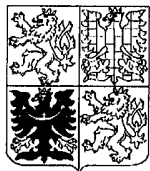


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.10.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.10.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/956841**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/22330**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/20296**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 2337

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/13

A 61 K 47/10

A 61 K 47/14

A 61 K 47/34

A 61 K 9/48

A 61 P 37/06

(71) Přihlašovatel:

SANGSTAT MEDICAL CORPORATION, Menlo
Park, CA, US;
THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL, Chapel Hill, NC, US;

(72) Původce:

Cho Moo J., Chapel Hill, NC, US;
Levy Ralph E., Pleasanton, CA, US;
Pouletty Philippe J., Atherton, CA, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
140 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Perorální farmaceutické přípravky
cyklosporinu**

(57) Anotace:

Perorální cyklosporinový přípravek se zlepšenou biologickou
dostupností cyklosporinu, obsahující cyklosporin, nejméně jedno
C₂₋₃alkanolové rozpouštědlo, nejméně jednu neiontovou
povrchově aktivní látku volenou ze skupiny zahrnující
polyoxyethylenové alkoholy a monoestery mastných kyselin s
ethoxylovanými C₄₋₆polyoly; a nejméně jeden polyglykol o
molekulové hmotnosti v rozmezí 800 až 10 000 h.j.

Perorální farmaceutické přípravky cyklosporinu

Tato přihláška je pokračováním přihlášky poř. č. 08/620 021, podané 21.3.1996, která je pokračováním přihlášky poř. č. 08/519 689, podané 25.8.1995, která je zde uvedena v odkazech.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se zabývá perorálními farmaceutickými přípravky cyklosporinu.

Dosavadní stav techniky

Navzdory úsilí zamezit odmítnutí implantátu při kontaktu donorové tkáně s hostitelskou, při většině transplantací, kdy je donorový orgán vnesen do těla hostitele, má imunosupresivní terapie kritickou roli při udržení životaschopnosti donorového orgánu v hostiteli. Při transplantacích bylo použito mnoho imunosupresivních činidel jako azathioprin, methotrexat, cyklofosamid, FK-506, rapamycin a kortikosteroidy. Látky nalézající stále významnější využití v imunosupresivní terapii díky preferenčnímu účinku na reakce zprostředkovávané T-buňkami jsou cyklosporiny.

Cyklosporiny patří do skupiny cyklických polypeptidů obsahujících jedenáct aminokyselin a jsou to metabolické produkty houby druhu *Tolypocladium Inflatum Gams*. Bylo pozorováno, že cyklosporiny reverzibilně inhibují imunokompetentní lymfocyty, zejména T-lymfocyty v G₀ nebo G₁ fázi buněčného cyklu. Rovněž bylo pozorováno, že cyklosporiny reversibilně inhibují produkci a uvolňování lymfokinů. Ačkoliv je známa řada cyklosporinů, nejrozšířenější využití má Cyklosporin A.

Bylo popsáno, že Cyklosporin A prodlužuje přetrvávání alogenních transplantátů kůže, srdce, ledvin, slinivky, kostní dřeně, tenkého střeva a plic. Při alogenních transplantacích Cyklosporin A potlačuje humorální imunitu a do značné míry buněčnou imunitní odpověď, jako je odmítnutí aloimplantátu, prodloužená hypersensitivita, experimentální alergická encefalomyelitida, Freundova adjuvantní artritida a onemocnění implantát vs. hostitel. Ač s Cyklosporinem A bylo dosaženo významných úspěchů, musí podávání léčiva po transplantaci pokračovat, neboť přínos cyklosporinové terapie je reverzibilní a při přerušení léčby dochází k odmítnutí implantátu.

Ač byly vyvinuty cyklosporinové přípravky pro perorální i intravenózní podávání, je perorální podávání výhodnější jak pro jednoduchost aplikace, tak pro lepší přijetí léčiva. Intravenózní aplikace cyklosporinu navíc může vést k anafylaktickým reakcím, vedlejšímu účinku, jaký v případě perorálního podávání nehrozí. V současné době jsou komerčně dostupné perorální cyklosporinové přípravky ve formě měkkých kapslí i jako roztoky a jsou prodávány pod obchodním názvem SANDIMMUNE a NEORALTM.

Při perorální terapii cyklosporinovými přípravky si musí být lékařský personál i výrobce vědomi mnoha problémů. Biologická dostupnost cyklosporinu v perorálních přípravcích je omezena, protože cyklosporin je nerozpustný ve vodě a ve vodném prostředí má sklon ke krystalizaci. Koncentrace cyklosporinu v perorálních přípravcích je omezena díky hydrofobnímu charakteru cyklosporinové molekuly. Dalším problémem je stabilita při adjustaci lékových forem a skladování perorálních přípravků. U měkkých želatinových kapslí cyklosporinových přípravků musí být prováděno vzduchotěsné balení, což je prostorově náročné i drahé. Při nízkých teplotách jsou cyklosporinové přípravky nestabilní, neboť dochází k vykryštalování cyklosporinu.

Proto je stále žádoucí připravit takové cyklosporinové přípravky, které by řešily alespoň některý, z výše uvedených problémů. Ideální perorální přípravek by měl poskytovat vysokou biologickou dostupnost

25.06.99

- 3 -

cyklosporinu, vysokou koncentraci cyklosporinu a měl by umožnit tvorbu kapalných lékových forem i tvrdých kapslí.

