulziók számára alkalmas társoldószer vagy társ-felületaktív anyagok többek között a propilénglikol, etanol, glicerin, butanol és az olajsav.

28. Példa

BHT nanorészecskék előállítása

110 mg butilezett hidroxitoluol (BHT-t) 1 ml toluolban oldunk, és az oldatot 2 ml Triton X-100:n-butanol 4:1 térfogatarányú oldattal elegyítjük. Ezután 32 g 1%-os kazein-oldatot adunk hozzá, és spontán egy mikroemulzió képződik. A mikroemulziót csökkentett (10,6 kPa) nyomáson, 40°C-on addig pároljuk, amíg tisztává válik. A képződött részecskék mérete: Z-átlag 30 nm, az átmérő a térfogat- illetve a számeloszlás alapján 16 illetve 15 nm.

29. Példa

BHT nanorészecskék előállítása

A 27. példában leírtéhoz hasonló eljárást valósítunk meg, azonban a kazein-oldat helyett vizet használunk. A 40°C-on és 10,6 kPa nyomáson végzett bepárlás után a rendszer tisztává válik, a Z-átlag méret körülbelül 10 nm.

30. Példa

Paklitaxel nanorészecskék előállítása

30 mg paklitaxelt 2 ml butil-acetátban oldunk, és az oldatot 4 g Triton x-100:propilénglikol 4:1 térfogatarányú oldattal elegyítjük. Ezután 40 ml vizet adunk hozzá, ekkor a rendszer enyhén zavarossá válik. Bepárlás után a rendszer teljesen tiszta lesz. A Z-átlag méret 6 nm, a méret térfogat- és számeloszlás alapján 7-9 nm.

Ugyanezt a nagyságot mértük egy napon át 4°C-on történő tárolás után is.

31. Példa

Mikroemulzió fázisdiagrammok meghatározása

Olyan összetételeket határoztunk meg, amelyek mikroemulziót eredményeznek, és amelyek az oldószerlepárlási eljárással nanorészecskék előállítására használhatók. Ezeknek az összetételeknek egy vízzel elegyedő oldószert, amely képes a hidrofób molekulák oldására, egy vízes oldatot mint folytonos közeget, felületaktív anyagokat és esetleg társ-felületaktív anyagokat kell tartalmazniuk. Butil-acetát-a-vízben mikroemulziók állíthatók elő különféle összetételek mellett, amelyeket fázisdiagrammokkal írunk le (a butil-acetátot olyan oldószerként tartják számon, amelynek nagy az elfogadható maradékkoncentrációja a végtermékben). Továbbá, mind a felületaktív, mind a társ-felületaktív anyagot alkalmazzák az élelmiszer- és a gyógyszeriparban, ezek a Tween 80 (etoxilezett szorbitán-monooléát) és a propilén-glikol. Előkísérleteket végeztünk BHT-t használva modell hidrofób molekulaként, amellyel a 20-50 nm-es tartományba eső méretű részecske-diszperziót kaptunk. 0,2 µm-es szűrők alkalmazásakor a BHT-nek megközelítőleg 100%-a ment át a membránon.

A felületaktív/társ-felületaktív anyagok különféle kombinációinak fázisdiagrammját kaptuk oly módon, hogy az oldószert a felületaktív anyag/társ-felületaktív anyag keverékével vortexeltük (amely keveréket az oldószerekhez való keverést megelőzően különböző komponensarányban állítottunk elő), majd az elegyhez cseppenként vizet adtunk. A különféle összetételek turbiditását a "víz vonal" mentén figyeltük meg, és azokat az összetételeket, amelyek áttetsző rendszereket eredményeztek, fényszóródással tovább analizáltunk. Az oldószert/felületaktív anyag/társ-felületaktív anyag különböző arányait alkalmazva a fázisdiagrammban, azokat a területeket, amelyek mikroemulziókat eredményeztek azonosítottuk (a kiválasztott komponenseknek csak kis száma eredményezett mikroemulziót). Ugyanezt az eljárást alkalmaztuk azokra a rendszerekre, amelyekben a BHT-t butil-acetátban oldottuk a fázisdiagramm-kísérletek elvégzése előtt.

A BHT-t tartalmazó mikroemulziók és nanorészecskék "szűrhetőségét" úgy értékeltük, hogy összehasonlítottuk a 0,2 µm-es membránon végzett szűrés előtt és után készült UV abszorpciós spektrumot. A nanorészecskéket a butil-acetát vákuumban (8 kPa nyomáson, 40°C-on) végzett lepárlásával kaptuk. Hangsúlyozni kell, hogy az egész eljárásban nem alkalmaztunk nagynyírású készüléket.

Azokat a mikroemulziós rendszereket határoztuk meg, amelyek orális adagolásra alkalmasak lehetnek. Oldószerként a n-butil-acetátot választottuk. A következő felületaktív anyagokat és társ-felületaktív anyagokat értékeltük különböző arányokban:

Tween 80:glicerín 5:1

Tween 80:glicerín 4:1

Tween 80:glicerín 3:1

Tween 80:glicerín 2:1

Tween 80:glicerín 1:1

Span 80:glicerín 4:1

Span 80:glicerín 3:1

Tween 80:propilén-glikol 4:1

Tween 80:propilén-glikol 3:1

Tween 80:propilén-glikol 2,5:1
 Tween 80:propilén-glikol 1,5:1
 Tween 80:propilén-glikol 1:1
 Tween 80:propilén-glikol 1:2
 (Tween 80 + Span 80 7:1):propilén-glikol 3,3:1
 (Tween 80 + Span 80 7:1):propilén-glikol 1:1
 (Tween 80 + Span 80 8:1):propilén-glikol 4:1
 (Tween 80 + Span 80 5:1):propilén-glikol 1:1
 Tween 80:(propilén-glikol + glicerin 1:1,2) 2:1

Egy alkalmas összetételnek találtuk a következőt: felületaktív szerként a Tween 80-t és társ-felületaktív szerként a propilén-glikolt 1:1 arányban. A teljes fázisdiagrammot a n-butil-acetát, Tween 80:propilén-glikol 1:1, víz rendszerre értékeltük. Két további oldószert próbáltunk ki, a szek-butil-acetátot és a terc-butil-acetátot. Ezekre a rendszerekre kapott fázisdiagrammok azonosak voltak a n-butil-acetáttal kapott fázisdiagrammal. A n-butil-acetát, Tween 80:propilén-glikol 1:1, víz rendszert értékeltük még.

A 7% butil-acetát, 30% felületaktív szer/PG, 63% víz minta esetén végeztük el a részecskék nagyságának mérését. A Z-átlagot körülbelül 20 nm-nek találtuk. A nanorészecskék előállítását vízben oldhatatlan festékkel, szudán III-mal végeztük körülbelül 10 mg/l g butil-acetát koncentrációnál (5% butil-acetát, 23% felületaktív anyag/PG, 72% víz). A részecskeméretet körülbelül 17 nm-nek találtuk. A nanorészecskék előállítását BHT esetében 100 mg/l g butil-acetát koncentrációban is elvégeztük. Meghatároztuk a fázisdiagrammot erre a rendszerre. Az összetételtől függően a részecskék nagyságakörülbelül 20-50 nm volt.

A szudán III-mal és BHT-vel kontroll kísérleteket is folytatunk. 10 mg szudán III-hoz 14,4 g vizet, majd az elegyhez 4,6 g felületaktív anyagot/PG-t adtunk. A mintát 24 órán át mágneses keverővel kevertük. A szudán III oldódását figyeltük meg. Azonban, amikor ugyanezt a kísérletet BHT-vel végeztük (100 mg BHT 9 g vízben és 4,3 g felületaktív anyag/PG jelenlétében), a BHT oldódását nem észleltük. Ebben a szakaszban végeztük el a bepárlást (40°C-on és körülbelül 8 kPa nyomáson). A mintákban a részecskék nagyságát a bepárlás előtt és után is megmértük. A Z-átlag körülbelül 20-50 nm volt a bepárlás előtt és 30 nm a bepárlás után.

A mintákat a bepárlás után 0,2 µm-es szűrőn át szűrjük, és a BHT koncentrációját UV abszorpcióval a szűrés előtt és után megmértük. A két minta között nem találtunk különbséget. Ez az eredmény nyilvánvalóan a BHT nanorészecskék nagyon kicsi mérete miatt.

Két mintát készítettünk (ezeknek az összetétele: 1. minta: 4% butil-acetát; 14% felületaktív anyag/PG; 80% víz; 2. minta: BHT 123 mg/g butil-acetát; 5% butil-acetát; 18% felületaktív anyag/PG; 77% víz).

32. Példa

Az eljáráshoz használható berendezések

A jelenlegi adagok előállításához használt berendezések léptékét növelni kell a klinikai célú gyártáshoz. Több alternatíva áll rendelkezésre a CapxolTM nagyobb volumenű gyártására alkalmas készülékek tekintetében. Ezek közül néhányat az alábbiakban sorolunk fel:

Készülék kategória	Készülék választék
Előkeverő	lapácos keverő, Rotostator keverő
Nagynyomású készülék	Nagynyomású homogenizátorok (Avestin, Microfluidics, Stansted), szonikátorok (Heat Systems)
Oldószer-eltávolító készülék	Forgó bepárlók, folyamatosáramú bepárlók, filmbepárlók, gyorsbepárlók, recirkulációs töményítők, ultraszűrők
Dehidratáló készülék	Liofilizálók, permetezve szárítók

33. Példa

Különféle anyagokból készült intravénás adagolórendszerek

Az intravénás adagolórendszerek előállítására alkalmazott anyag polimer (például polietilén-, polivinil-, polipropilén- csövek és hasonlók) vagy üveg lehet. A standard orvosi minőségű csövekről tudott, hogy a belső felületükön hidrofób részeket tartalmaznak. Ezek a részek kerülnek kapcsolatba az injekciós oldattal. Valóban, az ilyen csövek speciálisan vannak elkészítve, mint a katéterek is, hogy ezek a hidrofób részek kerüljenek érintkezésbe a kezeléshez használt oldattal, és így csökkentsék a vizes anyagnak a cső általi abszorpcióját. Azonban a kezeléshez használt oldatban levő bármilyen hidrofób rész a katéter-vezetékhez és az adagolórendszer más komponenséhez feltehetően hozzákötődik. Ennek eredményeként a hidrofób gyógyászatiilag hatásos szer jelentős része megkötődhet a katétercső és az adagolócső belső falán. Következésképpen, a hidrofób gyógyászatiilag hatásos szer adagolása hibás lehet, mivel a hatóanyag jelentős része a csövek falához kötődhet. Kritikus gyógyszeres kezelések esetében, ahol egy beteg kezelésére hidrofób gyógyászatiilag hatásos szert használnak, a hatásos szer effektív dózisában bekövetkező jelentős csökkenés a terápia elégtelenségéhez vezethet. Az elégtelenség különösen szembetűnő, amikor olyan terápiás szert alkalmaznak, amelynél szükséges, hogy a hatóanyag egy bizonyos szint feletti mennyiségben legyen jelen, noha a terápiás ablak szűk.

Egy hidrofób gyógyászatiilag hatásos szer intravénás bevezetésére egy új eljárást fejlesztettünk ki. Azáltal, hogy a hatóanyag hidrofób részeit egy biokompatibilis bevonat (például albumin) hidrofób részeivel hozzuk kapcsolatba, a hatóanyagnak az a hajlandósága, hogy a csőhöz kötődjön, nagy mértékben csökken. Így módon a jelen találmány lehetővé teszi nagyon hidrofób szereknek a használatát standard orvosi minőségű polimer és hidrofób üveg kombinációjában, amelyben a hatóanyag védett, és ezért nem kötődik meg a felszínen. A találmány szerinti eljárás abból áll, hogy egy biokompatibilis polimerrel (például albuminnal) vesszük körül a hidrofób szert, és a képződött készítményt egy hidrofób polimer leadórendszerbe helyezzük. A találmány szerinti eljárás-

sok ezért képesek különböző hidrofób gyógyszerek adagolásának javítására.

34. Példa

A paklitaxel HPLC analízise

Kromatográfiás rendszer:

HPLC: Shimadzu LC-10AS oldószer adagoló rendszer

Shimadzu SIL-10A autoinjektor

Shimadzu SCL-10A rendszerszabályzó

Shimadzu SPD-M10AV dióda-rendszer-detektor

Shimadzu CTO-10A oszlop kemence

Oszlop: Curosil-PFP, 5 µm, 4,6 mm x 25 cm, Phenomenex
vagy C-18

Mozgófázis: víz/acetonitril 65:45

Átfolyási sebesség: izokratikus, 1,0 ml/perc

Detektálás: 228 nm

Ömlesztett paklitaxel hatóanyag (Bulk Drug Substance, BDS) meghatározása

A paklitaxel BDS-t és a paklitaxel standardot (99,9%, Hauser Chemical Research, Inc. Lot 1782-105-5) kvantitatívan acetonitrilben oldottuk, és az oldatokat külön-külön a HPLC oszlopra injektáltuk. Az 1,00 g/ml koncentrációjú paklitaxel BDS-oldatból is és a 2,07 mg/ml koncentrációjú standard-oldatból is 10 µl-t injektáltunk. A paklitaxel BDS domináns csúcsának retenciós ideje megfelelt a Hausertől származó paklitaxel standard retenciós idejének.

A paklitaxel BDS hatékonysága

A paklitaxel BDS és standard paklitaxel mintát a fenti módon a HPLC oszlopra injektáltuk. A paklitaxel tartalmát a paklitaxel BDS és a standard paklitaxel görbéje alatti terület arányából, és a standard paklitaxel ismert potenciája alapján számítottuk.

A paklitaxel BDS szennyezési profilja

A fentebb leírt kromatográfiás rendszer képes a taxánok nagy felbontására. Acetonitrilrel készült, 1,0 mg/ml koncentrációjú paklitaxel BDS-oldatból 10-20 µl-t injektáltunk az oszlopra, ami a HPLC rendszer lineáris választartományába esik. A szennyezési profilt a relatív csúcs alatti területek alapján határoztuk meg.

