

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) **BG**

(11) **62875 B1**
6(51) A 61 K 9/48
A 61 K 47/34



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 101443
(22) Заявено на 25.04.97
(24) Начало на действие
на патента от: 31.07.96

Приоритетни данни

(31) 519689	(32) 25.08.95	(33) US
620021	21.03.96	US
622516	25.03.96	US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 3 на 31.03.98
(45) Отпечатано на 31.10.2000
(46) Публикувано в бюлетин № 10
на 31.10.2000
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприетел(и):
SANGSTAT MEDICAL CORPORATION,
MENLO PARK, CA; UNIVERSITY OF NORTH
CAROLINA AT CHAPEL HILL, CHAPEL HILL,
NC (US)

(72) Изобретател(и):
Moo J. Cho
Chapel Hill, NC
Ralph E. Levy
Pleasanton, CA
Philippe J. Pouletty
Atherton, CA (US)
Robert Floc'h
Nantes
Christian Merle
Poitiers (FR)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Юлиан Иванов Върбанов, 1000 София,
ул. "Позитано" 3, ет. 2

(86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/US96/12569, 31.07.96

(87) № и дата на РСТ публикация:
WO97/07787, 06.03.97

(54) ЦИКЛОСПОРИНОВИ СЪСТАВИ ЗА ОРАЛНО ПРИЕМАНЕ

((57) Съставите намират приложение в имуносупресивната терапия. Те са с повишена биологична усвояемост и могат да се прилагат под формата на твърди капсули или наночастици. Циклоспоринът се доставя в съставите чрез орално приемлив ексципиент, включващ най-малко един алканолен разтворител с 2 до 3 въглеродни атома в комбинация най-малко с едно нейонно повърхностно активно вещество. Съставите могат да включват също най-малко един съразтворител, например мастни киселини и диоли.

14 претенции, 6 фигури

BG 62875 B1

(54)ЦИКЛОСПОРИНОВИ СЪСТАВИ ЗА ОРАЛНО ПРИЕМАНЕ

Област на изобретението

Областта на изобретението е циклоспоринови състави за орално приемане.

Предшестващо състояние на техниката

Въпреки усилията да се избегне отхвърляне на трансплантант чрез подходящ вид тъкан домакин-дарител, в болшинството трансплантационни процедури, където дарителският орган е въведен в домакина, имunosупресивната терапия е критична за поддържането жизнеспособност на дарителския орган в домакина. При трансплантационни процедури се прилагат различни имunosупресивни агенти, включващи азатиоприн, метотрексат, циклофосфамид, FK - 506, рапамицин и кортикостероиди. Циклоспорините са агенти, които намират повишено използване в имunosупресивната терапия, дължащо се на тяхното избирателно действие върху междинните реакции на Т клетката.

Циклоспорините са клас от циклични полипептиди, съдържащи 11 аминокиселини, които са получени като метаболит чрез гъбните видове *Tolyposcladium inflatum* Gams. Наблюдавано е циклоспорините реверсивно да инхибират имуноподходящи лимфоцити, специално Т-лимфоцити, в G_0 или G_1 фаза на клетъчния цикъл. Наблюдавано е също циклоспорини реверсивно да инхибират лимфокиново образуване и освобождаване.

Въпреки, че са известни многобройни циклоспорини, най-широко използван е циклоспорин А.

Съобщено е, че съществува използване на циклоспорин А с цел да се продължи оцеляването на алогенни трансплантанти, включващи кожа, сърце, бъбреци, панкреаса, костен мозък, тънко черво и бял дроб. При алогенните трансплантации, циклоспорин А показва, че подтиска хуморалния имунитет и в по-голяма степен, клетъчните междинни имунни реакции, включващи: отхвърляне на трансплантанта, забавена свръхчувствителност, експериментален алергичен енцефаломиелит, артрити на Freund и присаждане при множествено заболяване. Въпреки, че има постигнат успех с циклоспорин А, по-нататъшното трансплантационно приложение на агента трябва да продължава, докато ползите от циклоспориновата терапия са обратими и се спира отхвърляне на присаждането, осъществено единствено от прилагане на циклоспорин А.

Въпреки, че циклоспориновите състави са усъвършенствани, както за орално, така и за венозно приложение, оралното прилагане на циклоспорина се предпочита поради лесното прилагане и по-голямото одобрение от пациента. Освен това, венозното прилагане на циклоспорин може да доведе до свръхчувствителни реакции, докато страничен ефект не се наблюдава при състави за орално приемане. Циклоспоринови състави за орално приемане, които са усъвършенствани и са търговски общоприети, включват, както мека желатинова капсула, така и разтвор на съставите, двете форми се

продават под търговските марки SANDIMMUNE® и NEORAL™.

При орално използване на циклоспоринови състави в имunosупресивната терапия, грижещият се, който дава лекарството, и производителят трябва да имат предвид много последици. При циклоспоринови състави за орално приемане, биологичната усвояемост на циклоспорина може да бъде ограничена поради циклоспориновата несмесваемост във вода и възможността на циклоспорина да се утаи във водни среди. В допълнение, концентрацията на присъстващия циклоспорин във формулировките за орално приемане може да бъде ограничена в зависимост от хидрофобния характер на циклоспорините. По-нататък, абсорбирането на циклоспорина чрез гастроинтестиналния тракт може да бъде неравномерно при различните състави, което изисква постоянно наблюдение на нивата на циклоспорина в кръвта по време на лечение. Накрая, стабилността при опаковане и съхранение също е свързана с оралното приемане на съставите. Например, при мека желатинова капсула на състави на циклоспорин, трябва да се използва херметична опаковка, която е неудобна по отношение на обемността и високата цена на производството. По-нататък, циклоспориновите състави могат да бъдат нестабилни при ниски температури, като може да се случи кристализация на циклоспорина.

Така, желаните циклоспоринови състави за орално приемане са състави, които са насочени най-малко към няколко от горните проблеми. Идеалните формулировки за орално приемане подпомагат високата биологична

усвояемост, включват високи концентрации циклоспорин и се поддават на лесно получаване на твърда капсулна форма.

Релевантна литература

В Physician's Desk Reference (1994) стр. 2071 - 2074 се описва, че циклоспоринови състави за орално приемане е общоприето да се продават под търговската марка SANDIMMUNE®.

Циклоспоринови състави за орално приемане също са описани в NEORAL™ Package insert (1995) (Sandoz Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, New Jersey, 07936).