Relevantní literatura:

Physician's Desk Reference (1994), str. 2071-2074 popisuje perorální cyklosporinové přípravky prodávané v současné době pod obchodním názvem SANDIMMUNE.

Perorální cyklosporinové přípravky jsou rovněž uvedeny v souboru NEORAL, (1995)(Sandoz Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, New Jersey, 07936).

U.S. patenty zabývající se cyklosporiny a jejich deriváty jsou 4 220 641; 4 639 434; 4 289 851 a 4 384 996. U.S. 5 047 396 popisuje intravenózní preparát cyklosporinu. U.S. 4 388 307; 4 970 076 a 4 990 337 popisují perorální cyklosporinové přípravky.

Příprava perorálních tvrdých kapslí je popsána v U.S. 4 822 618; 4 576 284; 5 120 710 a 4 894 235.

Podstata vynálezu

Vynález poskytuje perorální farmaceutické přípravky cyklosporinu a způsoby jejich použití v imunosupresivní terapii. V předkládaných přípravcích je cyklosporin přítomen v perorálně přijatelném nosiči, který je tvořen nejméně jedním C₂₋₃ alkanolovým rozpouštědlem a nejméně jednou neiontovou povrchově aktivní látkou. Předkládané farmaceutické přípravky mohou dále obsahovat jedno nebo několik přídavných rozpouštědel, což jsou estery mastných kyselin a diolů, výhodně polyglykolů. Cyklosporinové přípravky lze připravit ve formě tvrdých kapslí. Přípravky jsou v podstatě bezvodé, což snižuje sklon cyklosporinu ke srážení a zvyšuje jeho biologickou dostupnost.

Stručný popis obrázků

Obr. 1 znázorňuje maximální koncentraci cyklosporinu (C_{max}) dosaženou u krys při podávání několika perorálních přípravků předkládaného vynálezu, C_{max} je relativní hodnota vztažená k C_{max} pro přípravek SANDIMMUNE ORAL (SO).

Obr. 2 ukazuje dobu, za kterou je dosaženo C_{max} (T_{max}) pro jednotlivé přípravky uvedené na obr. 1, T_{max} je relativní hodnota vztažená k T_{max} pro přípravek SANDIMMUNE ORAL (SO).

Obr. 3 ukazuje relativní plochy pod křivkou závislosti průběhu koncentrace na čase (AUC) pro jednotlivé přípravky uvedené na obr. 1, AUC je relativní hodnota vztažená k AUC pro přípravek SANDIMMUNE ORAL (SO).

Obr. 4 znázorňuje maximální koncentraci cyklosporinu (C_{max}) dosaženou u lidí při podávání několika perorálních přípravků předkládaného vynálezu, i C_{max} pro přípravek SANDIMMUNE ORAL (SO) v roztoku ("Sand").

Obr. 5 ukazuje dobu za kterou dojde k C_{max} (T_{max}) pro jednotlivé přípravky uvedené na obr. 4.

Obr. 6 ukazuje relativní plochy pod křivkou závislosti průběhu koncentrace na čase (AUC) pro jednotlivé přípravky uvedené na obr. 4.

Popis konkrétního provedení vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje perorální farmaceutické přípravky cyklosporinu se zlepšenou biologickou dostupností, které lze připravovat

ve formě kapslí, zvláště tvrdých kapslí. V předkládaném přípravku je cyklosporin přítomen v perorálně přijatelném nosiči, který je tvořen nejméně jedním C₂₋₃ alkanolovým rozpouštědlem a nejméně jednou neiontovou povrchově aktivní látkou. Předkládané farmaceutické přípravky mohou dále obsahovat jedno nebo několik přídavných rozpouštědel, což jsou estery mastných kyselin a diolů, výhodně jednoho nebo několika polyglykolů. Všechny složky předkládaného přípravku jsou farmaceuticky přijatelné. Vedle vysoké biologické dostupnosti zaručují různé šarže předkládaných přípravků reprodukovatelnou absorpci. Předkládané přípravky se používají při imunosupresivní terapii.

Existuje velké množství cyklosporinů s imunosupresivními účinky, které lze podávat v perorálních přípravcích. Jsou to cyklosporiny typů: Cyklosporin A, Cyklosporin B, Cyklosporin C, Cyklosporin D a Cyklosporin G, i jejich syntetická analoga. Viz Merck Index (1989) 2759. Předkládané perorální přípravky jsou zvláště výhodné pro dodávání Cyklosporinu A. Při podávání těchto přípravků je koncentrace Cyklosporinu v rozmezí 50 až 150 mg/ml, obvykle 100 až 150 mg/ml vzhledem k objemu složek nosiče přípravku.

