

P02 03473

33830

A2

6,9-Bisz-[(2-aminoetil)amino]benzo[g]izokinolin-5,10-dion-
dimaleát liposzómás készítmény

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

K I V O N A T

A találmány az (1) az (1) 6,9-Bisz-[(2-aminoetil)-amino]-benzo[g]izokinolin-5,10-dion-dimaleát (BBR 2778) vegyület liposzómás gyógyászati készítményére vonatkozik, amelyben a liposzómák foszfatidilkolint, koleszterint és BBR 2778 vegyületet tartalmaznak, ahol a koleszterin/foszfolipid tömegarány 1:2 és 1:7 közötti, és a BBR 2778/foszfolipid tömegarány 1:4 és 1:25 közötti. A találmány tárgya továbbá a liposzómás készítmény alkalmazása daganatellenes gyógyszer előállítására.

TK

P 0 2 C 3 4 7 3

A2

33830

6,9-Bisz-[(2-aminoetil)amino]benzo[g]izokinolin-5,10-dion-
dimaleát liposzómás készítmény

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány a 6,9-Bisz-[(2-aminoetil)amino]benzo[g]izokinolin-5,10-dion-dimaleát (BBR 2778) vegyület liposzómás gyógyászati készítményére vonatkozik.

A liposzómák egy vagy több kettős rétegbe szerveződött természetes és/vagy szintetikus (biokompatibilis és biológiailag lebontható) foszfolipidek vizes diszperziói. Ha a foszfolipideket vizes közegben hidratálják, akkor spontán módon kolloid mikrorészecskéket vagy hordozókat képeznek, melyeknek átmérője általában 0,05-5,0 μm . A liposzóma részecskeméret 0,025 μm és 2,5 μm közötti a szerkezettől függően, amely lehet egyetlen vagy többszörös kettős rétegű szerkezet. A vezikulum mérete kritikus paraméter a liposzómák felezési idejének meghatározásához és befolyásolja a kapszulázható hatóanyag térfogatát.

A liposzómákat az összetételük szerint természetes és/vagy szintetikus foszfolipidek (foszfo-szfingolipidek) csoportjába osztályozhatjuk, és a kettős rétegük továbbá tartalmazhat más komponenseket, így koleszterint és lipid-konjugált hidrofил polimereket. A méretüktől és a kettős rétegek számától függően a liposzómákat az alábbi kategóriákba is sorolhatjuk: (a) multilamelláris vezikulumok (MLV), (b) nagy unilamelláris vezikulumok (LUV), (c) kis unilamelláris vezikulumok (SUV), (d) multivezikulum vezikulumok (MVV), (e) oligolamelláris vezikulumok (OLV).

A liposzómákat alkotó foszfolipidek kémiai-fizikai tulajdonságai, így a membránfluiditás, a töltéssűrűség, a térgátlás

Aktaszám: 96640-4023-KT/KmO

és a permeabilitás befolyásolják a liposzómák és a vér összetevőit, a szövetek és a sejtek közötti kölcsönhatást.

A liposzómák elismerten lehetséges értékes hordozók a hatóanyagok számára. A liposzómák hatóanyagokat tartalmazó, hordozó és felszabadító képességei számos klinikai alkalmazáshoz vezetnek. A gyógyászati területen a liposzómák legegyszerűbb alkalmazása a nem toxikus hordozóanyagokként való alkalmazás oldhatatlan hatóanyagokhoz. Az összetettebb alkalmazások közé tartozik a liposzómák tárolóként (reservoir) való alkalmazása a hatóanyagok felszabadulásának elnyújtására vagy a hatóanyag lokalizációjára abból a célból, hogy vagy elkerüljünk, vagy elérjünk egy adott szövetet. A liposzóma formájában lévő hatóanyagok kedvező eredményeket adtak számos betegség kezelése és megelőzése esetén, így például mikrobellenes terápia, rákellenes terápia esetén, oltásokban adjuvánsként, hormon- és enzimterápiákban, diagnosztikai eljárásokban és bőr- és szembetegségek kezelésében. A betegségek, így a rák kezelésére használt hatóanyagok általában korlátozott terápiás indexszel rendelkeznek, és nagymértékben toxikusak lehetnek a normális szövetekre. A liposzómás készítmény javíthatja a terápiás indexet, módosítva a hatóanyag biológiai eloszlását. A nyújtott plazmabeli felezési idővel rendelkező liposzómába kapszulázott antraciklinekkel végzett bizonyos kísérletek a kardiotoxicitásban csökkenést mutattak, és az állatok jobb túlélési arányát mutatták a kontrollokhoz képest, amelyeknek a szabad hatóanyagot adták be. Egy antrakinon daganatellenes szer, a doxorubicin esetén a liposzómás készítmények alkalmazása hatékonynak bizonyult a toxicitás csökkentésében. A doxorubicin legveszélyesebb mellékha-

tása progresszív irreverzibilis szívkárosodás. A liposzómába kapszulázott doxorubicin kisebb toxicitást mutatott, miközben a terápiás hatékonysága megmaradt. A 4 797 285, 4 898 735 és 5 043 166 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban doxorubicin/liposzomás készítményeket ismertetnek, valamint ezek alkalmazását rák kezelésében.