U.S. патенти, описващи циклоспорини и техни производни, включват 4220641; 4639434; 4289851 и 4384996. U. S. патент 5047396, описва венозен препарат за прилагане на циклоспорин. U. S. патенти 4388307; 4970076 и 4990337 описват получаването на циклоспоринови състави за орално приемане.

Получаването на твърди капсули за орално приемане на фармацевтични състави е описано в U.S. патенти 4822618; 4576284; 5120710 и 4894235.

Същност на изобретението

Осигурени са циклоспоринови състави за орално приемане и методи за тяхното използване в имunosупресивната терапия. В разглежданите състави циклоспоринът присъства в орално приемлив ексципиент, включващ най-малко един алканолен разтворител с от 2 до

3 въглеродни атоми в комбинация с най-малко 1 нейонно повърхностно активно вещество. Разглежданите състави могат по-нататък да включват един или повече съразтворители, където интересни съразтворители са естери и диоли на мастни киселини. Циклоспоринови състави могат да бъдат опаковани като твърди капсули. Чрез включване на полиоксиалкиленово повърхностно активно вещество при разреждане на стабилната дисперсия във водна среда, се осигуряват аморфни биодостъпни циклоспоринови наночастици.

Кратко описание на фигурите

Фигура 1 представлява максималната циклоспоринова концентрация (C_{max}), постигната при пълхове за няколко състава за орално приемане съгласно предмета на изобретението, където C_{max} е показана като относителна стойност, сравнена със C_{max} , постигната със състав SANDIMMUNE® ORAL (SO).

Фигура 2 представлява времето (T_{max}), при което се осъществява C_{max} за всеки от съставите, показани на фигура 1, където T_{max} е представена като относителна стойност спрямо T_{max} на състава SANDIMMUNE® ORAL (SO).

Фигура 3 представлява относителната площ под кривата концентрация на кръвта - време (AUC) за всеки от съставите, показани на фигура 1, където AUC е предвидена като относителна стойност, сравнена спрямо стойността на AUC за състава SANDIMMUNE® ORAL (SO).

Фигура 4 представлява максималната циклоспоринова концентрация (C_{max}), постигната при хора за няколко състава за орално приемане съгласно предмета на изобретението, както и за разтвора SANDIMMUNE® ORAL ("Sand" на фигурата).

Фигура 5 представлява времето (T_{max}), при което се осъществява C_{max} за всеки от съставите, показани на фигура 4.

Фигура 6 представлява площта под кривата концентрация на кръвта - време (AUC) за всеки от съставите, показани на фигура 4.

Описание на специфични случаи

Осигурени са циклоспоринови състави за орално приемане, които промотират биологична усвояемост и могат да бъдат формулирани като капсули, по-специално твърди капсули. В разглежданите състави циклоспоринът присъства под формата на орално приемлив ексципиент, включващ най-малко един алканолов разтворител с два до три въглеродни атоми в комбинация с най-малко едно нейонно повърхностно активно вещество. По-нататък, разглежданите състави могат да включват най-малко един съразтворител, като подходящи съразтворители са естери и диоли на мастни киселини. Всички компоненти от разглежданите състави са фармацевтично приемливи. В допълнение, за да се осигури висока биологична усвояемост, се предвижда разглежданите състави да възпроизвеждат циклоспоринова абсорбция от всяка

дозировка. Разглежданите състави намират приложение в имunosупресивната терапия.

Известно е от нивото на техниката, че многобройни циклоспорини показват имunosупресивна активност и могат да бъдат доставени чрез разглежданите състави за орално приемане. Циклоспорини, които могат да бъдат прилагани в разглежданите състави, включват циклоспорин А, циклоспорин В, циклоспорин С, циклоспорин D и циклоспорин G, както и техни синтетични аналози. Виж Merck Index (1989) 2759. Разглежданите състави за орално приемане са специално подходящи за доставянето на циклоспорин А. Когато се доставя чрез разглежданите състави, циклоспорин А присъства в концентрации, вариращи от 50 до 150 mg/ml, обикновено 100 до 150 mg/ml, базирани на обема на ексципиентния компонент на състава.

Ексципиентният компонент от разглежданите състави включва алканолов разтворителен компонент, където алканоловият разтворителен компонент съдържа най-малко един алканол и обикновено не повече от три различни алканоли, най-вероятно не повече от два различни алканоли, където алканолите обикновено са с от 2 до 3 въглеродни атома, и с от 1 до 2 хидроксилни групи, така че да има не повече от 1 хидроксилна група на 1.5 въглеродни атома. Подходящи алканоли включват етанол и пропилен гликол. Общото количество на алканоловия разтворител в състава е най-малко около 1% (v/v), обикновено най-малко около 3% (v/v) и може да бъде най-много 90% (v/v), но главният обхват е от около 5 до 75% (v/v), обикновено от около 5 до 60% (v/v) и най-вероятно от около 10 до 60% (v/v)

от състава. Когато етанолът присъства в състава като алканолов разтворител, количеството на етанола може да варира от 5 до 20% (v/v), обикновено от около 5 до 15% (v/v) от състава, докато когато пропилен гликола присъства като алканолов разтворител, количеството на пропилен гликола в разглеждания състав може да варира от около 5 до 90% (v/v), обикновено от около 5 до 85% (v/v), най-вероятно от около 10 до 50% (v/v) от състава.

В орално приемливия ексципиент също присъства най-малко едно нейонно полиоксиалкиленово повърхностно активно вещество, обикновено не повече от две полиоксиалкиленови нейонни повърхностно активни вещества. Полиоксиалкиленовите повърхностно активни вещества имат хидрофилно - липофилен баланс (HLB) от около 5 до 20, обикновено от около 8 до 16. За предпочитане, полиоксиалкиленовите нейонни повърхностно активни вещества, използвани в разглежданите състави, са полиоксиетиленови съединения. Интересни полиоксиетиленови съединения са: етоксилирани алкохоли, например полиоксиетиленови алкохоли или етоксилирани мастни алкохоли, където алкохолните вериги обикновено са с от 10 до 18, по-вероятно с от 10 до 14 въглеродни атоми, както и техни етерни и естерни заместители; и полиоксиетиленови производни на мастни киселини, по-специално естери, обикновено моноестери, на полиоли с от 4 до 6 въглеродни атоми, обикновено 6 въглеродни атома, където полиолите могат да бъдат полиолни анхидриди, например сорбитан. Веригите на мастната киселина на разглежданите повърхностно активни вещества обикновено са с от 10 до

18 въглеродни атоми. Многобройните етилен оксидни групи обикновено варират от 2 до 30, най-вероятно в обхвата от 2 до 25. Предпочитани повърхностно активни вещества са полиоксиетилен (4) лаурил етер (BRIJ 30[®]) и полиоксиетилен (20) моно сорбитанов моно - олеат (TWEEN 80[®]). Общото количество на нейонно повърхностно активните вещества, присъстващо в разглежданите състави, варира от 5 до 65%, обикновено от около 5 до 60% (v/v) от състава. Където присъства TWEEN 80[®] в състава, обикновено количествата варират от 5 до 60%, най-вероятно от около 10 до 50 % (v/v) от състава. Когато в разглеждания състав присъства BRIJ 30[®], обикновено неговите количества варират от 10 до 45%, най-вероятно от около 15 до 40 % (v/v) от състава.