Nosič přípravku zahrnuje složky: alkanolové rozpouštědlo tvořené až třemi různými C₂₋₃ alkanoly nesoucími 1 až 2 hydroxylové skupiny, tak, že na 1,5 atomu uhlíku nepřipadne více než 1 hydroxylová skupina. Vhodné alkanoly jsou ethanol a propylenglykol, výhodně ethanol. Celkové množství alkanolového rozpouštědla je nejméně 1 % obj., obvykle 3 % obj., maximálně 95 % obj., obvykle se pohybuje v rozmezí 5 až 75 % obj., častěji 5 až 60 % obj., ještě častěji 10 až 60 % obj. vzhledem k objemu přípravku. Pokud je alkanolovým rozpouštědlem ethanol, je obsažen v množství 5 až 25 % obj., obvykle 5 až 20 % obj. a ještě častěji 10 až 25 % obj. vzhledem k objemu přípravku. Pokud je alkanolovým rozpouštědlem propylenglykol, je obsažen v množství 5 až 90 % obj., obvykle 5 až 85 % obj. a ještě častěji 10 až 50 % obj. vzhledem k objemu přípravku.

Perorálně přijatelný nosič farmaceutického přípravku také obsahuje nejméně jednu neiontovou povrchově aktivní látku, častěji ne

více než dvě neiontové polyoxyalkylenové povrchově aktivní látky. Polyoxyalkylenové povrchově aktivní látky mají hydrofilně-lipofilní rovnováhu (HLB) v rozmezí 5 až 20, obvykle 8 až 16. Neiontové polyoxyalkylenové povrchově aktivní látky v předkládaném přípravku jsou výhodně polyoxyethylenové sloučeniny. Vhodné polyoxyethylenové sloučeniny jsou ethoxylované alkoholy, tj. polyoxyethylen alkoholy nebo mastné polyoxyethylen alkoholy, kde alkoholová část obvykle obsahuje 10 až 18, častěji 10 až 14 atomů uhlíku, dále etherové a esterové substituční deriváty těchto látek; a polyoxyethylenové deriváty parciálních esterů mastných kyselin, obvykle monoesterů a C₄₋₆ polyolů, obvykle C₆ polyolů, kde polyolem mohou být polyolové anhydridy, např. sorbitan. Část molekuly tvořená mastnou kyselinou obvykle obsahuje 10 až 18 atomů uhlíku. Počet ethylenoxidových skupin se pohybuje v rozmezí 2 až 30, obvykle 2 až 25. Výhodné povrchově aktivní látky jsou polyoxyethylen (4) lauryl ether (BRIJ 30) a polyoxyethylen (20) mono sorbitan mono oleát (TWEEN 80). Celkové množství neiontových povrchově aktivních látek v předkládaném přípravku je 5 až 80 % obj., obvykle 5 až 70 % obj., častěji 5 až 65 % obj., výhodně 5 až 60 % obj., výhodněji 20 až 75 % obj. a často 50 až 80 % obj. vzhledem k objemu přípravku. Je-li v přípravku obsažen TWEEN 80, tvoří obvykle 5 až 80 % obj., častěji 5 až 70 % obj., výhodně 5 až 60 % obj. a výhodněji 10 až 50 % obj. přípravku. Je-li v přípravku obsažen BRIJ 30, tvoří obvykle 10 až 45 % obj., častěji 15 až 40 % obj. přípravku.

Předkládané přípravky případně dále obsahují jedno nebo několik přídavných rozpouštědel, obvykle ne více než tři různá rozpouštědla, častěji ne více než dvě různá rozpouštědla. Vhodná přídavná rozpouštědla zahrnují estery mastných kyselin a dioly, přičemž přídavné rozpouštědlo zahrnuje 100 % esteru mastné kyseliny nebo 100 % diolu nebo jejich kombinaci. V přípravcích obsahujících pouze ester mastné kyseliny, nebo pouze diol, může jít o kombinaci různých esterů mastných kyselin, nebo o kombinaci různých diolů. Celkové množství přídavných rozpouštědel v přípravku se pohybuje v rozmezí 20 až 80 % obj., obvykle 25 až 75 % obj. Jsou-li přídavná rozpouštědla v přípravku obsažena, je obvykle poměr přípravných rozpouštědel k rozpouštědlům v rozmezí 1:1 až 15:1, častěji 1:1 až 13:1.

Estery mastných kyselin, které mohou sloužit jako přídavná rozpouštědla obsahují obvykle C₁₂₋₁₈ uhlíkový řetězec, častěji C₁₄₋₁₈, jsou to obvykle mono-estery mastných kyselin a nižších alkanolů. Vhodné estery mastných kyselin obvykle obsahují sudý počet uhlíků v řetězci, řetězec je nasycený nebo nenasycený, obvykle však nemá více než dvě nenasycené polohy. Mastné kyseliny jsou obvykle rostlinného nebo živočišného původu, např. kys. palmitová, stearová, palmitoleová, linoleová, linolenová apod., zvláště myristová a oleová. Alkoholová část esteru mastné kyseliny je obvykle tvořena nižším alkanolem C₂₋₄, obvykle C₂₋₃, rozvětveným nebo nerozvětveným. Vhodné mastné estery jsou isopropyl myristát a ethyl oleát. Je-li přítomen isopropyl myristát, je obsažen v množství 15 až 75 % obj., ethyl oleát je přítomen v množství 15 až 75 % obj. vzhledem k objemu přípravku. Objemový podíl esteru mastné kyseliny k povrchově aktivní látce v přípravku je v rozmezí 1:1 až 8:1, obvykle nepřesahuje 5:1. Ester mastné kyseliny je výhodně bezvodý.