A BBR 2778 vegyület egy antrakinon daganatellenes szer, amely antitumor aktivitással és csökkentett kardiotoxicitással rendelkezik, és az (1) szerkezeti képlettel jellemezhető.

A BBR 2778 vegyület teljes ismertetését találjuk az 5 587 382, 5 717 099, 5 506 232 és 5 616 709 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban és a *J. Med. Chem.*, **37**, 828-837 (1994) szakirodalmi helyen.

CD1 egereknek BBR 2778 40 vagy 60 mg/kg dózisának bólusként történő i.v. beadása után egyes állatok elpusztulását figyeljük meg akár a kezelés során, akár közvetlenül utána.

Az ilyen hirtelen halálok feltételezetten a BBR 2778 alkalmazásával kapcsolatos alábbi tényezők egyikének tudhatók be: trombogén aktivitás; véralvadási paraméterek változása szétszórt érbeli rögök képződésével; anafilaxiás sokk kiváltása; közvetlen toxikus hatás a központi idegrendszerre; aritmogén aktivitás; elektrolitikus kiegyensúlyozatlanság. A dózis-függő jelenség csökken a beadási sebesség csökkenésével (0,1 ml/perc, 7-8 perc injekciónként), valamint intraperitoneális beadás esetén is.

A találmány alapjául szolgáló feladat tehát a BBR 2778 vegyületből egy olyan alkalmas készítmény kidolgozása, amellyel leküzdhetők a fent említett hátrányok, különösen a hatóanyag



bólusz beadása utáni hirtelen halál. Meglepő módon azt találtuk, hogy egy adott összetétellel jellemezhető BBR 2778 liposzómás készítmény sikeresen megoldja az említett feladatot.

A találmány tehát BBR 2778 vegyület liposzómás készítményére vonatkozik, amely foszfatidilkolint, koleszterint és BBR 2778-at tartalmazó liposzómákból áll, ahol a koleszterin/foszfolipid tömegarány 1:2 és 1:7 közötti, és a BBR 2778/foszfolipid tömegarány 1:4 és 1:25 közötti. A foszfatidilkolinok előnyösen palmitinsav, olajsav, linolsav, γ -linolsav, linolénsav és sztearinsav közül választott savak maradékait tartalmazzák, és a liposzóma hidrogénezett és nem hidrogénezett foszfatidilkolinok keverékéből képződik, amely a jelzett zsírsavösszetételt tartalmazza 1:2 - 2:1 arányban, még előnyösebb az említett elegy 120°C olvadáspontú és 90°C kristályosodási pontú hidrogénezett foszfatidilkolinból és az 5. ábrán bemutatott termogrammal rendelkező nem hidrogénezett foszfatidilkolinból áll. A fent említett összetételű hidrogénezett és nem hidrogénezett foszfatidilkolinok kereskedelmi forgalomban kaphatók PHOSPHOLIPON® 90 H illetve PHOSPHOLIPON® 90 kereskedelmi néven.

A találmány szerinti kompozíció a fentiekben említett összetevőkön kívül előnyösen tartalmaz töltéssel rendelkező vegyületeket, így sztearil-amint és dicetil-foszfátot. Az említett vegyületek hozzáadása a liposzómáknak felületi töltést ad, ami kölcsönös taszítást vált ki, így megvédi őket az összeeséstől. A foszfolipid keverék tartalmazhat nátrium-dodecil-szulfátot, Cremophor RH60-at, α -tokoferol-foszfátot és kalcium-acetátot is. Ezen kívül hidrofил csoportokkal rendelkező vegyületek kis frakciói (5-19 mol%), így például monosialogangliozi-

dot, hidrogénezett foszfatidilinozítot és lipid-konjugált poli-
etilén-glikolokat (PEG-DSPE) is bevihetünk a kettős rétegű
membránba a liposzómák és a sejtek és a vér összetevői közötti
kölcsönhatás csökkentésére.

A találmány szerinti liposzomás készítményeket *in vivo*
vizsgáltuk antitumor aktivitásuk és toxicitásuk szempontjából.
Daganat modellként P388 egér leukémiát használtunk. A hirtelen
halálra gyakorolt gátló hatást közelebbről a kontroll csoport-
tal összehasonlítva értékeltük, mely csoportnak a szabad ható-
anyagot tartalmazó készítményt adtuk be. A részleteket a pél-
dákban ismertetjük. A vizsgálatok eredményei bizonyítják, hogy
a találmány szerinti liposzomás készítmények az átlagos túlélé-
si idő jelentős javulását, és a toxicitás jelentős csökkenését
eredményezik. Ezen kívül nem figyelünk meg hirtelen halált.

Következésképpen kijelenthetjük, hogy a találmány szerinti
készítmények fenntartják az antitumor aktivitást anélkül, hogy
hirtelen halált okoznának, amit a szabad hatóanyag vagy az ak-
tív összetevő szokásos készítményei beadása esetén megfigye-
lünk.

Az alábbi példák a találmányt részletesebben szemléltetik.