По-нататък разглежданите състави могат да включват един или повече съразтворители, обикновено не повече от 3 различни съразтворители, най-вероятно не повече от два различни съразтворители, като подходящи съразтворители са естери и диоли на мастни киселини, където съразтворителят може да бъде 100% естер на мастна киселина, 100% диол или комбинация от тях. Общото количество на съразтворителя, присъстващ в състава, може да варира от около 20 до 80% (v/v) и обикновено варира от около 20 до 75 % (v/v). Когато присъства в състава, съотношението на съразтворителя към разтворителя в разглежданите състави може да варира от около 1:1 до 15:1, но обикновено варира от около 1:1 до 13:1.

Естери на мастни киселини, които могат да служат като съразтворители в разглежданите състави, са тези естери на мастни киселини, при които въглеводородната верига на мастната киселина е с дължина от 12 до 18, обикновено 14 до 18 въглеродни атоми, където естерът на мастната киселина е моно - естер на нисш алканол. Подходящи естери на мастни киселини обикновено включват четен брой вериги на мастната киселина, където въглеводородната верига може да бъде наситена или ненаситена, обикновено притежаваща не повече от 2 ненаситени места. Интересни мастни киселини главно от растителен или животински произход включват палмитат, стеарат, палмитолеат, линолеат, линоленат и др. подобни, по-специално миристат и олеат. Алкохолът на моно-естера на мастната киселина е нисш алканол с дължина от 2 до 4 въглеродни атома, обикновено с дължина от 2 до 3 въглеродни атома, с или без разклонения. По-специално, интересни естери на мастни киселини са изопропилов миристат и етилов олеат. Когато присъства изопропилов миристат, той варира от около 55 до 75% (v/v), и когато присъства етилов олеат, той варира от около 35 до 75% (v/v) спрямо състава. Обикновено, естера на мастната киселина присъства в количество, най-малко около еквивалентното (v/v) и над 8 пъти от количеството на повърхностно активното вещество в състава, обикновено не по-голямо от 5 пъти от количеството на повърхностно активното вещество в състава (v/v).

Диоли също могат да присъстват в разглежданите състави, като те могат да присъстват в допълнение към или

на мястото на разтворителя, представляващ естер на мастна киселина. Интересни диоли като съразтворители обикновено са течности при физиологични температури и включват диоли с от 8 до 28 въглеродни атома, обикновено 16 до 20 въглеродни атома, като диолът може да бъде полиоксиалкиленов диол, където алкилените са с от 2 до 3 въглеродни атома. Подходящи диоли, използвани като съразтворители, могат да варират от около 200 до 800 daltons, обикновено от около 200 до 650 daltons. Особено интересни диоли са полиетилен гликолите, в частност полиетилен гликол 200 (PEG₂₀₀), полиетилен гликол 400 (PEG₄₀₀), полиетилен гликол 600 (PEG₆₀₀) и други подобни, с предпочитание на PEG₄₀₀. Когато присъстват като съразтворители в разглежданите състави, диолите варират от около 5 до 60% (v/v), обикновено от 5 до 55% (v/v) от състава.

За образуване на аморфните частици е желателно в състава общото количество нисш алканол да бъде обикновено в обхвата от около 25 до 60 тегловни процента, по-желателно е да бъде в обхвата от около 30 до 50 тегловни процента. Общото количество на алкиленокси съединението (съединенията) е обикновено в обхвата от около 20 до 50 тегловни процента, най-вероятно в обхвата от около 25 до 40 тегловни процента. Където се използват комбинации на полиоксиалкиленови съединения, количеството на естера на мастната киселина обикновено варира от около 25 до 100 процента спрямо полиоксиалкиленовите съединения.

В разглежданите състави, самите съразтворители могат да предават желани физични свойства на състава,

такива като вискозитет, стабилност и др. подобни. Където е желателно, съставът може да включва допълнителни агенти, които да му придават физични свойства, такива като съгъстяващи агенти, суспендиращи агенти, втвърдяващи агенти и др. подобни, като такива агенти са акация, карбоксиметилцелулоза, хидроксипропилцелулоза лецитин, метилцелулоза, полиетилен гликоли с високо молекулно тегло, например тези полиетилен гликоли с молекулни тегла, вариращи от около 1000 до 6000, обикновено 1000 до 5000 daltons, повидон, натриев алгинат, трагант и др. подобни. В разглежданите състави също могат да присъстват различни незначителни компоненти, които осигуряват различни функции, такива като ензимни инхибитори, консерванти, антиоксиданти, антимикробни агенти, стабилизатори и др. подобни. Общото количество на тези съгъстяващи и други агенти, когато присъстват в състава, обикновено не е по-високо от 5 тегловни процента, по-вероятно 2 тегловни процента, най-вероятно 1 тегловен процент от състава. Броят на ексципиентите в разглежданите състави може да бъде, както е в известното ниво на техниката.

Разглежданите състави са стабилни за широк обхват от температури, където чрез стабилност се осигурява физичната цялост на състава, например не се осъществява кристализация на циклоспориновия активен агент. Вътре в температурния обхват са включени по-ниски температури, при които разглежданите състави са стабилни, такива като тези, използвани при съхраняване в хладилник, където такива по-ниски температури обикновено варират от около 0 до 15⁰С, по-специално от около 2 до 8⁰С.