A CapxolTM-ban levő paklitaxel hatékonyságának meghatározása

60, 100, 120, 140 és 160 µg/ml koncentrációjú standard oldatokat készítettünk paklitaxel BDS 3%-os HSA-ban történő kvantitatív oldásával. A CapxolTM-mintákat sóoldattal körülbelül 100 µg/ml koncentrációig hígítottuk. A standard oldatokhoz és a CapxolTM-mintákhoz belső standardként cefalomannint adtunk, majd az elegyet szilárdfázisú vagy folyadékfázisú extrakciónak vetettük alá (ld. később). A standard készítményekből és a CapxolTM-minta készítményekből azonos (20-30 µl) térfogatokat injektáltunk külön-külön a HPLC oszlopra a paklitaxel és a belső standard cefalomannin közötti csúcs-válasz arány meghatározására. Kalibrációs görbét készítettünk a standard injekciókhoz kapott eredmények szokásos legkisebb négyzetes regressziójának alkalmazásával. A paklitaxel hatékonyságát a CapxolTM-ban a minta injekciók és a standard injekciók csúcs-válasz ará-

nyának összehasonlításával határoztuk meg.

A paklitaxel szennyezés-profilja a Capxol™-ban

A Capxol™-t szilárdfázisú vagy folyadékfázisú extrakciónak vetettük alá (ld. később) a HPLC oszlopra történő injektálás előtt. A Capxol™-ból extrahált körülbelül 1 mg/ml koncentrációjú paklitaxel-oldatból 30 µl-t injektáltunk a szennyezés profil fenti módon végzett vizsgálatára.

Szilárdfázisú extrakció

Egy Capxol™ mintát körülbelül 100 µg/ml töménységre rekonstituáltunk sóoldatban. A szilárd fázisú extrakciós oszlopot (Bond-Elut, C-18) vízzel kondicionáltuk. Az oszlopra felvittük a mintát, majd vákuum segítségével átszívattuk. Az oszlopot ezután vízzel mostuk, majd a paklitaxelt acetonitrilrel eluáltuk. Az extrahált paklitaxelt tartalmazó acetonitriles eluátumot HPLC oszlopra injektáltuk.

Folyadékfázisú extrakció

Egy Capxol™ mintát megközelítőleg 100 µg/ml koncentrációra rekonstituáltunk sóoldattal. Ebből a mintából körülbelül 200 µl-t 800 µl acetonitrilhez adtunk. Az elegyet 30 másodpercig vortexeltük, majd 3000 x g-n 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk és összegyűjtöttük. A pelletet 200 µl sóoldatban újra szuszpendáltuk, és az extrakciós lépést megismételtük. A második felülúszót az elsővel egyesítettük. Az extraktumokat bepárlással töményítettük, majd HPLC oszlopra injektáltuk.

35. Példa

Részecskeméret-eloszlás meghatározása foton korrelációs spektroszkópiával (PCS)

A rekonstituált Capxol™-ban a részecskeméret-eloszlást foton korrelációs spektroszkópiás eljárással analizáltuk Malvern Zetasizer (Malvern Instruments Ltd.) készüléken. A Zetasizert NIST kimutatható Nanosphere™ méret standardokkal (Duke Scientific Corporation) kalibráltuk. A Capxol™ részecskeméretének Malvern Zetasizer készüléken történő mérési eljárásához a következő paramétereket állítottuk be:

Hőmérséklet: 20,70°C,

Visszaverési szög: 90°

A diszpergált anyag refrakciós indexe: 1,33

Hullámhossz: 633 nm

Visk. (auto): 0,99

Valódi refrakciós index: 1,59

Imaginárius refrakciós index: 0

A Zetasizer beállítása után a kecs/sec leolvasásokból határozzuk meg a minta azon hígítását, amely egy jó méretmeghatározáshoz szükséges, (a kiinduláshoz a minta egy 200 µl-es részletét mérjük egy küvetába, majd megközelítőleg 2 ml, 0,22 µm-es szűrőn szűrt desztillált vízzel hígítsuk). A küvetát helyezzük a Zetasizerben levő küvetatartóba, és kezdjük meg a mérést. Ahogy a mérést elkezdjük, a Correlator Control kijelzés jelenik meg. A menüből válasszuk ki a sebességmérést. A sebességnek a 100-250 kecs/sec középtartományban kell lennie. Ha a sebesség túl nagy vagy túl kicsi, készítsünk egy másik, hígabb vagy kevésbé híg mintát. A rekonstituált Capxol™ méretét analizáltuk, átlagoltuk, és három automatikus programfuttatás után multimodális analízissel rögzítettük. 25 Capxol™ adag alapján a részecskeméret középértéke 155±23 nm volt.

36. Példa

Polimer burkok mint hordozók polinukleotid szerkezetek, enzimek és vakcinák számára

Amint a génterápia szélesebb körben válik elfogadhatóvá egy életképes terápiás lehetőségként (jelenleg több mint 40 humán gén-transzfer javaslatot engedélyeztek a NIH és/vagy az FDA Felügyeleti Testületei), az egyik gátja ezen terápiás megközelítés megvalósításának az attól való félelem, hogy vírus vektort alkalmazzanak genetikai anyagnak az emberi sejt genomba történő beépítéséhez. A vírusok eredendően toxikusak. Ily módon a vírus vektorok alkalmazása a génterápiában, különösen nem-letális, nem-genetikai betegségek kezelése esetében, elfogadhatatlan.

Sajnos, a vírus vektorok alkalmazása nélkül átvitt plazmidok rendszerint nem épülnek be a célsejt genomjába. Emellett, mint a hagyományos gyógyszereknek, az ilyen plazmidoknak is van egy véges felezési ideje a testben. Így a génterápia (valamint az antiszenz terápia, amely a génterápia fordított formája, ahol a nukleinsavat vagy oligonukleotidot génkifejeződés gátlására vezetik be) megvalósításának általános korlátja, hogy képtelenek vagyunk nukleinsavakat vagy oligonukleotidokat hatékonyan adagolni, mivel ezek a molekulák túl nagyok ahhoz, hogy a sejtmembránon átjussanak.

A DNS-nek, RNS-nek, plazmidoknak, oligonukleotidoknak, enzimeknek és hasonlóknak a fentiekben leírt módon fehérje mikrokapszula burkokba való foglalása elősegítheti azok célzott eljuttatását a májhoz, tüdőhöz, léphez, nyirokmirigyhez és csontvelőhöz. Ily módon, a jelen találmánnyal összhangban, ilyen biológiai anyagok eljuttathatók az intracelluláris helyekre a vírus vektorok alkalmazásával járó veszély nélkül. A készítmény ezen típusa elősegíti a polimer burkoknak közvetlenül a véráramból a RES sejtekbe, intramuszkuláris injekció révén az izomsejtekbe vagy közvetlen injektlás révén a tumorokba történő nem-specifikus felvételt vagy endocitózist. Emellett a nukleáris receptorok elleni monoklonális antitestek a kapszulázott terméknek bizonyos sejttípusok magjához történő eljuttatására is használhatók.

Az olyan betegségek, amelyek ilyen konstrukcióval célba vehetők, többek között a cukorbetegség, májgyulladás, hemofília, cisztás fibrózis, sclerosis multiplex, a rák általában, influenza, AIDS és hasonlók. Például az inzulinszerű növekedési faktor (IGF-1) génje fehérje burkokba foglalható diabéteszes perifériás neuropátia és cachexia kezelése céljából történő adagolásra. A IX faktort és VIII faktort (amely hemofília kezelésére használható) kódoló gén célzottan a májhoz juttatható a jelen találmány szerinti fehérje mikrokapszula burkokba foglalva. A kisviszkózitású lipoprotein (LDL) receptor génje is hasonlóképpen célzottan a májba juttatható ateroszklerózis kezelése céljából a jelen találmány szerinti fehérje mikrokapszula burkokba foglalva.

A jelen találmány gyakorlati megvalósításában használható további gének azok, amelyek újraszületésük a test immunválaszát a rákos sejtekkel szemben. Például olyan antigének, mint a HLA-B7, egy plazmidba foglalt DNS által kódolva, a jelen találmány szerinti fehérje burkokba foglalható közvetlen egy daganatba (például bőrrák esetében) történő injektlás céljára. Ha az antigén már a daganatba került, összegyűjti a tumorspecifikus sejteket, amelyek a citokinek (például az IL-2) szintjét emelik, amelyek viszont a daganatot az immunrendszer támadásának teszik ki.

Egy másik példaként az adeno-társult vírus genom részeket tartalmazó plazmidokat említjük, amelyek a jelen találmány szerinti fehérje mikrokapszula burkokba foglalhatóak. Emellett a jelen találmány szerinti fehérje mikrokapszula burkok terápiás géneknek a CD8⁺ T sejtekhez történő eljuttatására is használhatók, adaptív im-

munterápia céljából különféle daganatokkal és fertőző betegségekkel szemben.

A jelen találmány szerinti fehérje burkokat fertőző betegségek leküzdésére is használhatjuk leadórendszerként egy antiszensz nukleotidnak, például a hepatitis B vírus ellen történő célzott adagolásával. Egy ilyen antiszensz oligonukleotid a hepatitis B vírus poliadenilezési jele elleni 21-mer foszforotioát.

A jelen találmány szerinti fehérje burkokat cisztás fibrózis transzmembrán regulátor (CFTR) gén szállítására is használhatjuk. Azoknál az embereknél, akiknek nincs ilyen génjük, cisztás fibrózis fejlődik ki, amely a jelen találmány szerinti, CFTR gént tartalmazó fehérje mikrokapszula burkok permetté alakításával és közvetlenül a tüdőbe történő inhalálásával kezelhető.

Enzimek is adagolhatók a jelen találmány szerinti fehérje burkok alkalmazásával. Például a DNáz enzim kapszulázható és a tüdőhöz juttatható. Hasonlóképpen ribozimek is kapszulázhatók és a vírus boríték fehérjékéhez vagy vírussal fertőzött sejtekhez juttathatók, ha a polimer burok külsejéhez megfelelő antitesteket kapcsolunk. Vakcinák is befoglalhatók a jelen találmány szerinti polimer mikrokapszulákba, és szubkután, intramuszkuláris vagy intravénás adagolásra alkalmazhatók.

37. Példa

Agytumorok és a medencében levő tumorok helyi kezelése

A kemoterápiás szereknek egy tumor helyére való juttatása hatékony módszer arra, hogy a tumort hosszú időn át a hatóanyag hatásának tegyük ki, minimálisra csökkentve a korlátozó mellékhatásokat. A fentebb tárgyalt biokompatibilis anyagok szintén alkalmazhatók különböző fizikai formákban, így térhálósított vagy nem térhálósított gélek alakjában olyan mátrixok kialakítására, amelyek a gyógyászati hatóanyag komponensét, például a paklitaxel diffúzió és/vagy a mátrix lebomlása révén adják le. A Capxol™ a biokompatibilis anyag egy mátrixban diszpergálható, így a paklitaxelből nyújtott hatóanyagleadású készítményt kapunk az agytumorok és a medencén belüli tumorok, így a petefészekrák és metasztatizáló betegségek kezelésére. Hőmérsékletérzékeny anyagokat is használhatunk diszpergáló mátrixként a találmány szerinti készítményben. Ily módon például a Capxol™-t egy hőmérsékletérzékeny anyag (például poliakrilamidok kopolimerjei vagy polialkilén-glikolok és polilaktid/glikolidok kopolimerjei) folyékony készítményében, amely gél, a tumor helyén injektálhatjuk, és ez a Capxol™ lassú felszabadulását biztosítja. A Capxol™ készítményt a fentebb említett biokompatibilis polimerek mátrixába is diszpergálhatjuk szabályozott hatóanyagleadású paklitaxel készítmények előállítására, amelyek a Capxol™ készítmény (albuminnal kapcsolt paklitaxel) tulajdonságai révén az agyszövetre nézve kisebb toxicitást, valamint kisebb szisztémás toxicitást eredményeznek, amint azt a későbbiekben tárgyaljuk. A Capxol™ vagy a Capxol™-hoz hasonlóan formulált más kemoterápiás szerek egy biokompatibilis polimer mátrixszal készült ilyen kombinációja a kemoterápiás szerek szabályzott helyi leadására használható az agyban és a medencében levő szilárd tumorok (petefészekrák) kezelésére, és más szilárd tumorok helyi kezelésére. Ezek a kombinációs készítmények nem korlátozódnak a paklitaxel alkalmazására, és gyógyászati hatóanyagok széles körével, ezen belül fertőzésellenes szerekkel, immunszuppresszív szerekkel és más kemoterápiás szerekkel is használhatók.

38. Példa

A Capxol™ stabilitása a rekonstitúció után

Üvegfiolákban levő liofilizált Capxol™-t steril normál sóoldattal 1, 5, 10 és 15 mg/ml koncentrációjú ké-

szülményekké rekonstituáltunk, és ezeket szobahőmérsékleten és hűtés közben tároltuk. A szuszpenziókat ilyen körülmények között legalább 3 napig homogéneknek találtuk. A részecskeméret-méréseket több időpontban elvégeztük, és nem találtunk változást a méreteelosztásban. Ilyen körülmények között csapadékkiválást nem tapasztaltunk. Ez a stabilitás váratlan és elkerüli a Taxol®-al járó problémákat, mivel a Taxol® esetében rekonstitúció után az ajánlott 0,6-1,2 mg/ml koncentrációk mellett csapadékkiválás történik.

Emellett a rekonsztitált Capxol™ stabil volt különböző polimer csőanyagok, így teflon, szilasztk, polietilén, tygon és más standard csőanyagok jelenlétében is. Ez egy fontos előny a Taxol®-al szemben, amely csak polietilén infúziós készletek és üveg infúziós edények alkalmazásával adagolható.

39. Példa

A Capxol™ egységdózis formái

A Capxol™-t liofilizált porként megfelelő méretű fiolákban állítjuk elő. Egy kívánt dózis egy megfelelő tartályba tölthető és liofilizálható, így lényegében albumint és paklitaxelt kívánt mennyiségben tartalmazó port kapunk. Az ilyen tartályokban levő port azután steril normál sóoldattal vagy más vizes hígítószerrel a felhasználás időpontjában a megfelelő térfogatra rekonsztituáljuk, így a paklitaxelnek a hígítószerrel készült szuszpenzióját kapjuk. Ez a rekonsztitált oldat a betegnek injekció vagy infúzió formájában standard i.v. infúziós készletek segítségével közvetlenül adagolható.

Emellett a Capxol™-t fagyasztott, felhasználásra kész oldatok formájában is előállíthatjuk üvegekben vagy zsákokban, amelyek az alkalmazás időpontjában felengedhetők és a betegnek egyszerűen adagolhatók. Ez az előállítási eljárás elkerüli a liofilizálási lépést.