1. példa

Lecitin tisztítása foszfatidilkolinná

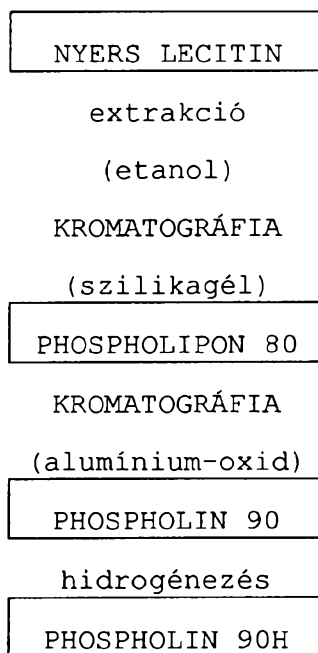
A lecitin fő forrásai a szójababból, gyapotból, napraforgó-
ból és repcemagokból származó növényi olajok vagy állati szöve-
tek (tojás). A termelt mennyiségek tekintetében a szója- és a
tojáslecitin a legfontosabb. A szójababot hexánnal extraháljuk,
így félig szilárd konzisztenciájú nyers lecitint kapunk, amely
az alábbiakat tartalmazza:

52% foszfolipid, 35% olajak és zsírok, 10% glikolipidek és cukrok, 2% el nem szappanosítható anyag és 1% víz.

A nyers lecitinből zsírsavakat extrahálunk, így finom eloszlású vagy szemcsés lecitin port kapunk, amit ezután etanollal extrahálunk, és frakcionáljuk magasabb foszfatidilkolin-tartalmú tisztább lecitinek előállítására.

A nyers lecitint foszfatidilkolin ipari előállítására egyetlen eljárásban is tisztítottuk acetonnal való extrahálással, ahogyan azt az 5 442 276 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban ismertetik.

Nyers lecitin tisztítása



A PHOSPHOLIPON® 90 H-t (PHO 90H) PHOSPHOLIPON® 90 (PHO 90) hidrogénezésével kaptuk.

A két kereskedelmi forgalomban kapható foszfolipid (Rhone - Poulanc Rorer) az alábbi jellemzőkkel rendelkezik:

PHOSPHOLIPON® 90:

- peroxid index: max. 5
- savérték: max. 0,5
- etanol: max. 0,5%
- víz: max. 1,5%
- forma: sárga pasztaszerű szilárd anyag
- d,l α -tokoferol hozzáadása min. 0,1%

PHOSPHOLIPON® 90H:

- jódszám: max. 1
- víz: max. 2,0%
- a 20%-os vizes diszperzió fázisátalakulási hőmérséklete mintegy 54°C.

- forma: fehér kristályos szilárd anyag.

A foszfatidilkolin molekulában a glicerín 1- és 2-helyzetei zsírsavakkal, így palmitinsavval, olajsavval, linolsavval, linolénsavval vagy sztearinsavval észtereztetettek.

2. példa

Foszfolipidek kromatográfiás elemzése

A foszfatidilkolin minták zsírsavösszetételét mind mennyiségi, mind minőségi vonatkozásban GLC elemzéssel határoztuk meg. A foszfolipid mintákban levő zsírsavakat mind tiszta zsírsav-metilészterek (Carlo Erba), mind standard olívaolaj alkalmazásával detektáltuk és adagoltuk.

A minta elszappanosítása: 50 mg terméket kémcsőbe mértünk, és hozzáadtunk 3 ml 1 M nátrium-hidroxid-oldatot (Baker). A kémcsövet szorosan lezártuk, és alkalmas kemencébe helyeztük 110°C-ra 1 órára. Szobahőmérsékletre hűlés után a mintát 2 M sósavval (Baker) savanyítottuk és 10 ml n-hexán/etil-acetát

90:10 eleggyel (Merck) extraháltuk. A szerves oldószert enyhe nitrogénáram alatt eltávolítottuk.

A minták észteresítése: a szerves fázist eltávolítottuk a kémcsőből, hozzáadtunk 1 ml, metanollal készült BF_3 -at, a kémcsövet szorosan lezártuk és 1 órán át 100°C -on tartottuk. Szobahőmérsékletre hűlés után a mintához 5 ml desztillált vizet adtunk, és 2x5 ml n-hexán/etil-acetát 90:10 eleggyel extraháltuk. A szerves fázisból 1 μl -t nátrium-szulfáton szárítottunk, majd gázkromatográfiás berendezésbe injektáltuk.

Működési körülmények:

gázkromatográf: Mega 5300 Carlo Erba

oszlop: Megawax, hossza: 30 m, belső átmérő: 0,32 mm,

filmvastagság: 0,25 μm

mozgó fázis: helium sp 45 cm/sec

injektor: split 1/100 250°C -on

Lángionizációs detektor: F.I.D. 280°C -on

Kemence: 120°C 1 percig

Véghőmérséklet: 250°C , 5°C /perc hőmérsékleti növekedéssel

Az 1-3. ábrák a standard, a PHO 90 és a PHO 90H gázkromatogramjait mutatják be.