Kromě přídavných esterů mastných kyselin předkládané přípravky dále případně obsahují dioly. Dioly jsou výhodně bezvodé. Dioly jako přídavná rozpouštědla jsou obvykle při fyziologických teplotách v kapalném skupenství, jsou to C₈₋₂₈ dioly, často C₁₆₋₂₀ dioly, dioly mohou být polyoxyalkylendioly obsahující C₂₋₃ alkylen, využití však mají i dioly obsahující podstatně více atomů uhlíku. Velikost molekul diolů vhodných jako přídavná rozpouštědla, se obvykle pohybuje v rozmezí 200 až 10 000 h.j., často 300 až 10 000 h.j., častěji 400 až 10 000 h.j., výhodně 800 až 10 000 h.j. Zvláště výhodné dioly jsou polyethylenglykoly, zvláště polyethylenglykol 200 (PEG₂₀₀), polyethylenglykol 300 (PEG₃₀₀), polyethylenglykol 400 (PEG₄₀₀), polyethylenglykol 600 (PEG₆₀₀), polyethylenglykol 1000 (PEG₁₀₀₀), polyethylenglykol 3400 (PEG₃₄₀₀), polyethylenglykol 8000 (PEG₈₀₀₀) a pod. Pokud jsou v přípravku přítomny, tvoří dioly 5 až 60 % hmotn./obj., častěji 5 až 55 % hmotn./obj. přípravku. Dioly, zvláště výšemolekulární polyethylenglykoly (např. polyethylenglykoly o molekulové hmotnosti 1000 a více) fungují jako absorbenty vody v přípravcích a tím podstatně snižují možnost vysrážení cyklosporinu z přípravku působenou volnými molekulami vody.

Přidavná rozpouštědla dále udělují přípravku vhodné fyzikální vlastnosti jako je viskozita, stabilita a pod. Přípravek dále případně obsahuje další činidla ovlivňující jeho fyzikální vlastnosti jako jsou zahušťovadla, suspenzní činidla, solidifikační činidla apod., tato činidla zahrnují látky jako akaciová pryskyřice, karboxymethylcelulóza, hydroxypropylcelulóza, lecithin, methylcelulóza, vysokomolekulární polyethylenglykoly (např. polyethylenglykoly o molekulové hmotnosti v rozmezí 1000 až 10 000 h.j., často 1000 až 8000 h.j., častěji 1000 až 6000 h.j.), povidon, alginát sodný, tragant a pod. Předkládané přípravky též obsahují minoritní složky poskytující různé funkce jako inhibitory enzymů, konzervační přísady, antioxidanty, antimikrobiální činidla, stabilizátory, aromatické přísady apod. Celkové množství zahušťovadel a dalších přísad obvykle nepřesahuje 55 % hmotn., často 45 % hmotn., častěji 25 % hmotn. přípravku. Přípravky dále obsahují různé excipienty, jako je v oblasti techniky běžné. Všechny přísady předkládaného přípravku jsou výhodně bezvodé.

V podstatě bezvodé přípravky jsou takové, obsahují-li méně než 1,0 % obj. vody, výhodněji méně než 0,1 % obj. vody.

Předkládané přípravky jsou stabilní v širokém rozmezí teplot, stabilitou přípravku je míněna jeho fyzická integrita, tj., že nedochází k vykrystalování cyklosporinové účinné složky z přípravku. Stabilní teplotní rozmezí zahrnuje nízké teploty při skladování, typicky 0 až 15 °C, častěji 2 až 8 °C.

Předkládané přípravky lze podávat v kapalné formě i v kapslích, např. tvrdých a měkkých kapslích. Způsoby příprav tvrdých kapslí obsahujících kapalný přípravek jsou známy v oblasti techniky, jsou uvedeny např. v U.S. 4 822 618 a 4 576 284, uvedeny v odkazech. Obecně tvrdé kapsle vhodné pro předkládané účely sestávají z dvou částí: pouzdra a čepičky. Pouzdro lze čepičkou těsně uzavřít a celek vytváří prostor o přesně definovaném objemu. Pouzdro i čepička se vyrábějí z hydrofilního polymeru, jako je škrob nebo želatina. Při přípravě tvrdých kapslí se kapalný přípravek vlije do pouzdra a kapsle se uzavře čepičkou. Uzavření musí být těsné, aby nedocházelo k úniku

přípravku z kapsle, viz E.P. 116 744, uvedeno v odkazech. Kapsle musí rovněž zůstat stabilní v kyselém prostředí žaludku a proto musí být potaženy střevním potahem, aby nedocházelo k jejich degradaci. Různé střevní potahy jsou v oblasti techniky známé, viz např. U.S. 5 206 219, uvedeno v odkazech.

Předkládané přípravky lze podávat pacientům spolu s dalšími imunosupresivními činidly, která lze podávat spolu s cyklosporinovými přípravky předkládaného vynálezu. Jsou to např. rapamycin, FK-506, mykofenolová kyselina, její analoga a deriváty, azathioprin, methotrexat, cyklofosfamid, kortikosteroidy a jiná imunosupresiva a jejich analoga.