Разглежданите състави са подходящи за прилагане под формата на капсули, например твърди и меки капсули. Методи за получаване на твърди капсули, включващи течни състави, са известни от нивото на техниката и описани в U.S. патент 4822618 и 4576284, разкритията на които са вмъкнати тук чрез цитиране. Обикновено, твърди капсули, които намират приложение с разглежданите състави, включват 2 части: обвиващ компонент и капсулен компонент. Обвиващият и капсулният компонент се свързват заедно, за да се получи капсулована кухина на определен обем, херметизиран в твърдата капсулна обвивка. Обвиващият и капсулният компонент могат да бъдат произведени от хидрофилен полимер, като нишесте или желатин. При приготвяне на твърдите капсули течният състав се излива вътре в обвиващия компонент и след това капсулата се херметизира чрез нанасяне на капсулния компонент върху обвиващия компонент. Херметизирането между двата компонента може да бъде осигурено чрез предотвратяване просмукването на капсулования състав от капсулата, чрез използване на материал за уплътняване, описан в EP 116744, разкритието на който е вмъкнато тук чрез цитиране. За да се избегне разграждането в стомаха, капсулите, включващи разглежданите състави, могат да бъдат покрити с интестинално покритие, което подтиска разлагането на капсулата в киселата среда на стомаха. Известни са от нивото на техниката различни ентерични покрития. Виж например, U.S. патент 5206219, разкритието на който е вмъкнато тук чрез цитиране.

Съставите, по-специално съставът с наночастици, може да бъде получен чрез първоначално разтваряне на

циклоспорина в нисшия алканол, където може да бъде включена малка част от полиоксиалкиленовото съединение, обикновено по-малко от около 50 тегловни процента от състава, използван за разтваряне на циклоспорина. Може да бъде използвана повишена температура, обикновено в обхвата от около 60 до 90°C. След разтваряне на циклоспорина може да бъде добавена по-голямата част от полиалкиленокси съединението и целият състав доведен до желаното съотношение чрез добавяне на подходящите компоненти. Обикновено, циклоспоринът може да бъде разтворен в нисшия алканол (по желание включващ част от полиалкиленокси съединението) при тегловно съотношение около 1:1.5 - 5, за предпочитане 1:2 - 4.

Разглежданите състави намират приложение в имunosупресивната терапия. Имunosупресивната терапия е посочена при широк кръг от заболявания, включващ идиопатичен нефротичен синдром, инсулин - зависими диабети тип I, синдром на Behcet, активно заболяване на Crohn, апластича анемия, строго кортикостероидна - зависима астма, псориазис, ревматидни артрити и други заболявания, при които имунната система може да играе патогенна роля. Специален интерес е използването на разглежданите състави при трансплантантни ситуации, включващи както алогенна, така и ксеногенна органна, тъканна или клетъчна трансплантация, където имunosупресията е желана, за да се осигури поддържане жизнеспособността на трансплантирания орган или тъкан или клетка, следващи трансплантацията, например да се предотврати отхвърлянето на трансплантанта или

предотврати трансплантиране, например при заболяване на домакина, например при следваща костно-мозъчна трансплантация.

При използване на разглежданите състави, за да се осигури имunosупресивна терапия на домакина, се прилага орално ефективно количество циклоспорин, за да се постигне желаното ниво на имunosупресивност в домакина, зависещо по-специално от условията за лечение. При трансплантация началната доза циклоспорин обикновено се прилага преди операция. След трансплантация на донорния орган в домакина постоянно се прилага циклоспорин, например хронично, спрямо домакина, за да се поддържа имunosупресия. Началната доза се прилага от 4 до 12 часа преди трансплантацията и може да варира от 10 до 18 mg/kg домакин, обикновено 10 до 15 mg/kg домакин. След операцията началната доза обикновено продължава ежедневно за период от 1 до 3 седмици, обикновено 1 до 2 седмици. След това дозата може да бъде сведена до поддържаща доза от 3 до 10 mg/kg на ден, обикновено 3 до 6 mg/kg на ден. Плъхът, при който дозата е сведена до поддържащото ниво, може да варира от 3 до 8% на седмица и обикновено около 5% на седмица. Обикновено дозата се нагласява, така че да бъде базирана на нивата в кръвта, за да се поддържа концентрация от 150 до 250 ng/ml, като се измерва чрез HPLC, RIA, ELISA или TDx анализи. Разглежданите състави могат да бъдат прилагани заедно с допълнителни агенти, където се препоръчва допълнителна терапия, известна от нивото на техниката. Например разглежданите състави

могат да бъдат прилагани заедно с надбъбречни кортикостероиди, азатиоприн и други подобни.

Прилагане на разглежданите състави заедно с трансплантация на донорен орган спрямо домакина води до продължаване жизнеспособността на донорния орган в домакина, като резултат от подтискане на имунните отговори на домакина спрямо присъствието на донорния орган. "Продължаване на жизнеспособността" означава, че донорният орган остава жизнеспособен в домакина за по-дълъг период от време, отколкото при имunosупресивната терапия, прилагана заедно с трансплантацията. Така, продължаване на жизнеспособността включва поддържане на жизнеспособност за определен период от време. Счита се, че донорният орган е жизнен, докато се поддържа неговото функциониране в средата на домакина. За удобство на използването могат да бъдат осигурени комплекти, притежаващи подходящо количество циклоспорин, една или повече дози и съразтворители, наречени нисш алканол (алканоли) и полиалкиленокси съединение (съединения), например най-малко 1 етанол и пропилен гликол, и най-малко 1 полисорбат 80 и PEG400.

Следващите примери са представителни за илюстрация и по никакъв начин не са ограничаващи.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Получени са няколко циклоспоринови състави за орално приемане съгласно предмета на изобретението.

Биологичната усвояемост на циклоспорина при получените състави беше наблюдавана при плъхове и хора.

I. *Циклоспоринови състави за орално приемане.*

Приготвят се следните състави с циклоспорин А за орално приемане. При всеки случай, в колба с обем 1.0 ml, се добавят 100 mg CsA, определено количество повърхностно активно вещество и определено количество етанол или пропилен гликол и крайният обем от 1.0 ml се достига чрез добавяне на подходящ обем естер и/или диол на мастна киселина.