Az 1. táblázat az analizált lipidek savösszetételét mutatja százalékokban kifejezve.

1. táblázat

Zsírsavak	Phospholipon 90	Phospholipon 90H
Sztearinsav	4,13	85
Palmitinsav	14,21	14
Olajsav	9,84	-
Linolsav	64,44	-
Gamma-linolsav	1,50	-
Linolénsav	5,88	-

3. példa

Foszfolipidek termális elemzése

A PHO 90 és PHO 90 H kereskedelmi foszfolipideket DSC-vel elemeztük önmagukban és elegyként is.

A mintákat az alábbiak szerint készítettük el: 500 mg PHO 90-et feloldottunk 10 ml diklórmétánban + 1 ml metanolban (S_1); 500 mg PHO 90H-t feloldottunk 10 ml diklórmétánban + 1 ml metanolban (S_2).

1. minta: 2 ml S_1
2. minta: 2 ml S_2
3. minta: 0,5 ml S_1 + 1,5 ml S_2
4. minta: 1 ml S_1 + 1 ml S_2
5. minta: 1,5 ml S_1 és 0,5 ml S_2 .

A mintákat nitrogéngázáram alatt és enyhe melegítéssel szárítottuk, majd DSC-vel elemeztük. Az elemzést Mettler DSC 20 készülékkel végeztük 200°C-ra való melegítéssel 3°C/perc gradienssel, majd a mintát hűlni hagytuk.

A 4-5. ábrák a két foszfolipid termogramját mutatják. Ahogyan a 4. ábrán megfigyelhetjük, a HPO 90H feltűnő, jól definiált olvadásponttal rendelkezik 120°C-nál és kristályosodási ponttal 90°C-nál.

Ami a PHO 90-et illeti, az 5. ábra azt mutatja, hogy ez nem egy kristályos por, hanem egy tésztaszerű massa, így, mint minden zsírnak, nem jól definiált olvadáspontja, hanem lágyulási pontja - ami az a hőmérséklet, amelynél a zsír folyni kezd - és átlátszósági pontja van, ami az a hőmérséklet, aminél a zsír teljesen átlátszó.

Ezt megerősíti a HPO90 termogramja, ahol egy széles sáv található a lágyulási pontnak megfelelően egy határozott csúcs helyett, amit a HPO 90H termogramja esetében megfigyelünk.

Ami a keverékek termogramját illeti, a kristályosodási pont csökkenése figyelhető meg alacsonyabb hőmérsékleteknél, ami tovább csökken a PHO 90H : PHO 90 2:1 arányú elegyétől az 1:1 arányú elegyig, és végül teljesen eltűnik a PHO 90H : PHO 90 1:2 arányú elegyénél, ahol a PHO 90 viselkedése érvényesül.

4. példa

A liposzómás készítmény előállítása

Egy 500 ml-es gömblombikba bemértünk 3,6 g PHO 90-et, 1,8 g PHO 90H-t (2:1 arány) és 0,52 g koleszterint, és hozzáadtunk 50 ml diklórmétánt. Az elegyet mintegy 10 percig szonikáltuk az oldódás elősegítési céljából. A kapott oldatot szárazra pároltuk forgó filmbepárlóban (Rotavapor) 40°C-on vákuum alatt kis mértékű forgással, amíg homogén foszfolipid filmet nem kaptunk.

A kapott foszfolipid filmet hűtöttük, majd hozzáadtunk egy BBR 2778 oldatot, amelyet úgy készítettünk, hogy 300 mg BBR 2778-at 60 ml víz/propilén-glikol 60:40 elegyben oldottunk, és 0,22 µm-es szűrőn keresztül és 10 ml 2 mm-es átlagos átmérőjű üveggyöngyön szűrtünk. A gömblombikot a Rotavapor-ra erősítettük és lassú mozgás alatt hagytuk egy éjszakára (15 óra, 300 fordulat/perc) környezeti hőmérsékleten és nyomáson teljes újra-hidratálódásig. A 2. táblázat a kapott BBR 2778 készítmény elemzési eredményeit mutatja.

2. táblázat

BBR 2778 készítmény

A liposzómákba kapszulázott anyag %	85,82
A BBR 2778 összkoncentrációja (mg/ml)	4,76
A 0,22 µm-es vagy annál kisebb liposzómák %-a	63,53

5. példa

BBR 2778 liposzómák antitumor aktivitásának értékelése

Állatok: az állatokat a Charles River Breeding Laboratories (Calco, Como, Italy) szállította; ezek 6-8 hetes hím egerek voltak, szokásos tartási körülmények között.

Készítmények: összehasonlítóként az egereknek a beadás előtt közvetlenül steril vízben feloldott és hígított BBR 2778-at használtunk 10 mg/kg dózisban. A 4. példa szerinti liposzomás készítményt használtuk.

Daganat modell: az NCI Frederick Cancer Facility-től (USA) beszerzett P388 egér leukémia sejteket DBA2 egerekben intra-peritoneális transzplantátumok sorozatán keresztül tartottuk fenn. Az egereknek 10^6 sejt/egér arányban adtuk be a P388 leukémia sejteket, a liposzóma vegyületet és az összehasonlító standardot i.v. adtuk be a daganat beültetése után 1, 4 és 7 nappal.