Nagyon meglepő, hogy amikor a Capxol™-t és Taxol®-t a paklitaxel ekvivalens dózisaiban patkányoknak adagoljuk, sokkal nagyobb mértékű mieloszuppresszió figyelhető meg a Taxol® csoportban, mint a Capxol™ csoportban. Ez a fertőzések és lázas epizódok (például lázzal járó neutropénia) ritkábban történő fellépését eredményezheti. Ez a kezelések közötti ciklusidőt is csökkentheti, ami jelenleg 21 nap. A jelen találmány szerint előállított gyógyászati készítmények alkalmazásával ez a ciklusidő 2 hétre vagy rövidebbre csökkenthető, ami a rák hatékonyabb kezelését teszi lehetővé. Ily módon a jelen találmány szerint előállított gyógyászati készítmény alkalmazása lényeges előnyöket nyújthat a Taxol®-al szemben.

40. Példa

Hatóanyagok orális adagolása

A Taxol® orálisan adagolva nagyon rosszul szívódik fel. A részecskékből álló készítmények, mint a Capxol™, nagy mértékben fokozhatják a hatóanyagok, így például a paklitaxel felvételét. Emellett a mikroemulziós/bepárlásos eljárással előállított találmány szerinti paklitaxel készítmények a hatóanyagok orális felvételére használhatók. A felületaktív anyagok alkalmazása ezekkel a készítményekkel kombinációban meglepően fokozza ezen hatóanyagok orális adagolási követő biológiai hasznosíthatóságát. Lipidek, felületaktív anyagok, enzimgátlók, áthatolást elősegítő anyagok, ionpárosító szerek, anyageseregátlók és hasonló alkalmazása meglepő módon növelte a találmány szerinti paklitaxel készítmények orális felszívódását. Ionpárosító szerek például, de nem kizárólag, a triklór-acetát, triklór-acetát-szalicilát, naftalinszulfonsav, glicin, bisz(N,N-dibutil-amino-étilén)-karbonát, n-alkil-szulfonátok és az n-alkil-szulfátok. A membránon való átjutást fokozó anyagok többek között, de nem kizárólag a nátrium-kaprát, acil-gliceridek, polioxietilén-alkil-éter-szecil-karnitinek, ná-

rium-kolát, nátrium-taurokolát, nátrium-taurodihidrofüzidát, EDTA, nátrium-szalicilát és a nátrium-metoxiszalicilát. A találmány szerinti készítményekben használható felületaktív anyagok és lipidek nem korlátozó listáját már korábban leírtuk.

41. Példa

A Capxol™ és más hatóanyagok találmány szerinti készítményének adagolási módja

A találmány szerinti készítményeket intravénás infúzió, intravénás bőlusz, intraperitoneális injekció, intraarteriális injekció, intraportális injekció, májembolizáció, tumorba adott injekció vagy implantáció, intrauretrális injekció vagy iontoforézis, intramuszkuláris injekció, szubkután injekció, intratekális injekció, száraz por vagy folyadékpermet inhalációja formájában adagolhatjuk.

42. Példa

Capxol™ alkalmazása angiogén erezet megcélzására

Az angiogenezist betegségek, így a rák, reumaszerű (zületi) gyulladás és retinopátia okozati és/vagy súlyosító tényezői közé sorolják. Meglepő módon azt találtuk, hogy a Capxol™ megfordíthatja a reumaszerű ízületi gyulladást vagy csökkentheti annak súlyosságát, valamint gyógyítja a tumorokat állat modellekben. Ezért lehetséges, hogy a Capxol™ antiangiogén hatással rendelkezik. A Capxol™ még hatásosabbá tétele érdekében lehetséges az angiogén vaszkulátúra oly módon történő megcélzása, hogy megfelelő peptideket kapcsolunk a Capxol™-hoz. Egy ilyen peptid például az RGD (arginin-glicin-aszparaginsav). Számos hasonló hatású peptid kapcsolható a Capxol™-hoz vagy más, a jelen találmány szerinti eljárással előállított hatóanyagokhoz célzott terápiás felhasználásra. A peptid/Capxol™ hagyományos módon adagolható az ilyen kezelést igénylő betegeknek.

43. Példa

Capxol™ alkalmazása májbetegség kezelésére

A hepatocelluláris karcinóma és más rákos májbetegségek utolsó stádiuma Capxol™ intraportális adagolásával kezelhető. A közvetlenül a májba történő embolizáció nagymértékben növeli a májat elérő dózisokat. Emellett a hagyományos Taxol® dózisoknál sokkal nagyobb dózisok használhatók a betegség hatékonyabb kezelésére. Megfelelő célhajuttató szerek, így olyan fehérjék vagy peptidok, amelyek a májszövetben lokalizálódnak, szintén kombinálhatók a Capxol™-al a nagyobb terápiás hatékonyság érdekében.

44. Példa

A paklitaxel toxicitási/mielosuppressziós vizsgálata - a Taxol® és a Capxol™ összehasonlítása egyetlen dózis adagolásával patkányokban végzett vizsgálatban

A preklinikai vizsgálat összefoglalását az alábbiakban adjuk meg.

Adagolási rend:	1x, egyetlen dózis intravénás infúziója (1. nap)
Állatok:	Sprague-Dawley patkányok, 40 hím, 40 nőstény, 5 patkány/nem/csoport
Testtömeg:	300 ± 50 g
A vizsgálat időtartama:	15 nap
Kezelési csoportok:	Taxol® (1 vivőanyag + 3 kezelt csoport) Capxol™ (1 vivőanyag* + 3 kezelt csoport)
Dózisok:	Taxol® (0, 3, 6 és 9 mg/kg) Capxol™ (0, 6, 9 és 12 mg/kg)
Dózis-koncentráció:	0,6 mg/ml (minden patkány esetében)

Dózistérfogat:	Taxol® (15, 5, 10, 15 ml/kg) Capxol™ (20, 10, 15 és 20 ml/kg)
Infúzió-sebesség:	megközelítőleg 0,75 ml/óra (minden patkányesetében)
A dózis adagolási módja:	I.V. infúzió, farokvéna
Klinikai megfigyelés:	1x/nap
Klinikai patológia:	0. nap (a kezelés előtt), 1., 3., 7., 11. és 15. nap. Standard lista készítése az NCI Toxikológiai Intézete számára
Testtömegek:	-1., 1., 3., 8. és 15. nap

(* a vívőanyagot az előállítási részben leírttal azonos eljárással készítettük, azzal az eltéréssel, hogy a paklitaxel hozzáadását elhagytuk.)

45. Példa

Kísérleti mieloszuppresszió (hematológiai toxicitás) vizsgálata

A formális vizsgálat megkezdése előtt egy kísérleti vizsgálatot végeztünk 3 patkánnyal a Capxol™ csoportban és 3 patkánnyal a Taxol® csoportban, a végeredmény meghatározására. Az alkalmazott dózis 5 mg/kg volt 7 ml/kg adagolási térfogatban. A dózist intravénás bólusz formájában a farokvéna keresztül adtuk be. Ennek a vizsgálatnak az eredményeit a 3. ábrán látható rajzon foglaljuk össze, amely a fehérvérsejt-számban (WBC) (a mieloszuppresszió indikátorában) bekövetkezett változást mutatja mindegyik készítményre vonatkozóan, az idő függvényében.

A kísérleti mieloszuppressziós vizsgálat következtetései:

Az adatok jelentősen alacsonyabb WBC értékeket mutatnak a Taxol® csoportban, mint a Capxol™ csoportban, ami nagyobb mértékű mieloszuppresszióra utal a Taxol® esetében (a maximális WBC szuppresszió a Taxol® esetében >70%, a maximális WBC szuppresszió a Capxol™ esetében < 30%). Az adatok analízise statisztikailag szignifikáns különbséget (paklitaxel < 0,05) mutat a két csoport között - a 0., 13. és 14. nap kivételével - minden időpontra vonatkozóan. Emellett a WBC normális szintjei 6 napon belül helyreállnak a Capxol™ csoportban, míg a normális WBC értékek helyreállításához 14 napra van szükség a Taxol® csoportban. Ez jelentősen csökkent hematológiai toxicitásra utal a Capxol™ esetében. Ha hasonló eredményeket kapunk a humán klinikai kipróbálás során, ezek az adatok azt feltételezhetik, hogy az egymást követő kezelések közötti ciklusidő (ami jelenleg 3 hét a Taxol® esetében) jelentősen csökkenthető (feltehetően 2 hétre vagy még inkább 1 hétre vagy rövidebb időre) Capxol™ alkalmazásakor.

46. Példa

Daganatellenes hatás kísérleti vizsgálata

A fenti vizsgálat megkezdése előtt egy kísérletet végeztünk Capxol™-al a céldózis-tartomány és hatékonyság meghatározására. Az egerekbe (n = 10) szubkután MX-1 emlőtumort implantáltunk, és a kezelést akkor kezdtük, amikor a tumor mérete elérte a 150-300 mg nagyságot. Ez a 12. napon történt, és a kezelést a beültetést követő 13. napon kezdtük meg. Capxol™-t sóoldatban rekonstitúáltunk, így paklitaxel nanorészecskék kolloid oldatát kaptuk. A daganatos egereknek (n = 5) rekonstitúált Capxol™-t adtunk 20 mg/g dózisban (VIV-1-ként jelöltük), amit bóluszként adtunk be a farokvénaiba egymást követő öt nap mindegyikén. A kontroll daganatos állatok (n = 5) csak sóoldatot kaptak ugyanilyen adagolási rendben. A tumorok méretének időbeli változását fi-

gyeltük. A kontrollesoport roppant nagy növekedést mutatott a tumor tömegében, a tumor tömegének középértéke meghaladta a 4500 mg-ot, és ebben a csoportban minden állatot a 28. és 39. nap közötti időben leöltünk. A kezelt csoportban viszont figyelemreméltó hatékonyságot tapasztaltunk, és egyik állatnak sem volt mérhető daganata a 25. napon. Az ebben a csoportban levő állatok mindegyikét a 39. napon öltük le, amikor sem a tumor kiújulása sem tumor nem volt látható. Az eredményeket a 4. ábra mutatja.

Következtetés:

Ez a vizsgálat a CapxolTM figyelemreméltó daganatellenes hatását mutatta. Így a CapxolTM készítmény a paklitaxel daganatellenes hatását megtartotta. Ez a vizsgálat arra utal, hogy a paklitaxel nanorészecskéinek intravénás adagolása ugyanolyan hatékony lehet, mint a hatóanyag oldott formában történő adagolása. Ily módon a CapxolTM hatékonyságot és jelentős daganatellenes hatást mutat az engedélyezett és forgalomban levő, cremophor-tartalmú Taxol[®] készítmény toxikus hatása nélkül.

Megjegyzés: Az irodalmi adatok és az SRI (Southern Research Institute) tudósainak tapasztalata alapján megállapítottuk, hogy a paklitaxelnek a 12-es oldószerrel (cremophor/etanol) készült oldatában, amely oldószer azonos a Taxol[®]-ban használt hígítószerrel, a maximális tolerált dózisa (MTD) 22,5 mg/kg ezen speciális atímiás egértörzs esetében. Ezt az eredményt úgy kaptuk, hogy a paklitaxelből sokkal nagyobb koncentrációjú (6 mg/ml cremophor/etanol elegyben) oldatot készítettünk a 12-es hígítószerrel, mint amilyen a Taxol[®]. Ezt azért tettük, hogy minimálisra csökkentsük az egérnek beadott cremophor/etanol mennyiséget a vehikuláris toxicitás elkerülésére. 22,5 mg/kg dózisban a paklitaxel a 12-es hígítószerben hasonló hatékonyságú, mint a CapxolTM fentebb.

47. Példa

Reumaszerű ízületi gyulladás kezelése paklitaxel nanorészecskékkel egy állatmodellben

A kollagénnel indukált ízületi gyulladás modellét használtuk Louvain patkányban a paklitaxel nanorészecskéinek az ízületi gyulladásra gyakorolt terápiás hatásának vizsgálatára. A kísérleti állatok mancsméretének változását követtük az ízületi gyulladás súlyosságának értékelésére.

Miután az ízületi gyulladás teljes mértékben kifejlődött (általában a kollagén injekciót követő 9-10. napon), a kísérleti állatokat különböző csoportokba osztottuk, amelyek paklitaxel-nanorészecskéket kaptak 1 mg/kg q.o.d vagy paklitaxel- nanorészecskéket 0,5 mg/kg dózisban és prednizont 0,2 mg/kg q.o.d (kombinációs kezelés) dózisban intraperitoneálisan 6 dózist, majd heti egy dózist három héten át. A mancsméreteket a kezelés kezdetekor (0. nap) és minden alkalommal megállapítottuk, amikor hatóanyagot injektáltunk. Egy csoport csak normál sóoldatot kapott kontrollként. A kísérlet végén a paklitaxel nanorészecskékkel kezelt állatoknál a mancsméret 42%-kal csökkent, a kombinációs kezelésben részesülők mancsmérete 33%-kal csökkent, míg a kontroll csoportban körülbelül 20%-kal nőtt. Az eredeti mancsméret az ízületi gyulladás kiváltása előtt 50% volt. Az eredmények a 2. ábrán láthatók.

Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a paklitaxeltartalmú nanorészecskék terápiás hatást fejtettek ki az ízületi gyulladásra. A paklitaxel és szteroid hosszú időn át történő alkalmazása esetén a mellékhatás elkerülésére feltehetően jobb egy kombinációs kezelést választani, amivel hasonló eredményt érhetünk el, de mindkét hatóanyagból csak feleakkora dózist használva.

48. Példa

Capxol™ hatása artéria-resztenózisra

A kardiovaszkuláris rendellenességekkel, így az ateroszklerózissal, magas vérnyomással és a legtöbb endovaszkuláris eljárással abnormalis vaszkuláris simaizom proliferáció (VSMP) jár. Az abnormalis VSMP a perkután transluminális koszorúsér műtétek (PTCA) gyakori komplikációja. Arról számoltak be, hogy a PTCA-t követő VSMP eredményeként a krónikus resztenózis fellépése 40-50% 3-6 hónapon belül.

A PTCA-val társuló érelzáródások nagyszámú előfordulása a resztenózis *in vivo* állati modelljének és olyan vegyületek kifejlesztéséhez vezetett, amely vegyületek a resztenózis fellépését megakadályozzák. A következő vizsgálat leírja a Capxol™ alkalmazását az artéria intimális traumáját követő resztenózis gátlásában.