Předkládané přípravky mají využití při imunosupresivní terapii. Imunosupresivní terapie je indikována při široké řadě chorob, jako jsou idiopatický nefrotický syndrom, insulín-dependentní diabetes typ I, Behcetův syndrom, aktivní Crohnova choroba, aplastická anémie, pokročilé kortikosteroid-dependentní astma, psoriáza, revmatoidní artritida a jiná onemocnění, kde imunitní systém může hrát patogenní úlohu. Velmi zajímavé je využití předkládaných přípravků při transplantacích, jak alogenních tak xenogenních orgánů, tkání nebo buněk, kde imunosuprese je žádoucí kvůli udržení životaschopnosti transplantovaného orgánu, tkáně a buněk po transplantaci, tj. imunosuprese preventivně zabrání odmítnutí implantátu, nebo onemocnění implantát vs. hostitel, např. po transplantaci kostní dřeně.

Při použití předkládaných přípravků pro imunosupresivní terapii je pacientovi perorálně dodáváno účinné množství cyklosporinu, tak aby bylo dosaženo požadované hladiny imunosuprese, podle konkrétního léčeného stavu. Při transplantacích je obvykle počáteční dávka cyklosporinu podávána před operací nebo po chirurgickém zákroku. Po transplantaci donorového orgánu hostiteli se cyklosporin podává pacientovi opakovaně, tj. chronicky, aby byla udržována imunosuprese. Počáteční dávka se podává 4 až 12 h před transplantací v množství 5 až 18 mg/kg tělesné hmotnosti, obvykle 5 až 15 mg/kg. Po operaci se podávají obvykle stejné denní dávky dále po dobu 1 až 3 týdnů, obvykle 1 až 2 týdny. Později se dávky sníží na 3 až 10 mg/kg denně, obvykle 3

až 6 mg/kg. Rychlost snižování dávek na udržovací hladinu je 3 až 8 % týdně, obvykle 5 % týdně. Dávkování se určuje podle krevní hladiny tak, aby se udržovala koncentrace 100 až 350 ng/ml, dle HPLC, RIA, ELISA nebo TDx testů. Předkládané přípravky lze podávat spolu s dalšími činidly, v případě že je taková společná léčba doporučena a v oblasti techniky známa. Například lze předkládané přípravky podávat spolu s adrenokortikosteroidy, azathioprinem a pod.

Výsledkem podávání předkládaných přípravků při transplantacích je prodloužená životaschopnost transplantovaného orgánu v příjemci, díky potlačení imunitní reakce hostitele na donorový orgán. "Prodloužením životaschopnosti" je míněno, že donorový orgán zůstává funkční v těle příjemce delší dobu, než by tomu bylo v případě bez aplikace imunosupresivní léčby. Prodloužením životaschopnosti se rozumí udržení životaschopnosti na neurčitou dobu. Donorový orgán lze považovat za životaschopný pokud zůstává v tělesném prostředí hostitele funkční.

Předkládané přípravky lze rovněž připravit jako vodné koloidní disperze cyklosporinových nanočástic, které si zachovávají dobrou biologickou dostupnost. V takovém případě jsou nanočástice v podstatě kulovité, cyklosporin je v nich obsažen v amorfnní formě a jejich průměrná velikost je obvykle menší než 1000 nm, větší než 50 nm, obvykle se pohybuje v rozmezí 200 až 800 nm, často 200 až 600 nm. Nejméně 50 % hmotn. částic musí být ve vymezeném velikostním rozmezí. Větší částice jsou přítomny jako agregáty nanočástic o průměrné velikosti průměru menší než 50 μ m, častěji menší než 25 μ m. Agregáty obvykle tvoří více než 40 % hmotn. z celkového množství cyklosporinu.

Přípravek musí obsahovat dostatečné množství amorfnních cyklosporinových částic pro požadovaný terapeutický účinek. Protože přípravek se vytváří teprve ve vodném prostředí před podáním, nebo přímo v trávicích šťávách, nemůže být koncentrace stanovena, protože není známo zředění v žaludku. Přípravky ředěné před perorálním podáváním obvykle obsahují 0,01 až 2,5 % hmotn. cyklosporinu, častěji

0,01 až 0,5 % hmotn. Teplota při míchání se pohybuje v rozmezí 10 až 50 °C, obvykle 20 až 40 °C. Míchání se obvykle provádí dostatečnou dobu nutnou ke vzniku roztoku.

Koloidní amorfni suspenze nanočástit je dostatečně stabilní, aby umožnila určitou prodlevu před vlastním podáním, běžně do 6 h, častěji 3 h.

Další podrobnosti týkající se přípravy a použití nanočásticových cyklosporinových přípravků lze nalézt v PCT/US97/04627.

Následující příklady slouží jen jako ilustrace a v žádném případě nejsou vymezením vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Bylo připraveno několik cyklosporinových přípravků předkládaného vynálezu. Biologická dostupnost cyklosporinu v těchto přípravcích byla sledována na krysách i lidech.

1. Perorální cyklosporinové přípravky

Byly připraveny následující přípravky Cyklosporinu A. Ve všech přípravách bylo do 1 l volumetrické nádoby dáno určené množství Cyklosporinu A, povrchově aktivní látka a ethanol nebo propylenglykol. Konečný objem byl do 1 l doplněn příslušným objemem esteru mastné kyseliny a/nebo diolu.