Az antitumor aktivitást az egerek túlélési idejének százalékos növekedéseként határoztuk meg, amit a kezelt csoport átlagos túlélési ideje (TMS) (T) és a kontroll csoport túlélési ideje (C) T/C százalék arányként fejeztünk ki:

$$T/C\% = \frac{\text{TMS kezelt állatok}}{\text{TMS kontroll állatok}} \times 100$$

A 3. táblázatban bemutatjuk a BBR 2778 antitumor aktivitását a vizsgált készítményben.

3. táblázat

Vegyület	Dózis (mg/kg/nap)	T/C%	TOX*	Hirtelen halál
Kontroll		100	0/9	-
BBR 2778 oldat	18	199**	1/56	-
	27	226**	9/71	-
	40	159**	32/53	2/53
	60	36**	23/32	2/32
4. példa szerinti készítmény	Hordozó	100	0/8	
	18	187; 194	0/17	
	27	225; 244	0/17	
	40	287; 250	2/16	
	60	87; 44	17/17	

* Toxikus halálok száma/az összes egér száma

** Több vizsgálat átlagos értéke.

A 4. példa szerinti készítmény és a BBR 2778 oldat összehasonlítása nyilvánvalóan bizonyítja hirtelen halál eltűnését a liposzómás készítménnyel kezelt egereknél. Az egyes egyedi beadott dózisok elemzése variációkat mutat mind a T/C% értékben, mind a toxicitásban a liposzómás készítmény és az oldatkészítmény között; 18 mg/kg és 27 mg/kg dózisban nem figyelünk meg jelentős különbséget a T/C százalékos értékekben, míg a toxicitás tekintetében ezt csak nem kapszulázott BBR 2778-cal való kezelés után figyeljük meg.

A találmány szerinti készítmény a BBR 2778 oldattal összehasonlítva 40 mg/kg dózisban az átlagos túlélési idő jelentős javulását vonja maga után: 287, 250 illetve 159; és a toxicitás jelentős csökkenését (12% illetve 60,4%). A 60 mg/kg dózis mindkét készítmény esetén toxikus.

Tehát kijelenthetjük, hogy a találmány szerinti BBR 2778 liposzómás készítmény beadása nem okoz hirtelen halált, valamint csökkenti a toxicitást.

Ami az antitumor aktivitást illeti, a BBR 2778 oldatával végzett vizsgálatokból származó eredményeket megerősítettük, sőt a T/C% értékek jelentősen növekedtek egyes dózisoknál.

Szabadalmi igénypontok

1. (1) képletű 6,9-bisz-[(2-aminoetil)amino]benzo[g]-izokinolin-5,10-dion-dimaleát (BBR 2778) vegyületből készült liposzómás készítmény, amelyben a liposzómák foszfatidilkolint, koleszterint és BBR 2778 vegyületet tartalmaznak, ahol a koleszterin/foszfolipid tömegarány 1:2 és 1:7 közötti, és a BBR 2778/foszfolipid tömegarány 1:4 és 1:25 közötti.

2. Az 1. igénypont szerinti liposzómás készítmény, amelyben a foszfatidilkolin palmitinsav, olajsav, linolsav, gamma-linolsav, linolénsav és sztearinsav közül választott zsírsavak maradékait tartalmazza.

3. Az 1. igénypont szerinti liposzómás készítmény, ahol az említett foszfatidilkolin hidrogénezett és nem hidrogénezett formák 1:2 - 2:1 tömegarányú keveréke.

4. A 3. igénypont szerinti liposzómás készítmény, ahol a hidrogénezett forma olvadáspontja 120°C és kristályosodási pontja 90°C, és a nem hidrogénezett forma termogramja lényegében az 5. ábrán bemutatottal megegyező.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti liposzómás készítmény, ahol a liposzóma továbbá sztearil-amint és/vagy diacetil-foszfátot tartalmaz.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti liposzómás készítmény alkalmazása daganatellenes gyógyszer előállítására.

G. C. C. C. C. C. C.

2002. 11. 26.

PK

A meghatalmazott:

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

Kmethy

Kmethy Boglárka

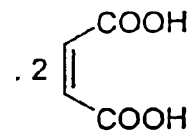
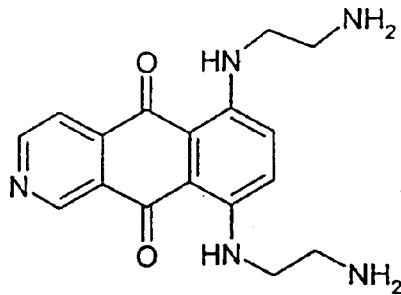
szabadalmi ügyvivőjelölt

P02 03473

33830 A2

1/6

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



(1)