350-400 g testtömegű Sprague-Dawley patkányokat (Charles River) ketaminnal és rompunnal érzéstelenítettünk, és a jobb közös nyaki artériát 3,0 cm távolságra kiemeltük. A hozzátapadt szövetet letisztítottuk, hogy két Dietrich mikro bulldog csipeszt helyezzünk körülbelül 2 cm távolságban a nyaki artéria köré a bolygóidegek vagy a kapcsolódó felső nyaki idegdúc és szimpatikus idegköteg megsértése nélkül. Az ér ezen szakasza mentén nincsenek elágazások. Egy háromállású csaphoz kapcsolt 30-as tűt szúrtunk be és azután az elkülönített szegmens alsó végén húztunk ki, hogy az ér falán egy lyukat csináljunk, majd a felső végen ismét bedugtuk injektálás céljára. 2-3 ml foszfáttal pufferezt sóoldatot injektáltunk az érbe az elkülönített szegmens belsejében levő vér kimosására, majd a 3-állású csapot egy másik helyzetbe fordítva nyomás alatti levegő szabályzott forrásával kapcsoltuk össze. Gyenge légáramot (25 ml/perc) vezettünk az érlumen mentén 3 percig, ezáltal az endoteliumon szártásos sérülést okoztunk. A szegmenst sóoldattal telítettük, majd a tűt az érből eltávolítottuk. A csipeszek levétele előtt az érfalon levő lyukakat gondosan kiégettük a vérzés megállítására. Egy sóoldatba mártott vattapamacsot is rányomhatunk a tű által ejtett lyukakra a vérzés megállítására. A bőrt 7,5 mm-es fémcsipesszel zártuk össze és betadinnel mostuk. Minden állatot megműtöttünk a fenti módon, és a műtétet követő 14. napon leöltük. A nyaki artériákat mindegyik oldalon kivettük patológiai vizsgálatra. A nem-műtött oldal szolgált kontrollként. A kísérleti csoportok a következő kezelést kapták:

1. csoport: nagy Capxol™ dózissal végzett kezelés:

paklitaxel 5 mg (w/100 humán albumin)/kg/hét, I.V.

2. csoport: kis Capxol™ dózissal végzett kezelés:

paklitaxel 1 mg (w/20 mg humán albumin)/kg/hét, I.V.

3. csoport: Hatóanyag-hordozóval kezelt kontroll:

humán albumin 100 mg/kg/hét I.V.

A nyaki artériából vett biopsziás mintákat formalinban tartósítottuk, és 8 µm-es metszeteket készítettünk paraffin blokkokból, és a metszeteket hematoxilinnel és eozinnal festettük. A vérerek rétegeinek keresztmetszeti területeit (intima, media és adventitia) mennyiségileg meghatároztuk.

A sérült nyaki artériák a kontroll csoportban figyelemreemlő intimális simaizomsejt-akkumulálódást és VSMC inváziót mutattak az alapmembránban. A nyaki artériák teljes vastagsága megkétszereződött. A kezelt csoportok statisztikusan szignifikáns csökkenést mutattak az intimális falvastagodás tekintetében a kontrollhoz viszonyítva.

49. PéldaNanorészecskék *in vivo* célbajuttatása

Bizonyos célbajuttató részeket, így fehérjéket, antitesteket, enzimeket, peptidokat, oligonukleotidokat, cukrokat, poliszacharidokat foglalhatunk a nanorészecskék fehérje bevonatába, így a test bizonyos helyeit megcélozhatjuk. Ezt a célbajuttató képességet terápiás és diagnosztikai célokra használhatjuk.

50. PéldaPolimer burkok antitesttel történő célbajuttatása

A találmány bizonyos vonatkozása szerinti polimer burkok természete lehetővé teszi, hogy a polimer burkokhoz monoklonális vagy poliklonális antitesteket kapcsoljunk, vagy hogy antitesteket a polimer burkokba foglaljunk. Az antitesteket akkor foglalhatjuk a polimer burkokba, amikor a polimer mikrokapszula burkot előállítjuk, vagy antitesteket kapcsolhatunk a polimer burkokhoz annak előállítása után. Standard fehérje immobilizációs eljárásokat használhatunk erre a célra. Például egy fehérjéből, így albuminból készült fehérje mikrokapszula esetében az albumin lizincsoportján számos aminos csoport áll rendelkezésre megfelelően módosított antitestek hozzákapsolására. Példaként említjük, hogy egy daganatellenes szer egy daganathoz szállítható, ha a tumorellenes antitesteket a polimer burkokba foglaljuk annak előállítása során, vagy az tumorellenes antitesteket a polimer burkokhoz kapcsoljuk annak előállítása után. Egy másik példát említve, gén termékek juttathatók el specifikus sejtekhez (például hepatociták vagy bizonyos törzsejtek a csontvelőbe) oly módon, hogy a célsejteken levő receptorok elleni antitesteket foglalunk a polimer burkokba annak előállításakor, vagy a célsejteken levő receptorok elleni antitesteket kapcsolunk a polimer burkokhoz annak előállítása után. Emellett nukleáris receptorok elleni monoklonális antitestek is használhatóak a kapszulázott terméknek bizonyos sejttípusok magjaihoz való juttatására.

51. PéldaImmunszuppresszív szer transzplantált szervekhez juttatása ilyen szereket tartalmazó polimer burkok intravénás adagolásával

Az immunszuppresszív szereket kiterjedten használják szerv-átültetéseket követően a kilöködés megelőzésére. Közlebből, a ciklosporin egy hatásos immunszuppresszív szer, és meghosszabbítja az allogén transzplantátumok, ezen belül a bőr, szív, vese, hasnyálmirigy, csontvelő, vékonybél és tüdő túlélését állapotokban. A ciklosporinról kimutatták, hogy visszaszorít bizonyos humorális immunitást és nagyobb mértékben sejt által közvetített reakciókat, így az allograft kilöködések, késleltetett túlérzékenységet, kísérletes allergiás agyvelőgyulladást, Freund-féle adjuvánssal kiváltott ízületi gyulladást és graft versus host betegséget számos állatfajban, különböző szervek esetében. Sikeres vese, máj és szív allogén átültetéseket végeztek emberekben ciklosporin alkalmazásával.

A ciklosporin jelenleg orálisan adagolható formában, kapszulák alakjában, amely kapszula a ciklosporin alkoholos oldatát és olajakat, így kukoricaolajat, polioxietilezett glicerideket és hasonlókat tartalmaz, vagy olívaolajjal, polioxietilezett gliceridekkel és hasonlókkal készült oldat formájában kerül forgalomba. Intravénás injekció formájában is adagolják, amely esetben megközelítőleg 30%-os etanolos oldatot állítanak elő, ez az oldat cremophort (polioxietilezett ricinusolajat) tartalmaz, és normál sóoldattal vagy 5%-os dextróoldattal 1:20 - 1:100 arányban hígítandó injektálás előtt. A intravénás (i.v.) infúzióhoz viszonyítva az orális oldat abszolút bio-

lógiai hasznosíthatósága megközelítőleg 30% [Sandoz Pharmaceutical Corporation, Publication SDI-Z10 (A4), 1990]. Általában a ciklosporin i.v. adagolása hasonló problémákkal jár, mint amilyeneket a Taxol® intravénás adagolásánál megfigyeltek, azaz feltehetően a cremophor következtében, amelyet az i.v. készítményben vivőanyagként használnak, anafilaxiás és allergiás reakciók lépnek fel. Emellett az itt leírt formában kapszulázott hatóanyag (például a ciklosporin) intravénás adagolása elkerüli a veszélyes csúcs-vérszinteket, amelyek közvetlenül a hatóanyag adagolása után jelentkeznek. Például a jelenleg forgalomban levő ciklosporin készítmények és a fentebb leírt módon kapszulázott ciklosporin összehasonlítása ötszörös ciklosporin csúcs-vérszint csökkenést mutatott közvetlenül az injektlás után.

A cremophorral járó problémák elkerülésére a ciklosporint a fentebb leírt polimer burkokban adagolhatjuk i.v. injekció formájában. A hatóanyagot feloldhatjuk egy biokompatibilis olajban vagy számos más oldószerben, ami után a hatóanyag polimer burkokba diszpergálható szonikálással, a fentebb leírt módon. Emellett a ciklosporinnak (vagy más immunszuppresszív szernek) polimer burkokban való adagolása azzal a fontos előnnyel jár, hogy az injektált anyag a májban levő RES rendszer által történő felvételének köszönhetően a megfelelő helyre juttatható. Ez - bizonyos mértékben - elkerüli a szisztémás toxicitást és csökkenti a hatásos dózisokat a megfelelő helyre történő juttatás következtében.

52. Példa

Capxol™ alkalmazása antitest célbajuttatására

Különböző daganatok vagy szövetek elleni monoklonális antitestek a Capxol™-hoz kapcsolhatók, hogy lehetővé tegyék a Capxol™-nak vagy más, találmány szerinti eljárással előállított hatóanyagoknak a betegség helyeire való eljuttatását. Például petefészekrák elleni antitestek a Capxol-hoz kapcsolva és intraperitoneálisan adagolva jótékony hatást fejtenének ki a petefészekráktól szenvedő betegekre.

53. Példa

Terápiás szerek intravénás adagolása

Terápiás szerek, például hatóanyagok, leképező szerek és hasonló intravénás adagolása a terápiás szereket legalább egy alkalommal a májon való áthaladásnak teszi ki. Amint ez a terápiás szer átszűrődik a májon, a szer egy jelentős részét a máj felveszi és elkülöníti, és ez a rész a szisztémás eloszlás szempontjából már nem hasznosítható. Emellett a szer, ha egyszer a máj már felvette, valószínűleg metabolizálódik, és a képződött anyagcseretermékek gyakran általános szisztémás toxicitással rendelkeznek. A hatóanyagnak vagy más terápiás szernek egy találmány szerinti (például fehérje, így albumin alkalmazásával) egy kapszulába történő foglalásával az intravénás adagolást követő máj általi elválasztás enyhíthető. Az albuminról például ismert, hogy áthalad a májon, és általánosan eloszlik a betegben. Ily módon az albumin máj általi elkülönítése nem fordul elő ugyanolyan mértékben, mint a toxikus vegyületeké vagy hatóanyagoké, amelyek májreceptorokkal (vagy más mechanizmussal) rendelkeznek, amelyek olyan folyamatokat váltanak ki, amelyek következtében ezek a véráramból eltávolításra kerülnek. Ha a terápiás szert egy biokompatibilis polimer (például humán albumin) bevonattal védjük, a hatóanyag áthalad a májon, és általánosan eloszlik a rendszer minden szervében. A jelen találmány egyik vonatkozásának megfelelően új eljárást bocsátunk rendelkezésre a máj elkerülésére, amelyre jellemző, hogy egy hatóanyagot humán máj albuminba (lényegében egy fiziológiai komponensbe) foglalunk. Ily módon a hatóanyagból több válik hasznosíthatóvá a szisztémás terápia számára. A hatóanyag megnövekedett hasznosíthatósága

ga mellett csökken a hepatocelluláris hatóanyaglebontásból származó anyagcsere-melléktermékek termelése. A máj elkerülésének növekedése és a hatóanyagmetabolizmus melléktermékeinek csökkenése szinergetikus javulást hoz a hatóanyag összességében veit hatékonyságában. Ez a javult hatékonyság minden hatóanyagra és anyagra kiterjed, amely humán albuminba van kapszulázva.

54. Példa

Hatóanyagok mieloszuppresszív hatásainak (hematológiai toxicitásának) és általános toxicitásának csökkentése

Néhány kemoterápiás hatóanyag a saját mieloszuppresszív hatása miatt dóziskorlátozó toxicitással rendelkezik. Az ilyen gyógyszerek klaszikus példája a Taxol® (paklitaxel). Amikor a jelenleg engedélyezett, cremophorral és etanollal készült készítmény formájában, Taxol®-ként kerül adagolásra, mieloszuppresszív hatást fejt ki, amely korlátozza a hatóanyag ismételt adagolását, és kizárja a beteg ismételt kezelését legalább 3 hétre, amíg a beteg vérszáma visszatér a normális értékre. Feltételeztük, hogy a jelen találmány bizonyos vonatkozásának megfelelő hatóanyaghordozó (a humán albumin) nem-toxikus, biokompatibilis természetének köszönhetően a mieloszuppresszió toxikus mellékhatása nagy mértékben csökkenthető.

Sprague-Dawley patkányoknak paklitaxelt adagoltunk a kereskedelembe kapható készítménybe foglalva (Taxol®) vagy egy találmány szerinti eljárással albuminnal készült nanorészecskék formájában. Mindkét készítményt a farokvénaiba injektálva adagoltuk. A Taxol® formában beadott egyetlen dózisszint 5 mg/kg volt, míg a találmány szerinti készítmény formájában beadott két dózisszint 5 mg/kg és 12 mg/kg volt. A mieloszuppresszió mutatószámaként a patkányok fehérvérsejtszámát naponta meghatároztuk.

A Taxol® (5 mg/kg) esetében azt találtuk, hogy a WBC 47,6%-kal és 63,5%-kal csökkent az 1. és a 2. napon az adagolás után, míg a találmány szerinti készítmény esetében az 5 mg/kg dózissal a WBC 14,7%-kal illetve 2,4%-kal nőtt az 1. illetve a 2. napon. A nagyobb, 12 mg/kg dózist tartalmazó találmány szerinti készítmény esetében a WBC érték 6,5%-kal illetve 3,6%-kal nőtt az 1. illetve a 2. napon.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a rövid idejű mielo-szuppressziót nagy mértékben csökkenti a hatóanyag jelen találmány szerinti készítményben történő adagolása.

Az általános toxicitás másik indikátora az állat testtömege. A patkányok testtömegének változását is követtük paklitaxel adagolása után. Az 5 mg/kg Taxol® beadása után a testtömeg 10,4%-kal csökkent a beadást követő 3 nap alatt, míg ugyanez a paklitaxel dózis a jelen találmány szerinti készítményben beadva a testtömegnek csak 3,9%-os csökkenését idézte elő, ami a jelen találmány szerinti készítmény nagy mértékben csökkent toxicitását mutatja.

Nagyon meglepő, hogy amikor a találmány szerinti készítményt és a Taxol®-i patkányoknak azonos paklitaxel dózisban adagoljuk, sokkal nagyobb mértékű mieloszuppresszió figyelhető meg a Taxol® csoportban a találmány szerinti készítménnyel kezelt csoporthoz viszonyítva. Ez a fertőzések és a lázas epizódok (például a lázzal járó neutropénia) ritkább előfordulását is eredményezheti. Ez redukálhatja a ciklusidőt is a kezelések között, ami jelenleg 21 nap a Taxol® esetében. A jelen találmány szerint előállított gyógyászati készítmények alkalmazásával ez a ciklusidő 2 hétre, 1 hétre vagy ennél is kevesebbre csökkenthető, ami a rákbetegségek hatékonyabb kezelését teszi lehetővé. Ily módon a jelen találmány szerint előállított gyógyászati készítmények alkalmazása lényeges előnyöket biztosíthat a Taxol® alkalmazásával szemben.