25.08.99

Přípravek	Složení		
19	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,1 ml	(10 %)
	Tween 80	300 mg	(0,278 ml)
	IM	do 1 ml	<(0,622 ml) (531 mg)
20	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,05 ml	(5 %)
	Brij 30	350 mg	(0,368 ml)
	IM	do 1 ml	<(0,582 ml) (496 mg)
21	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	PG	0,05 ml	(5 %)
	Brij 30	350 mg	(0,368 ml)
	IM	do 1 ml	<(0,582 ml) (496 mg)
22	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,1 ml	(10 %)
	Tween 80	300 mg	(0,278 ml)
	EO	do 1 ml	<(0,622 ml) (541 mg)
23	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,05 ml	(5 %)
	Brij 30	350 mg	(0,368 ml)
	EO	do 1 ml	<(0,582 ml) (506 mg)
24	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	PG	0,05 ml	(5 %)
	Brij 30	350 mg	(0,368 ml)
	EO	do 1 ml	<(0,582 ml) (506 mg)

25.08.99

- 13 -

Přípravek	Složení		
33	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,1 ml	(10 %)
	Brij 30	350 mg	(0,368 ml)
	IM	do 1 ml	<(0,742 ml) (633 mg)
34	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,1 ml	(10 %)
	Brij 30	150 mg	(0,158 ml)
	EO	do 1 ml	<(0,742 ml) (646 mg)
35	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,105 ml	(10,5 %)
	Tween 80	500 mg	(0,463 ml)
	PG	do 1 ml	<(0,437 ml) (453 mg)
36	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,1 ml	(10 %)
	Tween 80	300 mg	(0,278 ml)
	PG	100 mg	(0,097 ml)
	EO	do 1 ml	<(0,525 ml) (465 mg)
37	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,1 ml	(10 %)
	Tween 80	300 mg	(0,278 ml)
	PEG 400	100 mg	(0,088 ml)
	EO	do 1 ml	<(0,534 ml) (464 mg)

25.06.99

Přípravek	Složení		
38	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,1 ml	(10 %)
	Brij 30	300 mg	(0,316 ml)
	PG	100 mg	(0,097 ml)
	EO	do 1 ml	<(0,487 ml) (424 mg)
39	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,1 ml	(10 %)
	Brij 30	300 mg	(0,316 ml)
	PG	200 mg	(0,193 ml)
	EO	do 1 ml	<(0,391 ml) (340 mg)
40	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	PG	300 mg	(0,290 ml)
	Brij 30	300 mg	(0,316 ml)
	EO	do 1 ml	<(0,394 ml) (343 mg)
41	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,05 ml	(5 %)
	Brij 30	150 mg	(0,158 ml)
	Tween 80	100 mg	(0,093 ml)
	EO	do 1 ml	<(0,649 ml) (565 mg)
42	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	PG	0,05 ml	(5 % hmotn.)
	Brij 30	150 mg	(0,158 ml)
	Tween 80	100 mg	(0,093 ml)
	EO	do 1 ml	<(0,649 ml) (565 mg)

25.08.99

Přípravek	Složení		
44- tekutina	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,125 ml	(12,5 %)
	Tween 80	400 mg	(0,371 ml)
	PEG ₄₀₀	do 100 ml	<(0,529ml) (601 mg)
44-tvrdé kapsle	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,125 ml	(12,5 %)
	Tween 80	400 mg	(0,371 ml)
	PEG ₄₀₀	0,25 ml	
	PEG ₁₀₀₀	0,25 ml	
45	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,10 ml	(10 %)
	Tween 80	300 mg	(0,278 ml)
	PG	asi 250 mg	(0,243 ml)
	PEG ₄₀₀	asi 250 mg	(0,220 ml)
46	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,10 ml	(10 %)
	Tween 80	100 mg	(0,093 ml)
	PG	do 1,0 ml	(0,807 ml)
48	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,10 ml	(10 %)
	Tween 80	200 mg	(0,278 ml)
	PG	asi 250 mg	(0,243 ml)
	PEG ₄₀₀	asi 250 mg	(0,220 ml)

25.08.99

Přípravek	Složení		
49	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,10 ml	(10 %)
	Tween 80	600 mg	(0,558 ml)
	PG	do 1,0 ml	(0,342 ml)
50	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,10 ml	(10 %)
	Tween 80	300 mg	(0,278 ml)
	PG	do 1,0 ml	(0,622 ml)
51	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,10 ml	(10 %)
	Tween 80	200 mg	(0,186 ml)
	PG	do 1,0 ml	(0,714 ml)
52	CsA	100 mg	(10 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,05 ml	(5 %)
	Tween 80	400 mg	(0,371 ml)
	PG	do 1,0 ml	(0,579 ml)
100	CsA	125 mg	(12,5 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,125 ml	(12,5 %)
	Tween 80	200 mg	(0,186 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,44 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,11 mg	
101	CsA	125 mg	(12,5 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,125 ml	(12,5 %)
	Tween 80	100 mg	(0,093 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,52 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,13 mg	