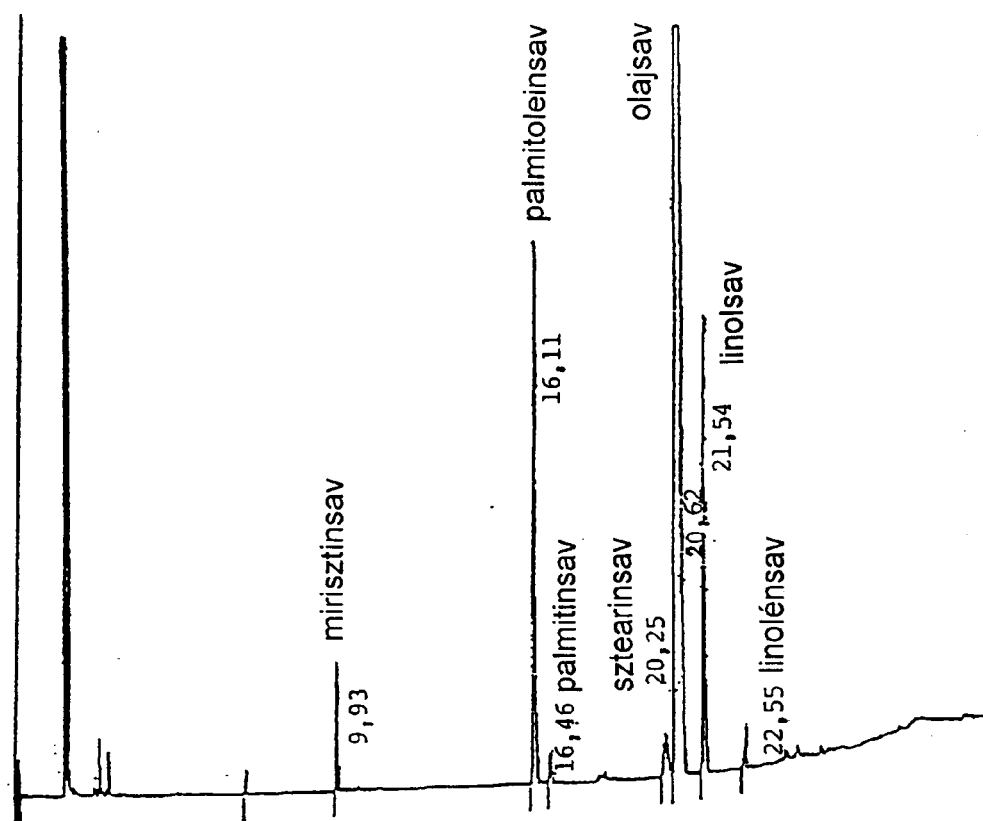
P 0 2 0 3 4 7 3

12

000000

2/6

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



Olívaolaj gázkromatogram

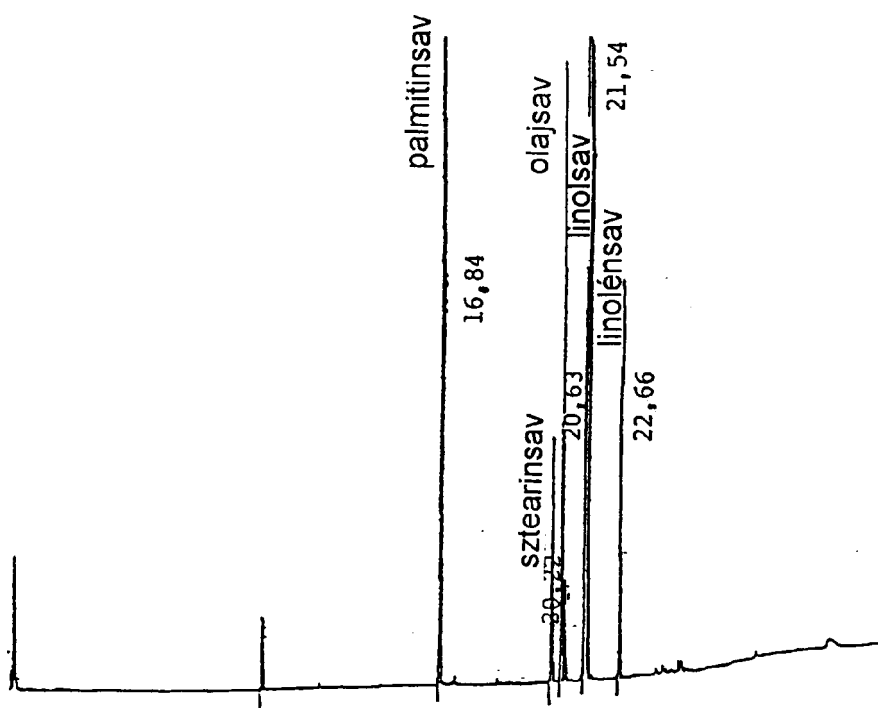
1. ábra

P02 03473

33830

3/6

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