Формулировка	Състав		
19	EtOH Tween 80 IM	0.1 ml 300 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.278 ml) ((0.622 ml) (531 mg))
20	EtOH Brij 30 IM	0.05 ml 350 mg q.s. до 1.0 ml	(5%) (0.368 ml) ((0.582 ml) (496 mg))
21	PG Brij 30 IM	0.05 ml 350 mg q.s. до 1.0 ml	(5%) (0.368 ml) ((0.582 ml) (496 mg))
22	EtOH Tween 80 EO	0.1 ml 300 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.278 ml) ((0.622 ml) (541 mg))
23	EtOH Brij 30 EO	0.05 ml 350 mg q.s. до 1.0 ml	(5%) (0.368 ml) ((0.582 ml) (506 mg))
24	PG Brij 30 EO	0.05 ml 350 mg q.s. до 1.0 ml	(5%) (0.368 ml) ((0.582 ml) (506 mg))
33	EtOH Brij 30 IM	0.1 ml 150 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.158 ml) ((0.742 ml) (633 mg))
34	EtOH Brij 30 EO	0.1 ml 150 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.158 ml) ((0.742 ml) (646 mg))
35	EtOH Tween 80 PG	0.1 ml 500 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.463 ml) ((0.437 ml) (453 mg))

36	EtOH Tween 80 PG EO	0.1 ml 300 mg 100 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.278 ml) (0.097 ml) ((0.525 ml) (465 mg))
37	EtOH Tween 80 PEG400 EO	0.1 ml 300 mg 100 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.278 ml) (0.088 ml) ((0.534 ml) (464 mg))
38	EtOH Brij 30 PG EO	0.1 ml 300 mg 100 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.316 ml) (0.097 ml) ((0.487 ml) (424 mg))
39	EtOH Brij 30 PG EO	0.1 ml 300 mg 200 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.316 ml) (0.193 ml) ((0.391 ml) (340 mg))
40	PG Brij 30 EO	300 mg 300 mg q.s. до 1.0 ml	(0.290 ml) (0.316 ml) ((0.394 ml) (343 mg))
41	EtOH Brij 30 Tween 80 EO	0.05 ml 150 mg 100 mg q.s. до 1.0 ml	(5%) (0.158 ml) (0.093 ml) ((0.649 ml) (565 mg))
42	PG Brij 30 Tween 80 EO	0.05 ml 150 mg 100 mg q.s. до 1.0 ml	(5%) (0.158 ml) (0.093 ml) ((0.649 ml) (565 mg))
43	EtOH Tween 80 PG	0.10 ml 400 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.371 ml) (0.529 ml)
44	EtOH Tween 80 PEG ₄₀₀	0.10 ml 400 mg q.s. до 100 ml	(10%) (0.371 ml) ((0.529 ml) (601 mg))
45	EtOH Tween 80 PG PEG ₄₀₀	0.10 ml 300 mg прибл. 250 mg прибл. 250 mg	(0.278 ml) (0.243 ml) (0.220 ml)
46	EtOH Tween 80 PG	0.10 ml 100 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.093 ml) (0.807 ml)
48	EtOH Tween 80 PG PEG ₄₀₀	0.10 ml 200 mg прибл. 250 mg прибл. 250 mg	(0.186 ml) (0.243 ml) (0.220 ml)
49	EtOH Tween 80 PG	0.10 ml 600 mg q.s. до 1 ml	(10%) (0.558 ml) (0.342 ml)
50	EtOH Tween 80 PG	0.10 ml 300 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.278 ml) (0.622 ml)

51	EtOH Tween 80 PG	0.10 ml 200 mg q.s. до 1.0 ml	(10%) (0.186 ml) (0.714 ml)
52	EtOH Tween 80 PG	0.05 ml 400 mg q.s. до 1.0 ml	(5%) (0.371 ml) (0.579 ml)

PG = пропилен гликол;

EtOH = етанол

Brij 30 = полиоксиетилен (4) лаурилов етер

Tween 80 = полиоксиетилен (20) моно сорбитан моно-олеат

IO = изопропилов мирилат

EO = етилов олеат

II. Изследвания *in vivo* за биологично усвояемост за състави 19 - 24 и 33 - 42

Биологичната усвояемост на циклоспорина от състави 19 - 24 и 33 - 42 беше изследвана, както следва. Докато се измерва биологичната усвояемост, се определят следните фармакологичнокинетични параметри: (a) максимална концентрация на циклоспорин в кръвта (C_{max}); (b) необходимо време за постигане на C_{max} (T_{max}); и площта под кривата концентрация на кръвта - време (AUC). В допълнение към съставите 19 - 24 и 33 - 42, за сравнителни цели се наблюдава биологичната усвояемост на циклоспорина при SANDIMMUNE® Oral Solution (SO) при аналогични условия. За всеки от горните състави, плъхове CsA-naive Sprague Dawley, тежащи 250 - 350 gm, се хранят с пелетизирана стандартна храна (Agway® 3000, Granville Mill, Greensboro, NC) и вода *ad libitum*. Един ден преди експеримента, под лека етерна анестезия, в дясната юголарна и десните бедрени вени се включва силиконова

каучукова канюла. След гладуване през цялата нощ се прилага CsA посредством захранване чрез сонда.

След прилагане на лекарството от юголарната вена се събират 200 μ l кръвни проби в 0.5 ml полипропиленова тръбичка съдържаща 0.3 mg диофилизирана Na EDTA и се завихрят незабавно в продължение на 10 секунди. Изпробваните времена за животни, обработени със състави за орално приемане, са 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 и 72 часа след прилагане.

CsA, включително някои негови метаболити, се определят в цялата кръв чрез флуоресцентен поляризационен имуноанализ (FPI) (TDx, Abbot Lab.) Накратко, 150 μ l от цялата кръвна проба се прехвърлят количествено в 1.5 ml тръбичка. Клетките се лизират и разтварят с 50 μ l повърхностно активно вещество, съдържащо разтварящ реагент. След това протеините се утаяват с 300 μ l ацетонитрил. След центрифугиране, супернатантата се подлага на FPI анализ в автоматичен анализатор TDx последван от процедурата препоръчана от Abbott Diagnostics. Отдавна TDx анализът е усъвършенстван за човешка кръв, като някои препоръчани процедури са модифицирани, както следва. Приготвят се серия стандартни разтвори с известна концентрация на CsA чрез добавяне на известно количество CsA в кръвта на плъх, обработен с EDTA. Когато концентрацията на CsA в пробата се очаква да бъде по-висока от 1.0 μ g/ μ l, кръвната проба се разрежда 10 пъти в 0.1 M - фосфатен буфер при pH 7.0. За разредените проби се прави друга калибрационна крива, като се използват серии стандартни

разтвори, съдържащи известни количества CsA, която е обем - степен при 10% кръв от плъх и 90% фосфатен буфер.