25.08.99

- 17 -

Přípravek	Složení		
102	CsA	125 mg	(12,5 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,125 ml	(12,5 %)
	Tween 80	100 mg	(0,093 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,585 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,065 mg	
103	CsA	125 mg	(12,5 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,125 ml	(12,5 %)
	Tween 80	400 mg	(0,372 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,28 mg	
	PEG ₃₄₀₀	asi 0,07 mg	
104	CsA	125 mg	(12,5 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,15 ml	(15 %)
	Tween 80	100 mg	(0,093 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,496 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,124 mg	
105	CsA	125 mg	(12,5 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,15 ml	(15 %)
	Tween 80	400 mg	(0,372 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,256 mg	
	PEG ₃₄₀₀	asi 0,064 mg	
106	CsA	125 mg	(12,5 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,125 ml	(12,5 %)
	Tween 80	400 mg	(0,372 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,329 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,021 mg	

Přípravek	Složení		
107	CsA	112 mg	(11,2 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,158 ml	(15,8 %)
	Tween 80	800 mg	(0,744 ml)
108	CsA	112 mg	(11,2 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,158 ml	(15,8 %)
	Tween 80	700 mg	(0,651 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,105 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,045 mg	
109	CsA	112 mg	(11,2 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,158 ml	(15,8 %)
	Tween 80	700 mg	(0,651 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,075 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,075 mg	
110	CsA	112 mg	(11,2 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,158 ml	(15,8 %)
	Tween 80	600 mg	(0,558 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,20 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,05 mg	
111	CsA	112 mg	(11,2 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,158 ml	(15,8 %)
	Tween 80	600 mg	(0,558 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,15 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,10 mg	

Přípravek	Složení		
112	CsA	112 mg	(11,2 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,158 ml	(15,8 %)
	Tween 80	500 mg	(0,465 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,315 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,035 mg	
113	CsA	112 mg	(11,2 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,158 ml	(15,8 %)
	Tween 80	500 mg	(0,465 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,245 mg	
	PEG ₃₄₀₀	asi 0,105 mg	
114	CsA	125 mg	(12,5 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,158 ml	(15,8 %)
	Tween 80	300 mg	(0,279 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,385 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,165 mg	
115	CsA	125 mg	(12,5 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,158 ml	(15,8 %)
	Tween 80	300 mg	(0,279 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,33 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,22 mg	
116	CsA	125 mg	(12,5 % hmotn./obj.)
	EtOH	0,158 ml	(15,8 %)
	Tween 80	400 mg	(0,372 ml)
	PEG ₃₀₀	asi 0,225 mg	
	PEG ₈₀₀₀	asi 0,225 mg	

PG = propylenglykol; EtOH = ethanol; Brij 30 = polyoxyethylen (4) laurylether; Tween 80 = polyoxyethylen (20) monosorbitan mono-oleát; IM = isopropyl myristát; EO = ethyl oleát

2. Studie biologické dostupnosti u přípravků 19-24 a 33-42

Byla studována biologická dostupnost cyklosporinu v přípravcích 19-24 a 33-42. Jako míra biologické dostupnosti byly stanoveny následující farmakokinetické parametry: (a) maximální koncentrace cyklosporinu v krvi (C_{max}); (b) doba nutná pro dosažení C_{max} (T_{max}); (c) relativní plochy pod křivkou závislosti průběhu koncentrace na čase (AUC). Kromě přípravků 19-24 a 33-42 byla stejná stanovení provedena pro cyklosporin v přípravku SANDIMMUNE Oral Solution (SO) pro srovnávací účely. Pro testování výše uvedených přípravků byla připravena pokusná zvířata. Krysy Sprague Dewley, které dosud nepřišly do styku s CsA, o hmotnosti 250-350 g byly krmeny peletizovanou standardní stravou (Agway 3000, Granville Mill, Greensboro, NC) a vodou *ad libitum*. Jeden den před experimentem byla do pravé jugulární a pravé femorální žíly pod lehkou anestézií etherem zavedena gumová kanyla. Po nočním přerušení dodávky potravy byl dávkovacím zařízením podán CsA.

Po podání byly odebírány 200 μ l krevní vzorky z jugulární žíly do 0,5 ml polypropylenových mikrocentrifugačních zkumavek obsahujících 0,3 mg lyofilizované EDTA/Na a zahřívány 10 s. Krevní vzorky od zvířat léčených předkládanými přípravky byly odebírány 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 a 72 hodin po podání.

CsA včetně některých metabolitů byl stanovován v krvi fluorescentním polarizačním imunotestem (FPI)(TDx, Abbot Lab). Stručně, 150 μ l krevního vzorku bylo kvantitativně přeneseno do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek. Buňky byly lyzovány a rozpuštěny s 50 μ l solubilizačního činidla obsahujícího povrchově aktivní látku. Proteiny byly pak vysráženy 300 μ l acetonitrilu. Po centrifugaci byl na supernatantu proveden test FPI na Autoanalyzátoru TDx, postupem dle

doporučení Abbott Diagnostics. Protože byl test TDx původně vyvinut pro lidskou krev, byly některé postupy pozměněny. Byla připravena řada standardních roztoků o známé koncentraci CsA, přidáním známého množství CsA do krysí krve zreagované s EDTA. Kde se dalo předpokládat, že koncentrace CsA přesáhne $1,0 \mu\text{g/ml}$, byly vzorky 10x zředěny $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátovým pufrům o pH 7,0. Pro zředěné vzorky, tj. 10 % obj. krysí krve a 90 % obj. fosfátového pufru, byla vynesena jiná kalibrační křivka s využitím řady standardních roztoků obsahujících známé množství CsA.