Foszfolipon 90 gázkromatogram

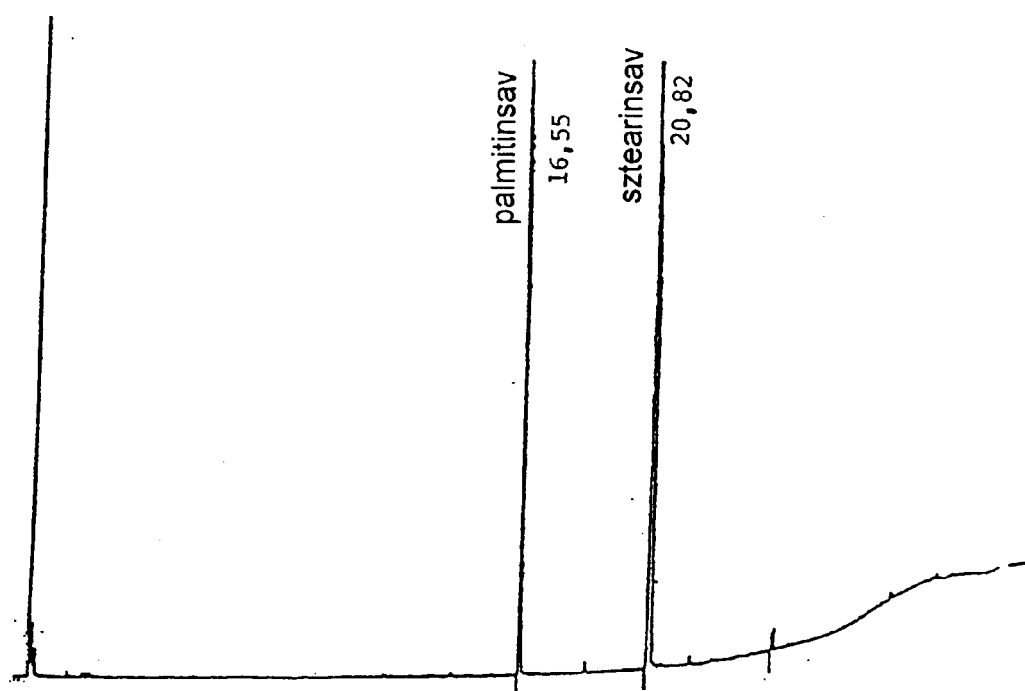
2. ábra

P 0 2 0 3 4 7 3

33830

4/6

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



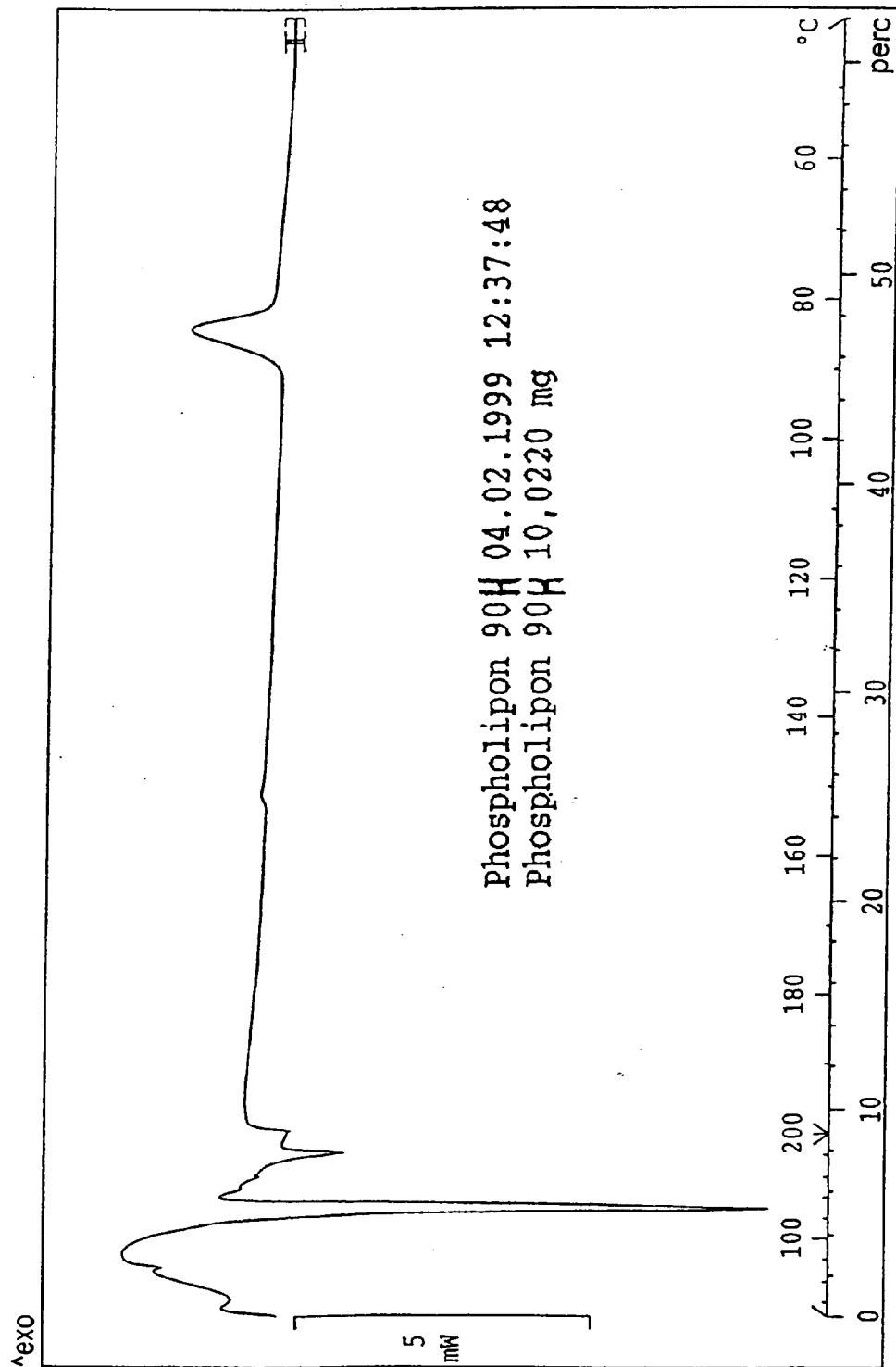
Foszfolipon 90H gázkromatogram

3. ábra

P02 03473