Описателни фармакологичнокинетични параметри се получават от неглавните анализи. Максималната концентрация (C_{max}) и времето, при което се постига максималната концентрация (T_{max}), се оценяват чрез разглеждане на необработен профил концентрация - време за всеки плъх. Площта под кривата (AUC) концентрация на кръвта - време от първата до последната точка от данните ($AUC_{0 \rightarrow t}$) се изчислява съгласно линейната трапецовидна процедура. Остатъчна площ под опашката на кривата концентрация на кръвта - време ($AUC_{t \rightarrow \infty}$) се оценява, като съотношението на последната наблюдавана концентрация (C^*) спрямо първата - нормативна последователност постоянно се свързва с крайното елиминиране фазата на профила (λ_z) концентрация - време. Контактният коефициент λ_z се определя чрез log линейна регресия на данните концентрация - време в явната крайна log линейна фаза на профила концентрация - време (например крайните 3 до 5 изследвани точки, зависещи от профила на анализа). Общата AUC ($AUC_{t \rightarrow \infty}$) се дава като сума от $AUC_{0 \rightarrow t}$ и $AUC_{t \rightarrow \infty}$.

Резултатите за всеки състав се сравняват с резултатите, получени за SO, и са предвидени във фигури 1-3. Резултатите показват, че за болшинството от съставите по-голяма биологична усвояемост на циклоспорин се постига с разглежданите състави в сравнение с SANDIMMUNE® Oral Solution (SO), както е

отбелязано чрез по-високите AUC стойности на разглежданите състави.

III. Биологична усвояемост in vivo от хора на състави 35, 43 - 46 и 48 - 52.

48 здрави мъже на възраст между 19 и 52 години с отклонение от идеалното тегло не повече от 20% се използват като обекти за изследване. Провежда се тройно засичащо се изследване с 1случайно избрана доза при гладуване. 48^{те} обекти са случайно подредени в 6 групи по 8 обекти. Всяка група получава веднъж 300 mg доза циклоспорин от горните състави или SANDIMMUNE® Oral Solution (SO), в три различни случая, където всеки случай се отделя от 7 дневен изчистващ период.

Обектите се нуждаят от гладуване 10 часа преди и 4 часа след дозиране. Вода се допуска ad libitum по време на изследването, с изключение на 1 часов период, преди да се вземе следващата доза. Преди дозирането се изтегля 15 ml кръвна проба. За приложенията 3 ml аликвотни части от състава (300 mg) се комбинират с 200 ml шоколадово мляко и се поглъщат орално. Изтеглят се кръвни проби от 10 ml при време, равно на 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 и 24 часа. След изследването също се изтегля 15 ml кръвна проба.

Концентрации на циклоспорин А в цялостните кръвни проби се анализират, като се използва TDx (Abbott Diagnostics, N. Chicago, IL) съгласно инструкциите на производителя.

Неглавни фармакологичнокинетични параметри се получават, като се използват стандартни методи. Максималната концентрация (C_{max}) на цялата кръв и времето за нейното постигане (T_{max}) са събрани от изследването концентрация - време. Площта под кривата (AUC) концентрация - време се изчислява по линейното трапецовидно правило спрямо последната концентрация на кръвта над границата на чувствителността (25 ng/ml) и се екстраполира до безкрайност.

Наблюдаваните C_{max} , T_{max} и AUC стойности за всеки състав са усреднени. Средните стойности за всеки състав са предвидени при фигури 4 - 6. Резултатите показват, че за всеки изследван състав C_{max} се постига най-малко 2 пъти със SANDIMMUNE® Oral Solution (SO) при същите условия. Наблюдаваната AUC за изследваните състави беше при най-малко 200 ng.hr/ml по-голяма, отколкото за SANDIMMUNE® Oral Solution (SO) при същите условия. Базираны върху тези резултати, състави 35, 43 - 46 и 48 - 52 осигуряват по-голяма биологична усвояемост, отколкото SANDIMMUNE® Oral Solution (SO).

Приготвят се състави за образуването на аморфни наночастици при разреждане във водна среда.

IV. Състави с наночастици.

A. 5 g циклоспорин А се добавят към 5 ml етанол. Сместа се разбърква, за да завърши разтварянето на циклоспорин А. Към получения разтвор се добавят 25 g полисорбат 80 и обемът се довежда до 50 ml чрез 1,2-пропиленгликол. Сместа се разбърква достатъчно при

стайна температура, докато се образува хомогенен разтвор.

В. 5 g циклоспорин А се добавят към 5 ml етанол. Сместа се разбърква, докато завърши разтварянето на циклоспорин А. Към получения разтвор се добавят 15 g полисорбат 80 и обемът се довежда до 50 ml чрез смес от 1,2-пропилен гликол и полиетилен гликол 400. Сместа се разбърква достатъчно при стайна температура, докато се образува хомогенен разтвор.

С. Един милилитър от разтвора, получен от пример 1, се добавя в 50 ml вода със стъклена спринцовка, като се препоръчва за орално прилагане на концентрирани емулсии или микроемулсии при хора. Добавянето на разтвора е последвано от бързо разтваряне и получаване на бяла суспензия от фини частици, притежаваща синьо отражение както колоидални суспензии (Тиндалов ефект). След центрофугиране на 26,000 g в продължение на 5 часа утайката се промива с вода и след това се центрофугират 26,000 g в продължение на 24 часа. Промиването и центрофугирането се повтарят двукратно при същите условия. След изсушаване се прави рентгенографска прахова диаграма. Твърдото вещество е изключително в аморфна форма.

Утайката се изследва чрез сканиращ електронен микроскоп. Утайката е съставена от аморфни сферични наночастици с диаметър между 200 и 400 nm в присъствието на някои агрегати.

Д. 2 ml разтвор, получен в пример 1, се добавят в 100 ml вода и колоидалната суспензия се изследва 10 минути и 1 час след разреждане посредством

дифракционно дифузионен лазерен гранулометър (Malvern SB.OD).

След 1 час се наблюдават частици на две популации:

първата, представляваща 70% от теглото на циклоспорин А със среден диаметър 300 nm, и втората, представляваща 30% от теглото на циклоспорин А със среден диаметър 20 μ m, вероятно съставляващи агрегати на наночастици.

Е. Един милилитър разтвор, получен в пример 1, се добавя към 50 ml вода и колоидалната суспензия се разбърква в продължение на 10 минути.

След това суспензията се добавя към 200 ml изкуствен кисел стомашен сок и се затопля при 37°C. Хомогенната колоидална суспензия се изследва чрез дифракционно дифузионен лазерен гранулометър (Malvern SB.OD). Суспензията е съставена изключително от наночастици със среден диаметър 600 nm.