55. Példa

Nanorészecske készítmény bőlusz dózisának adagolása

A rákellenes szer, a paklitaxel a kereskedelembe kapható, cremophorral és etanollal előállított BMS készítménye formájában nem adagolható intravénás bőluszként. Ez a vívóanyag kiterjedt toxicitásának a következménye, ami súlyos anafilaxiás reakciókat okoz és szükségessé teszi, hogy a betegeket a hatóanyag beadása előtt szteroidokkal, antihisztaminokkal és hasonlókkal előkezeljék. A Taxol® készítményt intravénás infúzió alakjában adagolják, ami valahol 1 és 24 óra közötti ideig tart. Ezzel szemben a jelen találmány szerinti készítmények a nemtoxikus hordozó alkalmazása következtében intravénás bőluszként (azaz 1 óránál rövidebb idő alatt) könnyen beadhatók a jelenleg a klinikákon használt Taxol®-nál fellépő toxicitási problémák nélkül.

A paklitaxel hatásos dózisa egy beteg esetében jellemzően 200 és 500 mg között van a beteg testtömegétől és testfelszínétől függően. A Taxol®-t 0,6 mg/ml végkoncentrációban adagolják, ami nagy (jellemzően körülbelül 300-1000 ml) infúziós térfogatokat tesz szükségessé. Ezzel szemben a találmány szerinti készítményeknél nincs ilyen korlátozás, és a kívánt koncentrációban adagolhatók. Ez lehetővé teszi az orvos számára, hogy a beteget egy rövid intravénás bőlusszal kezelje, amely akár néhány perc alatt beadható. Például, ha a találmány szerinti készítményt egy 20 mg/ml adagolási koncentrációra rekonstituíjuk, a 200-500 mg-os dózis infúziós térfogata csak 10-25 ml. Ez igen nagy előny a klinikai gyakorlatban.

56. Példa

A paklitaxel toxicitásának csökkenése a nanorészecske készítményben a Taxol-hoz viszonyítva

Jól ismert, hogy a rákellenes szer, a paklitaxel, a kereskedelembe kapható készítménye (azaz Taxol®) formájában kiterjedt toxicitással rendelkezik, amely súlyos anafilaxiás reakciókat vált ki és szükségessé teszi, hogy a hatóanyag beadása előtt a beteget szteroidokkal, antihisztaminokkal és hasonlókkal előzetesen kezeljék. A Taxol® toxicitását a jelen találmány szerinti nanorészecske-készítményéhez hasonlítottuk.

A készítményeket intravénásan C57BL egerek farokvénájába injektáltuk különböző dózisszinteken, és a toxikus hatást az egerek injektálás utáni általános megfigyelésével követtük.

A Taxol® esetében egy 30 mg/kg-os dózis egyformán halálos volt az intravénás adagolást követő 5 percen belül. Ugyanez a dózis a találmány szerinti készítmény esetében nem mutatott

nyilvánvaló toxikus hatást. A nanorészecske-készítmény 103 mg/kg dózisban bizonyos mértékben csökkentette az egerek testtömegét, de még ez a nagy dózis sem volt halálos. A körülbelül 1000 mg/kg, 800 mg/kg és az 550 mg/kg dózisok mindegyike halálos volt, de a halál bekövetkezésének ideje különböző volt, néhány óra és 24 óra között változott. Így a találmány szerinti készítmény letális dózisa 103 mg/kg-nál nagyobb, de 550 mg/kg-nál kisebb.

Ezért világos, hogy a találmány szerinti paklitaxel készítmény letális dózisa lényegesen nagyobb, mint a Taxol®-é. Ennek nagy jelentősége van a klinikai gyakorlatban, ahol a kemoterápiás szerek nagyobb dózisa adagolható a nagyobb onkolitikus aktivitás elérése, nagy mértékben csökkent toxicitás mellett.

57. Példa

A találmány szerinti eljárással készült Capxol™ és a Taxol® LD₅₀ értékének meghatározása egerekben egyetlen intravénás adagolást követően

A Capxol™, Taxol® és hordozóanyagaik LD₅₀ értékét hasonlítottuk össze egyetlen intravénás adagolást követően. Összesen 48 CDI egeret használtunk a kísérlethez. A Capxol™-ból 30, 103, 367, 548 és 822 mg/kg, a Taxol®-ból 4, 6, 9, 13,4 és 20,1 mg/kg paklitaxel dózisokat vizsgáltunk. A Capxol™ vivőanyagát, a humán albumint csak 4,94 g/kg dózisban vizsgáltuk (ami 548 mg/ml Capxol™ dózisnak felel meg), mivel a humán albumint nem tekintjük emberre nézve toxikusnak. A Taxol® vivőanyagát (Cremophor EL®) 1,5, 1,9, 2,8 és 3,4 ml/kg dózisban vizsgáltuk, amely 9, 11,3, 16,6 és 20,1 mg/kg paklitaxel dózisnak felelt meg. Mindegyik dózist 3-4 egéren vizsgáltuk. Az eredmények azt mutatták, hogy a Capxol™-ban adagolt paklitaxel kevésbé toxikus, mint a Taxol®-ban adagolt vagy a Taxol® vivőanyaga magában beadva. Az LD₅₀ és LD₁₀ érték a Capxol™ esetében 447,4 és 371,5 mg/kg paklitaxel, a Taxol® esetében 7,53 és 5,13 mg/kg paklitaxel, és a Taxol® hordozója esetében 1325 és 794 mg/kg (ami 15,06 és 9,06 mg/kg paklitaxel dózisnak felel meg). Ebben a vizsgálatban a Capxol™ LD₅₀ értéke 59-szer nagyobb a Taxol®-énál és 29-szer nagyobb a Taxol® vivőanyagáénál önmagában. A paklitaxel LD₁₀ értéke a Capxol™-ban 72-szer nagyobb, mint a Taxol®-ban. Az ebben a vizsgálatban kapott összes adat elemzése azt feltételezi, hogy a Taxol® toxicitásaért főképpen a Taxol® vivőanyaga felelős. Látható volt, hogy a Taxol®-t és Taxol®-vivőanyagot kapott egerek a súlyos túlérzékenység klasszikus jeleit mutatták, élénk-rózsaszín bőrelszíneződés röviddel a beadás után. Ilyen reakciót nem láttunk a Capxol™ és a Capxol™-vivőanyag csoportokban. Az eredményeket a 2. táblázatban foglaljuk össze.

2. táblázat

Csoport	Egyetlen intravénás adagolás					
	Dózis mg/kg	Az állatok száma	Az elhalt állatok száma	A túlélők %-a	LD ₅₀ mg/kg	MTD vagy LD ₁₀ mg/kg
Capxol™	822	3	3	0	447,4	371,5
	548	4	4	0		
	367	3	0	100		
	103	3	0	100		
	30	3	0	100		
Taxol®	20,1	4	4	0	7,53	5,13
	13,4	4	4	0		
	9	3	2	33		
	6	4	1	75		
	4	3	0	100		

Ezeket a nagy Capxol™ dózisokat bólusz injekciók formájában adtuk be, és ezek emberben megközelítőleg 80-2000 mg/m²-nek felelnek meg. Az LD₁₀ érték vagy a maximálisan tolerált Capxol™ dózis ebben a vizsgálatban emberre vonatkoztatva megközelítőleg 1000 mg/m². Ez jelentősen nagyobb, mint a Taxol® esetében

engedélyezett 175 mg/m² humán dózis.

Meglepetésünkre azt találtuk, hogy a cremophor/etanol vívőanyag önmagában súlyos túlérzékenységi reakciókat és halált okozott az egerek néhány dóziscsoportjában. A Taxol® vívőanyagára magára vonatkozó LD₅₀ adatok azt mutatják, hogy jelentősen toxikusabb, mint a Capxol™, és jelentősen hozzájárul a Taxol® toxicitásához. Az irodalomban nem volt világos a túlérzékenység oka, azonban ezen adatok alapján mi azt gondoljuk, hogy a túlérzékenységi reakciók a Taxol® vívőanyagának tulajdoníthatók.

58. Példa

A Capxol™ és a Taxol® LD₅₀ értékének meghatározása egérben többszörös intravénás adagolás után

A Capxol™ és a Taxol®, valamint hordozóik LD₅₀ értékeit hasonlítottuk össze többszörös intravénás adagolás után. A kísérlethez összesen 32 CD1 egeret használtunk. A Capxol™-t 30, 69 és 103 mg/kg paklitaxel dózisnak megfelelő mennyiségben adagoltuk naponként, egymást követő öt napon át. A Taxol®-t 4, 6, 9, 13,4 és 20,1 mg/kg paklitaxel dózisban adagoltuk naponként, 5 egymást követő napon. Mindegyik dózist négy egernek adagoltuk. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaljuk össze.

3. táblázat

Csoport	Többszöri intravénás adagolás					
	Dózis mg/kg	Az állatok száma	Az elhalt állatok száma	A túlélők %-a	LD ₅₀ mg/kg	MTD vagy LD ₁₀ mg/kg
Capxol™	103	4	4	0	76	64
	69	4	1	75		
	30	4	0	100		
Taxol®	20,1	4	4	0	8,0	4,3
	13,4	4	4	0		
	9	4	2	50		
	6	4	1	75		
	4	4	0	100		

Az eredmények azt mutatják, hogy a Capxol™ kevésbé toxikus, mint a Taxol®. Az LD₅₀ és az LD₁₀ érték a Capxol™ esetiében 76,2 illetve 64,5 mg/kg paklitaxel, a Taxol® esetében pedig 8,07 és 4,3 mg/kg paklitaxel voltak. Ebben a vizsgálatban a Capxol™ LD₅₀ értéke 9,4-szer nagyobb a Taxol®-énál. Az Capxol™ LD₁₀ értéke

15-ször nagyobb a Taxol®-énál. Ennek a vizsgálatnak az eredményei azt feltételezik, hogy a Capxol™ kevésbé toxikus, mint a

Taxol®, amikor egynapos időközönként többszörös dózisban adagoljuk.

59. Példa

Két készítmény, a Capxol™ és a Taxol® toxicitása és hatékonysága

Vizsgálatot végeztünk a Capxol™, Taxol® és a Capxol™ vívőanyaga hatékonyságának meghatározására

nőstény atíniás Ncr-nu egerekben, amelyekbe MX-1 humán emlőtumor fragmentumokat implantáltunk.

5 egérből álló csoportoknak VR-3 vagy VR-4 CapxolTM készítményt adagoltunk 13,4, 20, 30, 45 mg/kg/nap dózisokban 5 napon át, intravénás injekció alakjában. 5 egérből álló csoportoknak Taxol[®]-t adagoltunk 13,4, 20 és 30 mg/kg/nap dózisban öt napon át, intravénás injekció alakjában. Egy kontroll csoport 10 egérből állt, ezek az egerek CapxolTM vívíóanyag kontrollt (humán albumint, 600 mg/kg/nap) kaptak intravénás injekció alakjában, 5 napon át. Az értékelési paraméterek a teljesen visszafejlődött tumorok száma, a teljes regresszióhoz szükséges idő középértéke, a tumormentes túlélők száma és a tumorkiújulás száma voltak.

A VR-3 CapxolTM készítménnyel végzett kezelés minden dózisszinten a tumor teljes regresszióját eredményezte. A két nagyobb dózis esetében 100%-os volt a túlélés 103 nap után. A VR-4 CapxolTM készítménnyel végzett kezelés a három nagyobb dóziscsoportban teljes tumorregressziót és a 13,4 mg/kg/nap dózisban 60%-os regressziót eredményezett. A túlélők száma 103 nap után valamivel kevesebb volt, mint a VR-4 készítmény esetében. A 30, 20 illetve 13,4 mg/kg/nap Taxol[®]-al végzett kezelés a 103 nap alatt 40%-os, 20%-os illetve 20%-os túlélési arányt eredményezett. A kontroll vívíóanyaggal végzett kezelés nem volt hatással a tumor növekedésére, és az állatokat 33-47 nap eltelte után leöltük. Az eredményeket a 4. táblázatban foglaljuk össze.

4. táblázat

Dózis mg/kg/nap	CR/összes			TSF/TR			CRD (nap)			Nem-specifikus halál/összes		
	VR-3	VR-4	TAX	VR-3	VR-4	TAX	VR-3	VR-4	TAX	VR-3	VR-4	TAX
45	5/5	5/5	NA	5/0	3/2	NA	>88	>73	NA	0/5	0/5	NA
30	5/5	5/5	4/4	5/0	5/0	2/2	>88	>88	>56	0/5	0/5	1/5
20	5/5	5/5	4/4	1/4	2/3	1/3	>51	>47	>37	0/5	0/5	1/5
13	4/5	3/5	4/5	0/5	0/5	1/4	10	8	>29	0/5	0/5	0/5

CR = teljes tumorregresszió

TFS = tumormentes túlélő

TR = tumorkiújulás

DCR = a teljes regresszióhoz szükséges napok száma

Ezek a váratlan és meglepő eredmények a két CapxolTM-nak a Taxol[®]-hoz képest megnövekedett hatékonyságát mutatják. Emellett nagyobb paklitaxel dózisokat érünk el a CapxolTM csoportokban a készítmény kisebb toxicitása miatt. Ezeket a nagy dózisokat bő-lusz injekció alakjában adagoltuk.

60. Példa

Vérkinetika és szöveteloszlás ³H-Taxol[®] és ³H-CapxolTM esetében egyetlen intravénás dózist követően patkányban

Két vizsgálatot végeztünk a ³H-paklitaxel farmakokinetikájának és szöveteloszlásának összehasonlítására CapxolTM és Taxol[®] injekciós koncentrátum formájában. 14 him patkánynak 10 mg/kg és 10 patkánynak 4,9 mg/kg ³H-Taxol[®]-t adagoltunk intravénás injekció formájában. 10 him patkánynak 5,1 mg/kg ³H-CapxolTM-t

adagoltunk szintén intravénás injekció alakjában.

A teljes radioaktivitás és a paklitaxel szintje két fázisban csökken a patkányok vérében 5 mg/kg ^3H -Taxol® vagy ^3H -Capxol™ IV bolusz dózis beadásakor. Azonban mind a teljes radioaktivitás, mind a paklitaxel szintjei szignifikánsan alacsonyabbak

a ^3H -Capxol™ adagolása után, mint egy hasonló ^3H -Taxol® dózis adagolása után. Ez az alacsonyabb szint gyorsabban oszlik el a vérből.