33830

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY 5/6



PHOSPHOLIPON® 90H DSC elemzése

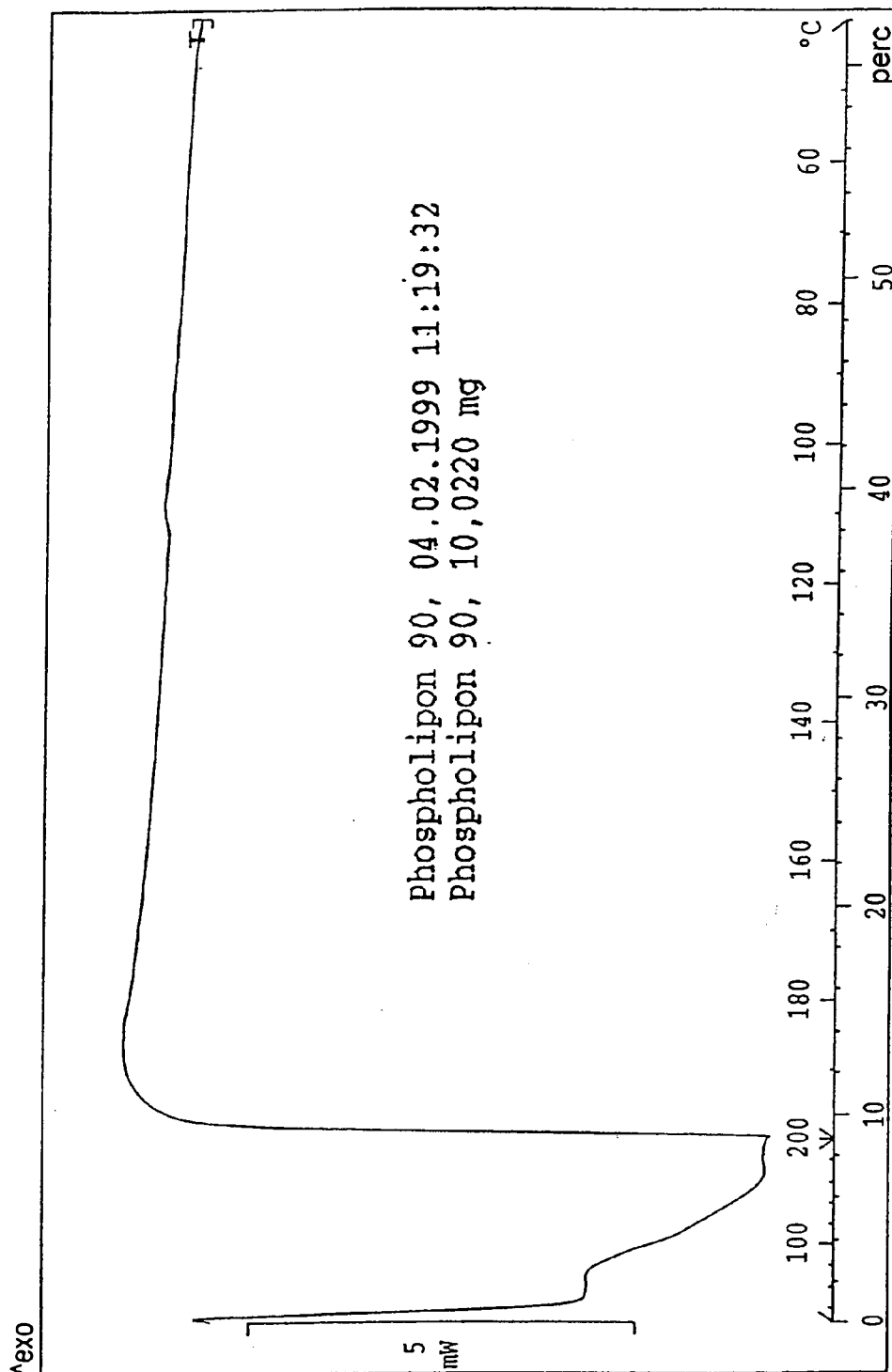
4. ábra

P02 03473

000000

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

6/6



PHOSPHOLIPON® 90 DSC elemzése

5. ábra