Ф. Един милилитър от разтвора, получен в пример 1, се добавя директно към 200 ml изкуствен кисел стомашен сок.

Хомогенната суспензия се затопля при 37°C и се изследва бързо чрез дифракционно дифузионен лазерен гранулометър (Malvern SB.OD). Суспензията е съставена изключително от наночастици със среден диаметър 350 nm.

От горните резултати и обсъждане е очевидно, че са осигурени нови циклоспоринови състави, притежаващи висока биологична усвояемост. Разглежданите състави са способни да съдържат високи концентрации циклоспорин и са стабилни при съхранение в широк обхват от температури, включващ ниски температури, обикновено

използвани при охлаждане. Разглежданите състави се поддават на изработване в капсулна форма, включително твърда капсулна форма, осигуряваща лесно съхраняване и транспортиране. Съставите осигуряват също аморфни наночастици, които водят до усилване биологичната усвояемост на циклоспорина.

Всички публикации и патентни заявки, цитирани в тази спецификация, са вмъкнати тук чрез цитиране, като ако всяка индивидуална публикация или патентно описание са специфично и индивидуално отбелязани, би трябвало да са вмъкнати чрез цитиране.

Въпреки че горното изобретение е описано подробно чрез илюстриране и пример с цел яснота при разбиране, то е лесно достъпно за обикновения специалист от областта при изучаването му, като обикновени промени и модификации могат да бъдат направени, без да се излиза от същността и обхвата на приложените претенции.

Патентни претенции

1. Циклоспоринов състав, характеризиращ се с това, че включва по същество: циклоспорин; най-малко един алканолен разтворител с от 2 до 3 въглеродни атома; и най-малко едно нейонно полиоксиалкиленово повърхностно активно вещество, при което повърхностно активното вещество е избрано от групата, включваща полиоксиетиленови алкохоли и мастно кисели моноестери на етоксилирани полиоли с от 4 до 6 въглеродни атома.

2. Циклоспоринов състав, характеризиращ се с това, че включва по същество: циклоспорин; най-малко един алканолен разтворител с от 2 до 3 въглеродни атома; най-малко едно нейонно полиоксиалкиленово повърхностно активно вещество, при което повърхностно активното вещество е избрано от групата, включваща полиоксиетиленови алкохоли и мастно кисели моноестери на етоксилирани полиоли с от 4 до 6 въглеродни атома; и най-малко един съразтворител, избран от групата, включваща моноестери на низш алканол и мастна киселина с от 14 до 18 въглеродни атома и диоли с от 8 до 28 въглеродни атома.

3. Състав съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че споменатият алканолен разтворител е от около 5 до 75% (v/v) от споменатия състав, че споменатото най-малко едно нейонно полиоксиалкиленово повърхностно активно вещество е от около 5 до 65% (v/v) от споменатия състав и че споменатият най-малко един съразтворител е от около 20 до 80% (v/v) от споменатия състав.

4. Циклоспоринов състав, характеризиращ се с това, че включва по същество: циклоспорин А; най-малко един

алканолен разтворител, избран от групата, включваща етанол и пропиленгликол, при което споменатият разтворител е от около 5 до 75% (v/v) от споменатия състав; най-малко едно нейонно полиоксиетиленово повърхностно активно вещество, при което нейонното полиоксиетиленово повърхностно активно вещество е избрано от групата, включваща полиоксиетиленови алкохоли и моноестери на етоксилирани сорбитани, и е от около 5 до 65% (v/v) от споменатия състав; и най-малко един съразтворител, при което един от споменатите съразтворители е моноестер на низш алканол с от 2 до 4 въглеродни атома и мастна киселина с от 14 до 18 въглеродни атома, при което споменатият съразтворител е от около 20 до 80% (v/v) от споменатия състав.

5. Състав съгласно претенция 4, характеризира се с това, че споменатото нейонно повърхностно активно вещество е избрано от групата, включваща полиоксиетилен (4) лаурилов етер и полиоксиетилен (20) моносорбитанов моноолеат, че споменатият мастно кисел естер е избран от групата, включваща изопропилов миристат и етилов олеат, и че споменатият състав включва два съразтворителя, при което един от съразтворителите е диол с от 8 до 28 въглеродни атома.

6. Циклоспоринов състав за приемане през устата, характеризира се с това, че включва по същество: циклоспорин А при концентрация, варираща от около 50 до 150 mg/ml; компонента алканолен разтворител, включващ етанол и пропиленгликол, при което компонентът алканолен разтворител е от около 5 до 75% (v/v) от споменатия

състав; и моноестер на етоксилиран сорбитан при около 10 до 50% (v/v) от споменатия състав.

7. Състав съгласно претенция 6, характеризиращ се с това, че споменатият етанол е от около 5 до 20% (v/v) от споменатия състав.

8. Състав съгласно претенция 6, характеризиращ се с това, че споменатият пропиленгликол е от около 10 до 50% (v/v) от споменатия състав.

9. Твърда капсулна циклоспоринова формулировка, характеризираща се с това, че включва твърда капсула, съдържаща състав за приемане през устата съгласно претенция 1.

10. Водна дисперсия на циклоспоринови наночастици, характеризираща се с това, че най-малко 50% тегл. от циклоспорина присъства в дисперсията с частици, по-малки от около 1 μm , като споменатият циклоспорин е аморфен.

11. Дисперсия съгласно претенция 10, характеризираща се с това, че включва незначителни количества низш алканол и най-малко едно полиоксиетиленово повърхностно активно вещество.

12. Дисперсия съгласно претенция 11, характеризираща се с това, че споменатият низш алканол е най-малко един от етанол и пропиленгликол и че споменатото полиоксиетиленово съединение е полисорбат 80.

13. Циклоспоринов състав, характеризиращ се с това, че включва циклоспорин, най-малко един компонент от етанола или пропиленгликола и най-малко един компонент от полисорбат 80 или PEG 400.

14. Метод за получаване на водна дисперсия от циклоспоринови частици съгласно претенция 10, като методът се характеризира с това, че включва смесване най-малко на един компонент от етанола или пропиленгликола с циклоспорин, за да се образува разтвор; и смесване на споменатия разтвор с повърхностно активното вещество полиетиленокси, за да се образува втори разтвор, който при разреждане с вода образува аморфни наночастици от споменатия циклоспорин.