A vér HPLC profilja hasonló metabolizmus képet mutat a nagyon poláris metabolitok esetében mind a ^3H -Capxol™-ra, mind a ^3H -Taxol®-ra vonatkozóan. Azonban a metabolizmus sebessége jelentősen kisebb a ^3H -Capxol™ esetében, 44,2% vérradioaktivitás marad paklitaxelként 24 órával a beadás után, szemben a ^3H -Taxol®-ra kapott 27,7%-kal. A radioaktivitás kiválasztása csak minimálisan történik a vizeletbe, főként a székletbe a ^3H -Capxol™ esetében, ami hasonló a ^3H -Taxol®-ra leírt kiválasztási képhez. A vérkinetikát a teljes radioaktivitásra és paklitaxelre vonatkozóan 5 mg/kg ^3H -Capxol™ vagy ^3H -Taxol® IV adagolását követően az 5. táblázatban foglaljuk össze.

5. táblázat

Kezelés	AUC ₀₋₂₄ mg ek.óra /ml	Extrapolált C ₀ mg ek/ml	Talált C _{max} mg ek/ml	Talált T _{max} óra	t _{1/2β} óra
Összes radioaktivitás					
^3H - Capxol™	6,1	7,6	4,2	0,03	19,0
^3H -Taxol®	10,2	19,7	13,5	0,03	19,7
paklitaxel					
^3H -Capxol™	3,7	7,0	4,0	0,03	11,4
^3H -Taxol®	5,4	17,1	11,8	0,03	7,2

A szövet radioaktivitás-szintek 14-ből 12 szövetben magasabbak a ^3H -Capxol™ adagolása után, mint a ^3H -Taxol® adagolása után. A szövet/vér ppm arányok magasabbak a ^3H -Capxol™ esetében minden szövetben, mivel a vérszintek alacsonyabbak. Ez alátámasztja a ^3H -Capxol™-nak a vérből a szövetbe történő gyors eloszlását, amit a vérkinetikai adatok feltételeztek.

A Capxol™-ba formulált ^3H -paklitaxel hasonló farmakokinetikai profilt mutat a Taxol® injekciós koncentrátumba foglalt ^3H -paklitaxelhez, azonban a szövet/vér ppm arányok és a metabolizmus sebességek szignifikánsan különböznek. Az adagolást követő 2 perc eltelte után vett vérmintákban a Capxol™-al kezelt állatok esetében a szignifikánsan alacsonyabb összes radioaktivitás a Taxol®-al kezelt állatokhoz képest arra utal, hogy a ^3H -Capxol™ gyorsabban oszlik el a vérből. Azonban a metabolizmus sebessége szignifikánsan kisebb a ^3H -Capxol™ esetében, mivel 44% vérradioaktivitás marad paklitaxelként az adagolást követő 24 óra elteltével a ^3H -Taxol® esetében mért 28%-kal szemben.

Ez az eredmény meglepő és egy új készítményt bocsát rendelkezésre, amellyel a paklitaxel nyújtott hatása érhető el a Taxol®-hoz viszonyítva. A helyi nagy koncentrációkkal összevéve, ennek a fokozott aktivitásnak

megnövekedett hatékonysághoz kell vezetnie primer tumorok vagy metasztázisok kezelésében a nagy helyi koncentrációjú szervekben. A szöveteloszlást a 6. táblázatban mutatjuk be. Az adatok középértéket és standard hibát képviselnek 10-10 patkányból álló csoportokra vonatkozóan (Capxol™ és Taxol®).

6. táblázat

Radioaktív maradékok hím patkányok szöveteiben ppm-ben kifejezve 5 mg/kg ^3H -Capxol™ és ^3H -Taxol® egyvetlen intravénás dózisát követően

Minta	Capxol™		Taxol®	
	középérték	± SD	középérték	± SD
Agy	0,106	0,008	0,145	0,020
Szív	0,368	0,063	0,262	0,037
Tüdő	1,006	0,140	0,694	0,057
Máj	1,192	0,128	1,37	0,204
Vese	0,670	0,110	0,473	0,068
Izom	0,422	0,120	0,386	0,035
Gyomor-bél traktus	0,802	0,274	0,898	0,243
Herék	0,265	0,023	0,326	0,047
Hasnyálmirigy	0,963	0,357	0,468	0,070
Test	0,596	0,070	0,441	0,065
Csont	0,531	0,108	0,297	0,051
Lép	0,912	0,131	0,493	0,070
Prostata	1,728	0,356	1,10	0,161
Ondóhólyag	1,142	0,253	1,20	0,237
Vér	0,131	0,010	0,181	0,020
Plazma	0,131	0,012	0,196	0,026

Az adatok néhány szervben a Capxol™-nak a Taxol®-énál szignifikánsan magasabb akkumulációs szintjét mutatják. Ezek a szervek többek között a prostata, a hasnyálmirigy, a vese, a tüdő, a szív, a csont és a lép. Így a Capxol™ a Taxol®-nál hatékonyabb lehet ezen szervek rákos megbetegedésének kezelésében azonos paklitaxel szintek mellett.

A prostataszövetben mutatott szintek különösen fontosak a prosztaták kezelésében. Ennek a meglepő és váratlan eredménynek jelentősége van a prosztaták kezelésében. Az alábbi 7. táblázat mutatja az adatokat minden egyes (csoportonként 10) patkányra vonatkozóan, amiből az látszik, hogy a paklitaxel a Capxol™ készítménybe foglalva nagyobb mértékben akkumulálódik a prosztatában, mint Taxol® formájában. A prosztatán belüli lokalizáció alapjául a készítmény részecskemérete (20-400 nm) szolgálhat, vagy a készítményben jelenlevő fehérje albumin, amely speciális membrán receptorok (gp 60, gp 18, gp 13 és hasonló) révén kiválthatja a

prostataszövetben bekövetkező lokalizációt. Az is valószínű, hogy az albuminon kívül más biokompatibilis, biológiailag lebontható polimerek is specifikust mutatnak bizonyos szövetek, például a prostata vonatkozásában, aminek következtében a paklitaxel nagy helyi koncentrációja alakul ki ezekben a szövetekben a fentebb leírt tulajdonságok miatt. Az ilyen biokompatibilis anyagokat szintén a jelen találmány körébe tartozónak tekintjük. Egy előnyös készítmény, amellyel a prosztatában nagy helyi paklitaxel-koncentráció érhető el, paklitaxelt és albumint tartalmaz, benne a részecskék mérete 20-400 nm, és mentes a cremophortól. Erről a készítményről kimutattuk azt is, hogy nagyobb paklitaxel-koncentrációkat eredményez a hasnyálmirigyben, vesében, tüdőben, szívben, csontban és lépben is, ha a Taxol® ekvivalens dózisaihoz viszonyítjuk.

7. táblázat

Mindegyik csoportban 10 patkányra vonatkozó adatok 5 mg/kg paklitaxel dózis adagolása után

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

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a Capxol™ prosztatában való lokalizációja körülbelül 150%-os a Taxol®-éhoz viszonyítva.

A paklitaxelnek a Capxol™ készítményből a prosztatában történő váratlan lokalizációja kihasználható más gyógyászatiilag hatásos szereknek a prosztatába való juttatására ezt a szövet érintő más betegállapotok kezelésére, így antibiotikumoknak egy hasonló készítményben például prostatitis (a prostata gyulladása és fertőződése) kezelésére; a jóindulatú prostata hipertrofia kezelésére hatásos terápiás szerek feltehetően szintén hasonló módon formulálhatók nagy helyi hatóanyagleadás elérésére. Hasonlóképpen, az a meglepő felismerés, hogy a Capxol™ nagy helyi koncentrációt biztosít a szívben, kihasználható a resztenózis, valamint az ateroszklerotikus betegség kezelésére a koszorúerekben. A paklitaxelről kimutatták, hogy terápiás hatást fejt ki a resztenózis és az ateroszklerózis megelőzésében, és a Capxol™ ily módon a paklitaxel egy ideális formája ezekre az állapotokra. Azt is kimutatták továbbá, hogy a polimerizált albumin preferáltan kötődik gyulladásos endoteliális erekhez, feltehetően a gp60, gp18 és gp13 receptorok révén.

61. Példa

A paklitaxel vérfarmakokinetikája és szöveteloszlása CapxolTM többszörös intravénás dózisa után patkányban

A ³H-CapxolTM-al végzett vizsgálatokat négy további patkánycsoport kezelésével egészítettük ki, ahol a patkányoknak 9,1 mg/kg, 26,4 mg/kg, 116,7 mg/kg és 148,1 mg/kg paklitaxelt adagoltunk CapxolTM formájában. A farokvénából vért gyűjtöttünk, és az AUC₀₋₂₄ értékeket számítottuk. 24 óra eltelte után vérmintákat vettünk, a mintákat extraháltuk, és az extraktumot HPLC oszlopra injektáltuk a vérben a kiindulási vegyület szintjének meghatározására.

A ³H-CapxolTM intravénás adagolását követően a teljes radioaktivitásra és a paklitaxelre vonatkozó vérfarmakokinetikai adatokat a 8. táblázatban foglaljuk össze.

8. táblázat

Csoport/Dózis mg/kg	AUC ₀₋₂₄ µg ekv.óra/ml	Extrapolált C ₀ µg ekv/ml	Talált C _{max} µg ekv/ml	Talált T _{max} óra	t _{1/2β} óra
A/9,1	11,5	10,2	7,19	0,03	22,3
B/26,4	43,5	44,8	29,5	0,03	16,0
C/116,7	248,9	644,6	283,3	0,03	8,48
D/148,1	355,3	1009,8	414,2	0,03	9,34

A paklitaxel dózisének növekedésével a görbe alatti terület arányosan nőtt. A kiindulási vegyület szintje 24 óra eltelte után 8,5-szeresére nőtt (0,04 ppm - 0,34 ppm) a 9 mg/kg dózistól a 148 mg/kg dóziséig.

62. Példa

CapxolTM és Taxol[®] toxicitásának meghatározása patkányokban egyetlen intravénás beadás után

A vizsgálat célja a CapxolTM toxicitásának meghatározása volt egyetlen intravénás beadást követően hím és nőstény patkányokban. A CapxolTM-t 6 hím és 6 nőstény patkánynak adtuk be 5, 9, 30, 90 és 120 mg/kg mennyiségben. Az állatok felét mindegyik dóziscsoportból eutanázia után boncoltuk a 8. napon. A megmaradó állatokat a 31. napon boncoltuk. A CapxolTM-al kezelt állatokkal kapott eredményeket a normális sóoldattal és a vívőanyaggal kezelt kontrollesoportokkal, valamint az 5, 9 és 30 mg/kg Taxol[®]-al kezelt állatokkal kapott eredményekkel hasonlítottuk össze.

Az állatokat a beadás után 1 órával és 4 órával, azt követően pedig napi egy alkalommal vizsgáltuk. Mindegyik állatból vért gyűjtöttünk hematológiai és szérummeghatározásokhoz az eutanáziát megelőzően.

A 30 napos megfigyelési időszak alatt 13 elhalálozás történt. A 30 mg/kg paklitaxelnek megfelelő Taxol[®] dózissal kezelt mind a 12 állat elpusztult a 4. napon. A CapxolTM-al kezelt állatok közül csak egy pusztult el. A 90 mg/kg paklitaxelnek megfelelő CapxolTM dózissal kezelt állat a 15. napon múlt ki. A 90 mg/kg vagy 120 mg/kg paklitaxelnek megfelelő CapxolTM dózissal kezelt állatok közül több nem pusztult el, ezért a halálról nem feltételezzük, hogy a kezeléssel összefüggésben lett volna.

A megfigyelési időszak első négy órája alatt a Taxol[®]-al kezelt állatok többségénél szörmeredekezést és

támolygó járást figyeltünk meg, ami feltehetően a készítmény alkoholtartalmának tudható be. A szörmeredezést néhány CapxolTM-al kezelt állatnál is észleltük. A 30 mg/kg paklitaxelnek megfelelő Taxol® dózissal kezelt állatoknál szörmeredezést és letargiát figyeltünk meg, és ezek az állatok a 4. napon elpusztultak. A CapxolTM-al kezelt állatoknál a toxicitás nyilvánvaló jeleit nem észleltük, kivéve a szörmeredezés néhány előfordulását a 90 mg/kg és 120 mg/kg dózisszinteken.

A CapxolTM-al kezelt állatokra vonatkozóan nem számoltak be abnormalitásokról. A 8. és 31. napi teljes boncolási eredmények normálisak voltak. A CapxolTM-al kezelt hím állatok reprodukciós szerveiben szignifikáns dózisfüggő változásokat észleltek. A mellékherevezeték epiteliális sejteinek degenerációja és vakuolációja volt látható, amit gyakran többgócú szövetközi limfocita infiltráció kísért. A CapxolTM dózisának növekedésével nőtt a herekben a herecsatornacsák súlyos atrofíája. A patológusok véleménye szerint jelentős léziók voltak megfigyelhetők a hím állatok reprodukciós szerveiben, amelyeket 9, 30, 90 és 120 mg/kg CapxolTM-al kezeltünk. Ezek a változások a herek diffúz degenerációját és nekrozisát foglalták magukban. Ezek a változások a legkifejezettebbek azokban az állatokban voltak, amelyek nagyobb CapxolTM dózist kaptak. A kezetlen kontroll állatok, a vivőanyag kontroll állatok vagy a Taxol®-al kezelt állatok heréiben nem figyeltek meg változást.

Ez az eredmény váratlan és komoly terápiás jelentőséggel bír a hormonfüggő rákok, így a prosztaták kezelésében. A herek eltávolítása (orchiectomia) a prosztaták kezelésének egyik megközelítése. A CapxolTM egy új készítményt képvisel ezen betegség kezelésére a paklitaxel nagy helyi koncentrációjának elérésével, a hatóanyag nyújtott leadásával, a tesztikuláris működés csökkentésével és toxikus cremophor vivőanyag nélkül. A CapxolTM-al történő kezelés így lehetővé teszi a tesztoszteron és más androgén hormonok szintjének csökkentését.

A közepes Taxol® dózissal kezelt állatoknál agykéregelhalást figyeltek meg. Ez magyarázhatja a még nagyobb Taxol® dózissal kezelt állatok halálát. A CapxolTM-al kezelt állatokban nem észleltek cerebrális léziókat.

A cerebrális és neurológiai toxicitás ezen hiánya meglepő, és nagy jelentőséggel bír mind az agytumороk kezelésében, mind a nagy, patkányokban 5-120 mg/kg (emberekben 30-700 mg/m²) szisztémás dózisok elérésének lehetőségében.