Приложение: 6 фигури

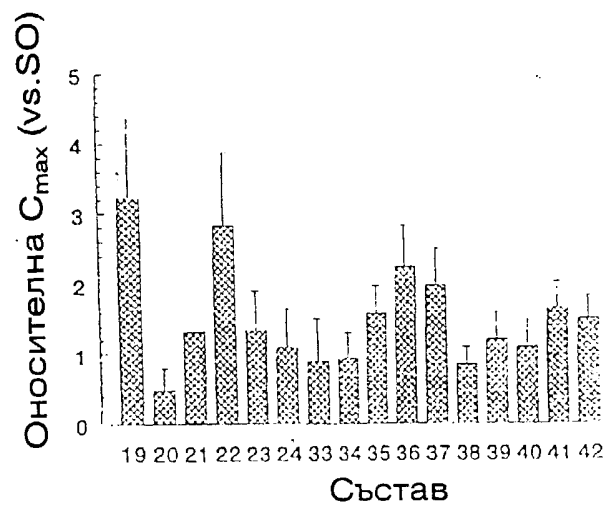
Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Р.Курукафова

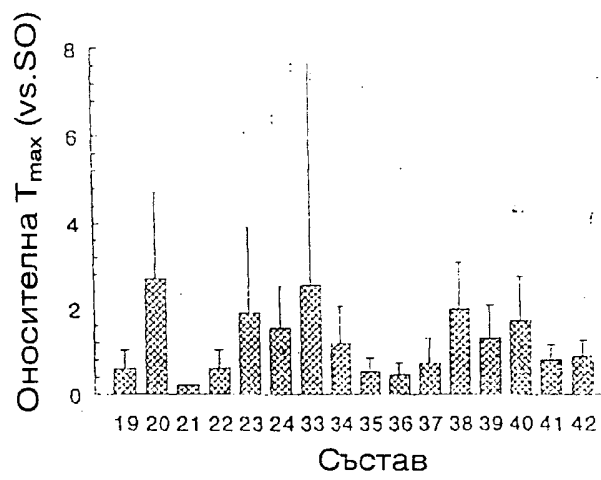
Редактор: А.Семерджиева

Пор. № 40301

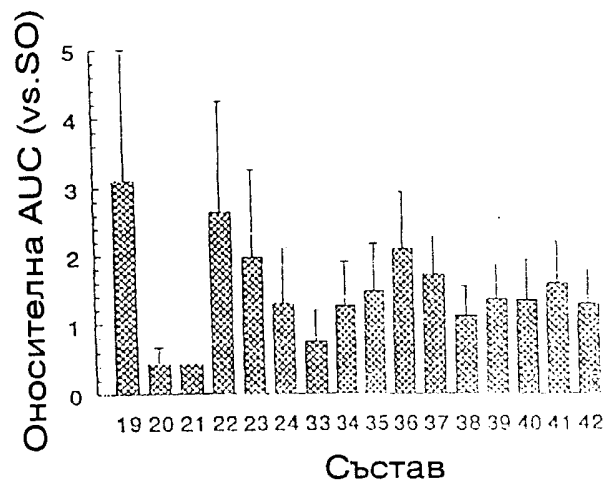
Тираж: 40 СР



Фигура 1



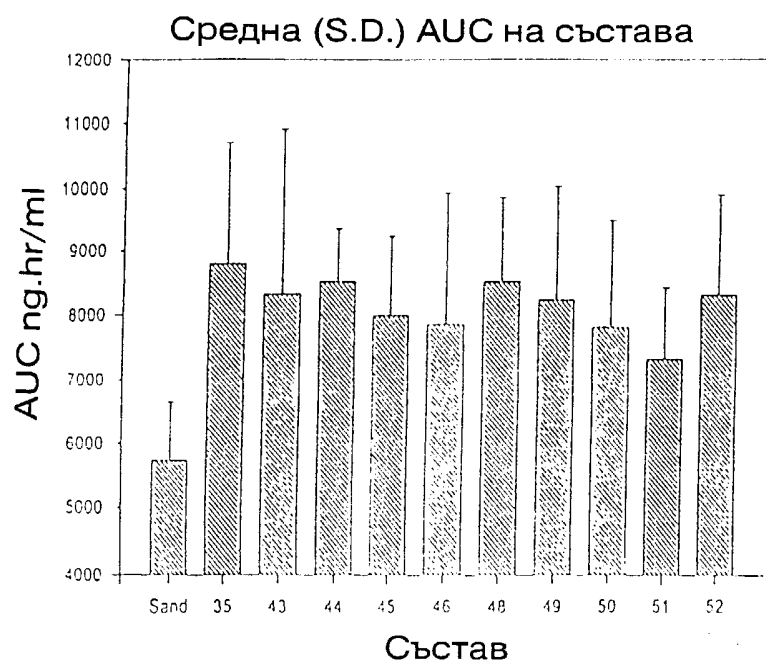
Фигура 2



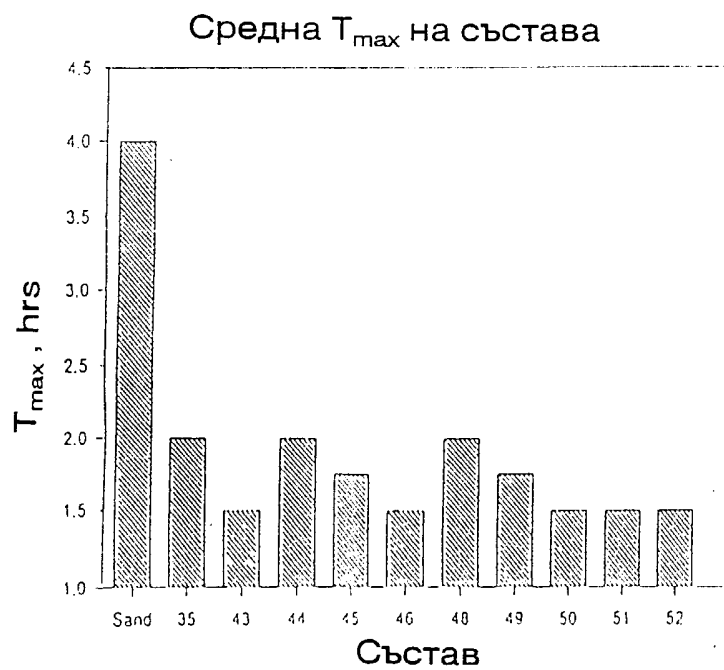
Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5



Фигура 6