Összefoglalva, a CapxolTM a Taxol®-nál sokkal kevésbé toxikus. A 9 mg/kg paklitaxelnek megfelelő Taxol® dózissal kezelt állatok egyike sem maradt életben. A 90 mg/kg CapxolTM-al kezelt állat véletlenszerű elpusztulását kivéve minden CapxolTM-al kezelt állat életben maradt, beleértve a 120 mg/kg dózissal kezeltet is. A CapxolTM nagy dózisfüggő hatást mutatott a hím reprodukciós szervekre, és csökkentette a hím állatok testtömegét.

A nőstény patkányok nem mutattak semmilyen toxikus hatást a CapxolTM adagolását követően még a 120 mg/kg-os dózis esetében sem. Ezeket a nagy dózisokat bőlusz injekció alakjában adagoltuk, és ezek emberekben 30-700 mg/m² dózisnak felelnek meg.

63. Példa

Ciklosporin-nanorészecskék (Capsorine I.V.) farmakokinetikai adatai intravénás adagolást követően (összehasonlítás a Sandimmune I.V. készítménnyel, amelyet jelenleg a Sandoz forgalmaz)

Ciklosporin-nanorészecskéket (Capsorin I.V.), amelyeket a fentebb leírt módon (13. és 14. Példa) állítot-

tunk elő, sóoldattal rekonstituáltunk, és egy 3 Sprague-Dawley patkányból álló első csoportnak adtuk be intravénás bólusz alakjában. Egy 3 patkányból álló második csoportnak Sandimmune I.V. készítményt adtuk, amely cremophert és etanolt tartalmaz, sóoldattal való hígítás után. Mindegyik csoport ugyanolyan, 2,5 mg/kg ciklosporin dózist kapott. Vérmintákat a 0., 5., 15., 30. percben és 1, 2, 4, 8, 24, 36 és 48 óra elteltével vettünk. A vérben a ciklosporin-szintet HPLC eljárással mértük, és a jellemző farmakokinetikai paramétereket meghatároztuk. A PK görbék jellemző csökkenést mutattak az idő függvényében.

Csökkenés az idő függvényében

AUC, mg-óra/ml Cmax ng/ml

Capsorin I.V. 12,228 2,853

Sandimmun I.V. 7,791 2,606

Emellett, a Sandimmun I.V. készítmény toxicitása miatt a 3 patkányból kettő a beadást követő 4 órán belül elpusztult. Így a jelen találmány szerinti nanorészecske-készítmény (Capsorin I.V.) nagyobb AUC értéket mutat és toxicitást nem mutat a kereskedelemben kapható készítményhez (Sandimmune I.V.) viszonyítva.

64. Példa

Farmakokinetikai (PK) adatok ciklosporin-nanocseppecskékre (Capsorine Oral) vonatkozóan orális adagolást követően, a Neoral (a jelenleg a Sandoz által forgalmazott) készítményhez hasonlítva

A fentebb leírt módon készített ciklosporin-nanocseppecskéket narancslében egy 3 Sprague-Dawley patkányból álló első csoportnak adtuk orálisan, szonda segítségével. Egy második, 3 patkányból álló csoport Neoralt, egy kereskedelemben kapható mikronemulziós készítményt kapott, amely emulgeálószeret tartalmaz, narancslével való hígítás után, szintén orálisan, szonda segítségével. Mindegyik csoport ugyanolyan, 12 mg/kg ciklosporin dózist kapott azonos térfogatú narancslében. Vérmintákat a 0., 5., 15., 30. percben és 1, 2, 4, 8, 24, 36 és 48 óra elteltével vettünk. A vérben a ciklosporin szinteket HPLC eljárással vizsgáltuk, és a jellemző PK paramétereket meghatároztuk. A PK görbék jellemző csökkenést mutattak az idővel, az alábbiak szerint.

Csökkenés az idő függvényében

AUC, mg-óra/ml Cmax, ng/ml

Capsorine Oral 3,195 887

Neoral 3,213 690

Így a jelen találmány szerinti nanocseppecske-készítmény a kereskedelemben kapható készítményhez (Neoral) hasonló PK viselkedést mutat.

65. Példa

Klinikai vizsgálatok CapxoITM-al: célok és előnyök

Az I/II fázis kiindulási dózisa megválasztásának alapjául a CapxoITM-nak a Taxol[®] készítményhez viszonyított igen alacsony preklinikai toxicitása szolgált. A fenti preklinikai adatok arra utalnak, hogy a CapxoITM kiindulási dózisszintjeihez az I/II fázis vizsgálataihoz a Taxol[®]-ban levő paklitaxelre megállapított maximálisan tolerált dózist (MTD) alkalmazzák. A fenti preklinikai adatok alapján jelenleg úgy véljük, hogy a forgalmazás engedélyezéséhez a klinikai célok a következők: a paklitaxel adagolását megelőző gyógyszeres kezelés szükségességének megszüntetése; a CapxoITM Taxol-lal ekvivalens dózisének megállapítása, azaz annak a dózisnak a meghatározása, amellyel ekvivalens rákellenes választ kapunk; és a paklitaxel adagolásához szükséges folyama-

tos (3-24 órás) intravénás infúzió eliminálása és sokkal rövidebb (1 óránál rövidebb vagy bőlusz) adagolással való helyettesítése.

A Capxol™ paklitaxel-készítmény számos potenciális előnnyel rendelkezik. A Capxol™ liofilizált por, amely csak paklitaxelt és humán szérum albumint tartalmaz. A liofilizált por rekonstitúciójakor képződött kolloid oldat természetének következtében toxikus emulgeálószeres, így cremophor (mint a paklitaxelt tartalmazó BMS készítményben) vagy polysorbát 80 (mint a Rhone Poulenc doketaxel készítményében) és oldószeres, így etanol a hatóanyag szolubilizálásához nem szükségesek. A toxikus emulgeálószeres eltávolítása csökkenti a súlyos túlérzékenységi és anafilaxiás reakciók előfordulását, amelyekről tudott, hogy a Taxol®-hoz hasonló termékek esetében elfordulnak.

Emellett nincs szteroidokkal és antihisztaminokkal végzett gyógyszeres előkezelés a hatóanyag adagolását megelőzően.

A csökkent toxicitás következtében, amely az LD₁₀/LD₅₀ vizsgálatok által bizonyított, nagyobb dózisok alkalmazhatók, amelyek nagyobb hatékonyságot eredményeznek.

A mieloszuppresszió csökkentése (a Taxol®-éhoz viszonyítva) feltehetően csökkenti a kezelési ciklusok közötti időt (ami jelenleg 3 hét) és javítja a terápia eredményeket.

A Capxol™ sokkal nagyobb (akár 20 mg/ml) koncentrációban adagolható, mint a Taxol® (0,6 mg/ml), ami sokkal kisebb infúziós térfogatokat és feltehetően intravénás bőlusz formájában történő adagolást tesz lehetővé.

A Taxol®-al kapcsolatban felismert probléma a paklitaxelnek a bevezető katéterekben csapadék formájában történő kiválása. Ez hibás és rosszul szabályozható dozirozást eredményez. Az új készítmény, a Capxol™ kolloid oldatának saját stabilitása révén a csapadékkiválás problémája enyhül.

Az irodalom szerint azok a részecskék, amelyek néhány száz nanométer méretűek, előnyösen oszlanak el a tumorokban a tumor helyén levő szivárgó vérereken keresztül. A Capxol™ készítményben a paklitaxel kolloid részecskék ezért feltehetően kedvező célbajuttató hatást mutatnak, nagymértékben csökkentve a BMS készítményben adagolt paklitaxel mellékhatásait.

66. Példa

A Capxol™ klinikai kipróbálásának körvonalazása

Indikáció: áttételes mellrák

Adagolási terv: az I/II fázisú vizsgálatok kiindulási dózisének megválasztásához a Capxol™ készítmény esetében kapott, a Taxol® készítményhez viszonyított jelentősen alacsonyabb preklinikai toxicitási adatok (egyetlen dózissra vonatkozó LD₁₀ adatok egérben) szolgálnak alapul. Az egyetlen dózissra vonatkozó LD₁₀ egérben 398,1 mg/kg-nak adódott. Ennek a dózissnak a felületterület alapra való átalakítása (a mg/kg érték háromszorosra) egy 1194,3 becsült vagy egy 1200 mg/m² körüli értéket ad. Egy konzervatív induló dózis emberek esetében ennek az 1/10-ed része, ami 120 mg/m² dózissnak felel meg. Azonban, azt már megállapítottuk, hogy a paklitaxel 175 mg/m² dózisban biztonságos, és hogy a Capxol™-al végzett kísérleti vizsgálatok szerint, amelyek patkányokban kisebb mieloszuppressziót mutatnak, a 175 mg/m² dózissnak biztonságosnak kell lennie a Capxol™ készítmény esetében is. A Capxol™-oldatot megközelítőleg 15-30 percen át vagy rövidebb ideig adagoljuk, amennyiben lehetséges.

67. Példa

A CapxolTM klinikai fejlesztési programjának körvonalazása: kombinációs I/II fázis dózis-meghatározási vizsgálatok/korlátozott hatékonysági vizsgálatok

Betegek/célok: kifejlődött, standard gyógyszeres terápiának ellenálló áttételes mellráktól szenvedő betegek. Ezen vizsgálat célja a CapxolTM-ra, mint egyetlen szerre adott válaszok arányának megállapítása áttételes mellráktól szenvedő betegekben.

Adagolás - I fázis komponens: a vizsgálat I fázisában alkalmazott induló dózis a paklitaxelre meghatározott, ismert maximális tolerált dózis (MTD) (135 mg/m²). A következő dózis

sok 25%-os lépésekben nőnek az MTD eléréséig. Mindegyik induló CapxolTM dózisszintet 3 beteg kapja, és a betegek száma az MTD-nél 6-ra nő. A következő dózisszintre való lépés a káros eseményektől függően történik. Azaz, a vizsgálatot abbahagyjuk, amikor a 6 közül 2 vagy több beteg egy adott dózisszinten 3. fokozatú nem-mieloszuppresszív toxicitást vagy 4. fokozatú mielo-szuppresszív toxicitást mutat (a WHO toxicitási skálájának megfelelően). A CapxolTM dózist úgy jelöljük, mint a vizsgálat abbahagyásánál alkalmazott közvetlenül megelőző dózist. A hatóanyag adagolásának más rendje, például a napi 5-szöri vagy 24 órás infúzió szintén megvizsgálható, ha szükséges, az induló egyetlen dózis bólus adagolásának eredményére alapozva.

Farmakokinetika: a kiválasztott betegeknél teljes farmakokinetikai vizsgálatot végzünk megfelelően megválasztott időpontokban vett szérumban alkalmazásával. A meghatározandó paraméterek a $t_{1/2}$ (α és β fázis), az AUC, a C_{max} , a kiválasztási és eloszlási térfogat.

Betegek - II fázis komponens: miután megállapítottuk az MTD-t, a mellrákos betegeket az eredeti, paklitaxellel végzett vizsgálatokba bevontakhoz hasonlóan választjuk ki a II fázis komponenshez. A számot annak a kívánságnak megfelelően állapítjuk meg, hogy a tumor válasz-arányt elfogadható pontossággal határozzuk meg a 95%-os biztonsági szintnél. Ily módon a vizsgálat egyágú lesz a standard paklitaxel ekvivalens meghatározásának céljával, megmutatva, hogy a biztonsági tartomány magában foglalja a CapxolTM várt válasz-arányait. Az alkalmazott beteg-minta nagysága az I/II fázis vizsgálat II komponense esetében szokásos 30 fő.

Mérések: az elsődleges eredmény a tumor válaszarány (CR/PR) a bevont betegekre vonatkozóan. Emellett a válasz idejét, a válasz időtartamát és a túlélési időt is figyeljük. A kezelés biztonságosságát szintén értékeljük a káros események aránya és a standard laboratóriumi paraméterek változása alapján.

Szabadalmi igénypontok:

1. Paklitaxelt tartalmazó készítmény, amely fehérje bevonattal ellátott paklitaxelt tartalmazó nanarészecskéket tartalmaz, amely nanorészecskék átlagos átmérője nem nagyobb, mint körülbelül 200 nanométer, ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben legalább 2,0 mg/ml és ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben nem 20 mg/ml.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben 2,0 mg/ml-től kevesebb mint 20 mg/ml-ig terjedő tartományban van.

3. A 2. igénypont szerinti készítmény, ahol a paklitaxel koncentrációja a készítményben 5 mg/ml.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely készítmény legalább három napig stabil

szobahőmérséklet vagy hűtött körülmények legalább egyikén tartva.

5. Az előző igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol a paklitaxel orálisan, instramuszkulárisan, intravénásan, intraperitonelálisan, intraarteriálisan, intrauretrálisan, intratekálisan vagy inhalálással van beadva.

6. Az előző igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol a fehérje albumin.

7. A 6. igénypont szerinti készítmény, ahol az albumin humán szérum albumin.

8. Az előző igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol a nanorészecskék 0,22 mikron méretű szűrőn keresztül szűrhetők.

9. Az előző igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol a nanorészecskék mérettartománya 10-200 nm.

10. Az előző igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol a nanorészecskék mérettartománya 50-170 nm.

11. Az előző igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol a nanorészecskék sterilén vannak szűrve.

12. Az előző igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol a paklitaxel a nanorészecskében amorf.

13. Az előző igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol a nanorészecskék biokompatibilis vizes folyadékokban vannak szuszpendálva.

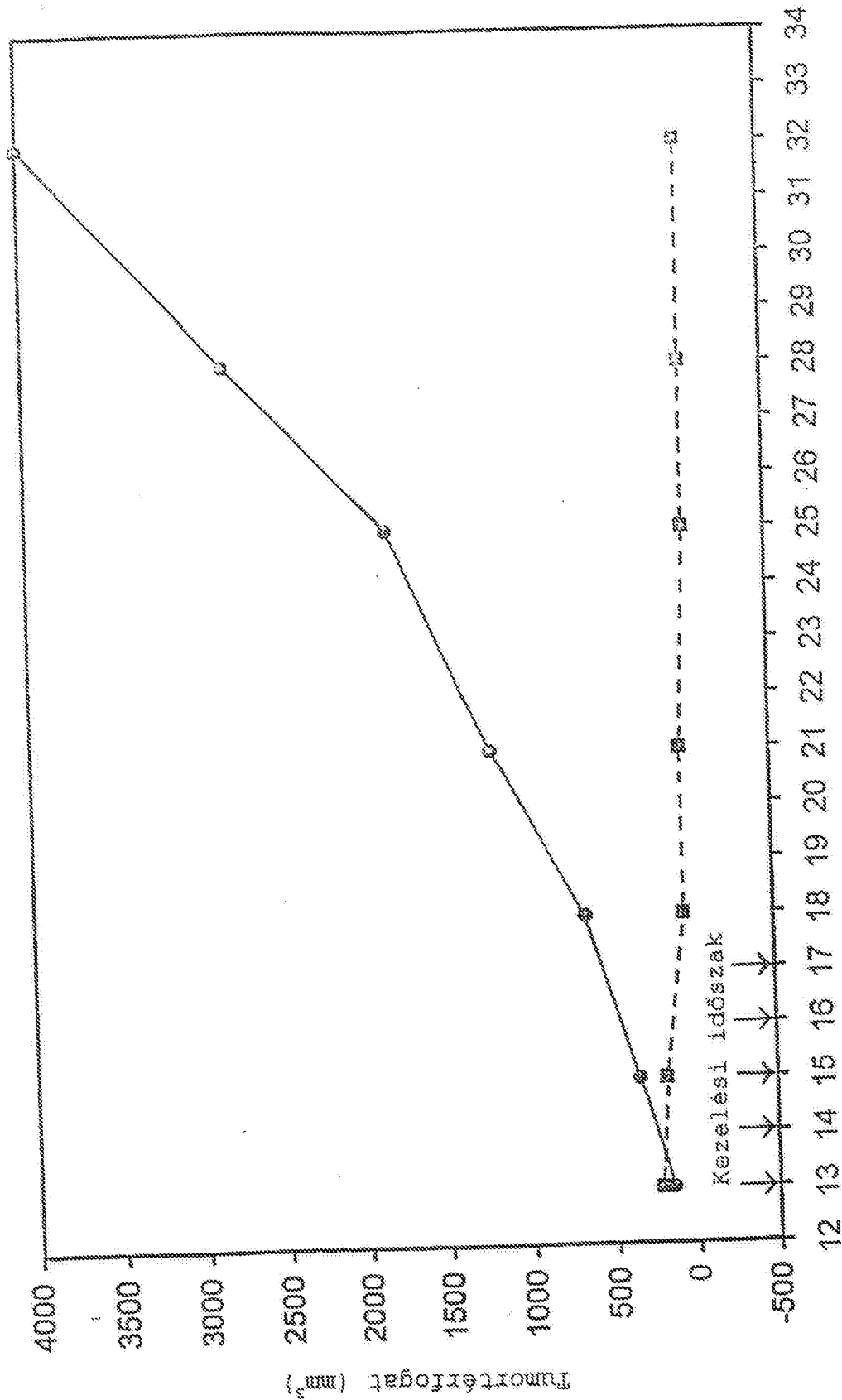
14. Az előző igénypontok bármelyike szerinti készítmény, ahol a nanorészecskéknél a készítményben magja van, amely polimer mátrixtól lényegében mentes.

15. Az előző igénypontok bármelyike szerinti készítmény rák kezelésében vagy orchiectomiában való alkalmazásra.

16. A 15. igénypont szerinti készítmény, ahol a rák prosztatarák, hasnyálmirigyrák vagy agytumor.

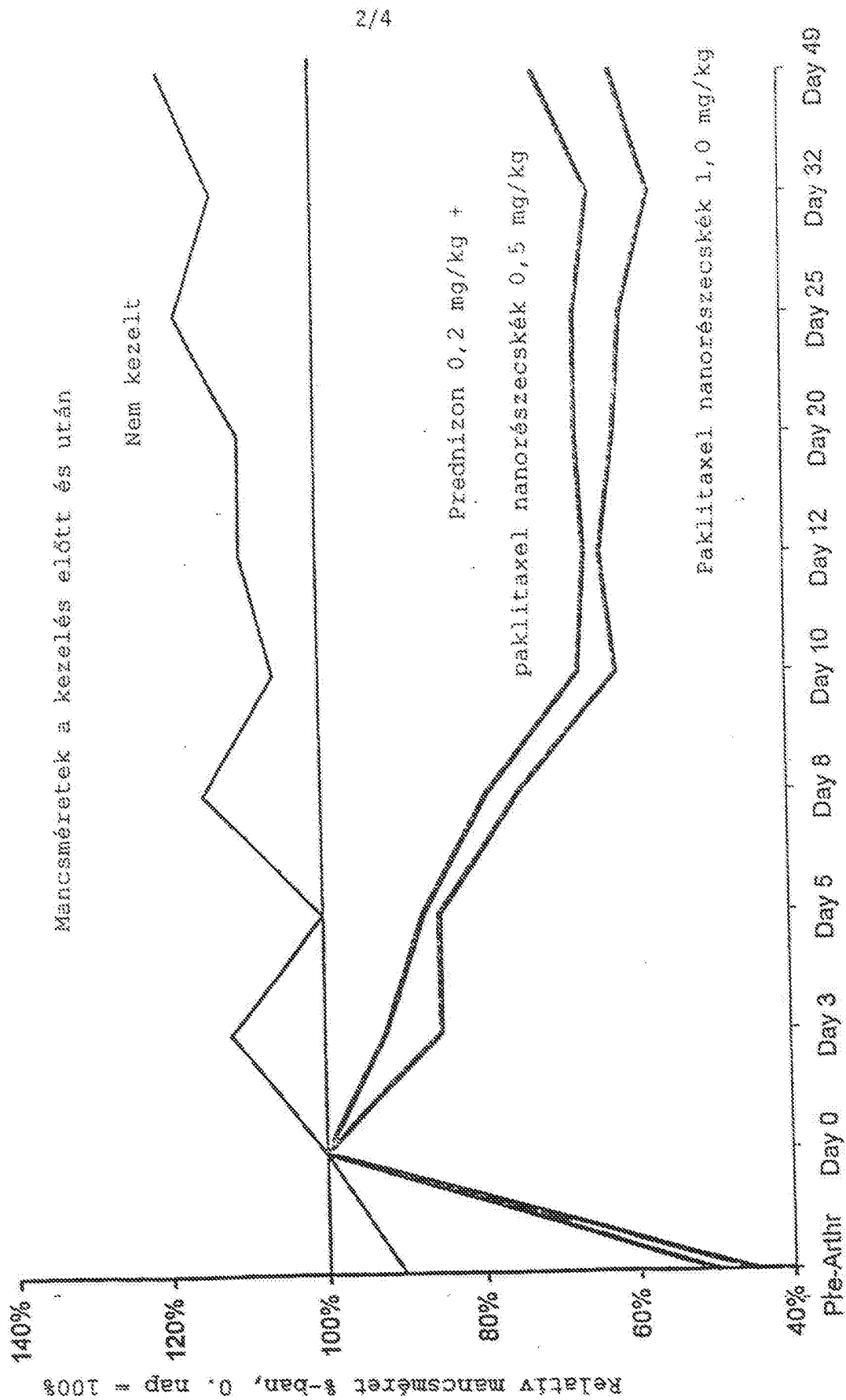
17. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti készítmény reztenózis kezelésében való alkalmazásra.

1/4



Az implantáció utáni napok

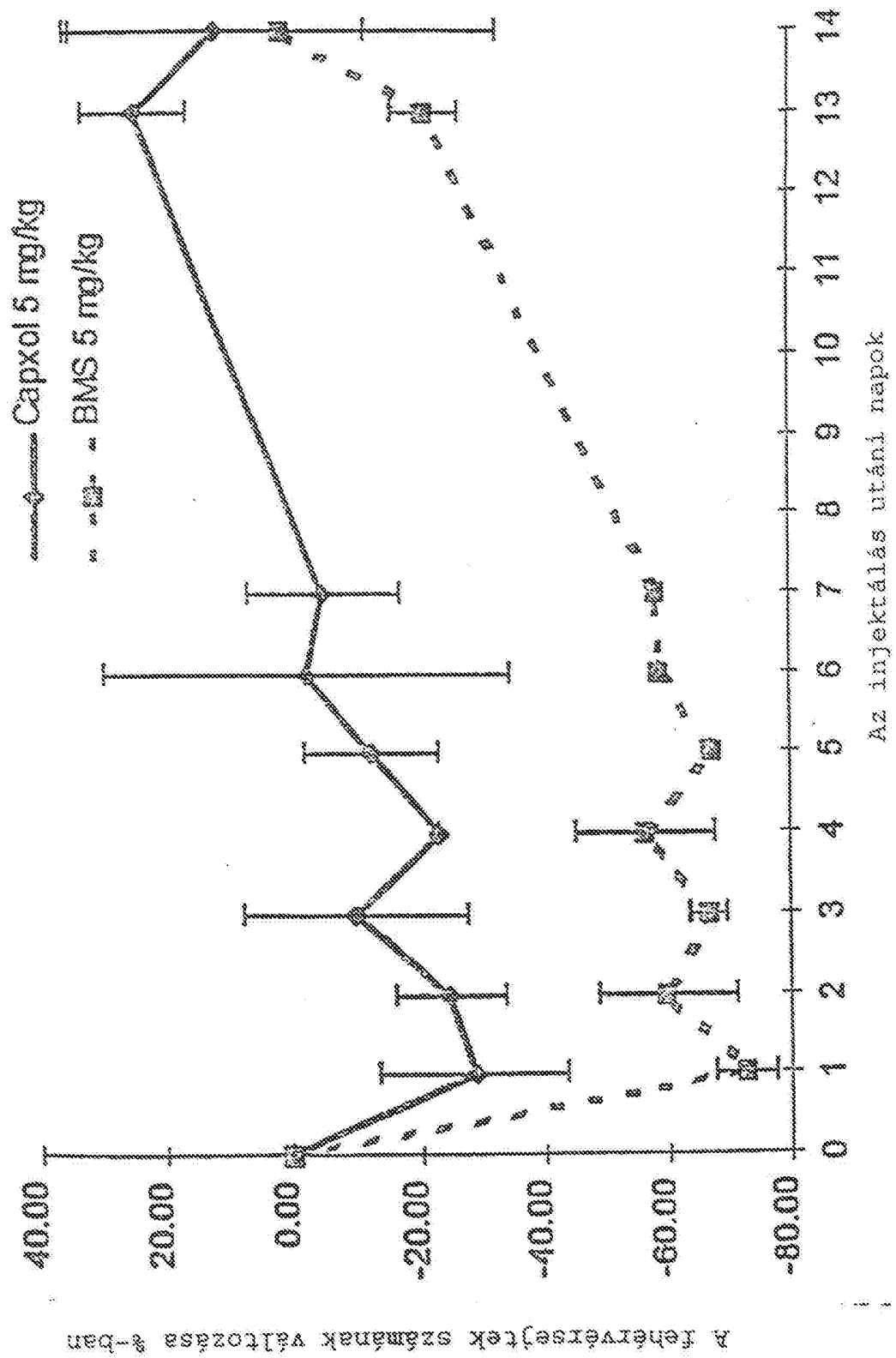
1. ÁBRA



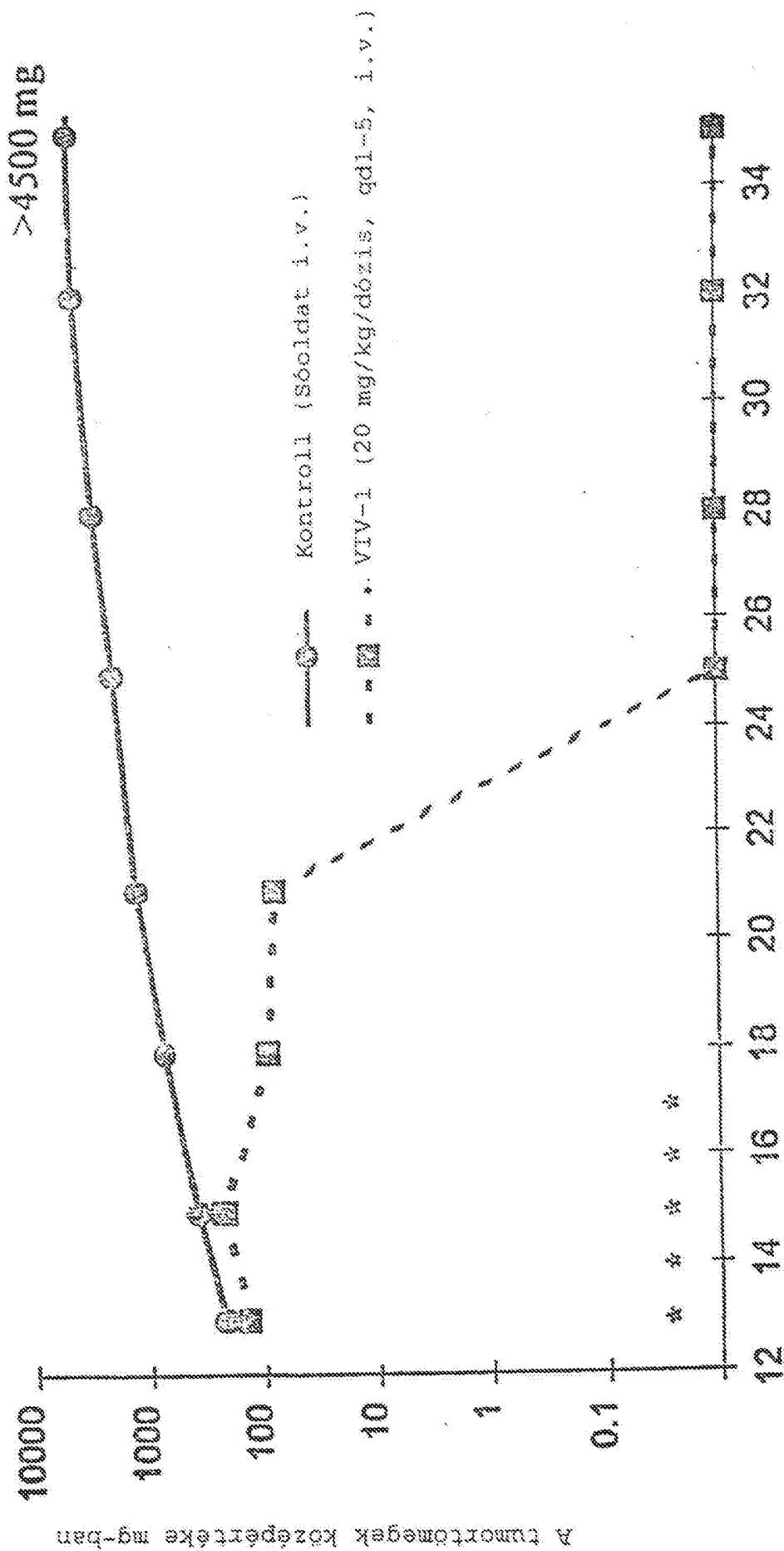
A kezelés utáni napok

2. ÁBRA

3/4



3. ÁBRA



Az implantáció utáni napok

4. ÁBRA