Farmakokinetické parametry byly získány z non-kompartmentních analýz. Maximální koncentrace (C_{max}) a doba nutná k jejímu dosažení (T_{max}) byly stanoveny posouzením profilu časové závislosti koncentrace pro každou krysou. Plocha pod křivkou závislosti koncentrace na čase (AUC) od času 0 do konce měření (AUC_{0-t}) byla vypočtena metodou lineární lichoběžníkové projekce. Zbytková plocha pod koncem křivky ($\text{AUC}_{0-\infty}$) byla stanovena jako poměr poslední pozorované koncentrace (C^*) k rychlostní konstantě prvního řádu popisující terminální eliminační fázi koncentračního profilu (λ_z). Rychlostní konstanta λ_z byla stanovena z log-lineární regrese dat časového průběhu koncentrace (tj. poslední 3 až 5 údajů podle analyzovaného profilu). Celková plocha ($\text{AUC}_{t-\infty}$) byla vypočtena jako součet AUC_{0-t} a $\text{AUC}_{t-\infty}$.

Výsledky pro každý přípravek byly porovnány s výsledky získanými pro SO a jsou znázorněny na obr. 1-3. Výsledky ukazují, že většina přípravků vede k vyšší biologické dostupnosti cyklosporinu proti srovnávacímu SANDIMMUNE Oral Solution (SO), jak naznačují vyšší hodnoty AUC u předkládaných přípravků.

3. Studie biologické dostupnosti u přípravků 35, 43-46 a 48-52 u lidí

Testování bylo provedeno na skupině 48 zdravých mužů o stáří 19 až 55 let s hmotností lišící se maximálně o 20 % od ideální váhy. Byly provedeny studie s jednou dávkou, bez příjmu potravy, náhodné, dvojité

slepé a trojitě zkřížené. 48 mužů bylo náhodně rozděleno do 6 skupin po 8. Každá skupina dostala jednu 300 mg dávku cyklosporinu z výše uvedených přípravků, nebo SANDIMMUNE Oral Solution (SO), při třech různých příležitostech, vždy po sedmidenní přestávce.

Testovaní jedinci byly požádáni, aby 10 h před a 4 h po podání preparátu nejedli. Pít vodu mohli dle chuti, vyjma 1 h před a 2 h po podání. Před podáním byly odebrány 15 ml krevní vzorky. Pro podání byly připraveny následující dávky: 3 ml alikvotu přípravku (300 mg) bylo smícháno s 200 ml ředidla a podáno perorálně. Byly odebírány 10 ml vzorky krve v čase $t = 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20$ a 24 h. Po skončení pokusu byl též odebrán 15 ml krevní vzorek.

Koncentrace cyklosporinu A v celkové krvi byla stanovena TDx (Abbott Diagnostics, N. Chicago, IL) dle pokynů výrobce.

Non-kompartmentní farmakokinetická analýza byla provedena standardním postupem. Z dat časového průběhu koncentrace byla stanovena maximální koncentrace (C_{max}) a doba jejího dosažení (T_{max}). Plocha pod křivkou závislosti koncentrace na čase (AUC) byla vypočtena metodou lineární lichoběžníkové projekce k poslednímu bodu koncentrace na hranici citlivosti (25 ng/ml) a extrapolována k nekonečnu. Pozorované hodnoty C_{max} , T_{max} a AUC byly zprůměrovány. Průměrné hodnoty pro každý přípravek jsou uvedeny v obr. 4-6. Výsledky ukazují, že pro každý testovaný přípravek bylo dosaženo C_{max} dvakrát rychleji, než pro srovnávací SANDIMMUNE (SO). Pozorovaná AUC u testovaných přípravků minimálně o 2000 ng h/ml vyšší než u SANDIMMUNE (SO) za stejných podmínek. Z uvedeného vyplývá, že přípravky 35, 43-46 a 48-52 poskytují lepší biologickou dostupnost než SANDIMMUNE Oral Solution (SO).

4. Fyzikální charakteristiky kapalných přípravků 35 a 44 v nízkých teplotách.

Kapalné přípravky cyklosporinu 35 a 44 a srovnávací NEORAL Oral Solution byly skladovány v různých teplotách a stanoveny jejich fyzikální vlastnosti. Konkrétně kapalně přípravky Cyklosporinu A 35 a 44 a NEORAL Oral Solution byly skladovány přes noc při teplotách -10 °C a při 2 až 8 °C. přípravek 44 a NEORAL ztuhly, přípravek 35 nikoliv, pouze došlo ke zvýšení viskozity. Vychlazený přípravek 35 nejevil žádné známky precipitace cyklosporinu. Po vyjmutí přípravků do prostředí o laboratorní teplotě roztál přípravek 44 dříve než srovnávací NEORAL Oral Solution.

Při skladování při teplotě 2 až 8 °C NEORAL Oral Solution ztuhl do pasty, přípravky 35 a 44 zůstaly ve formě viskózních kapalných přípravků a nevykazovaly žádné známky precipitace cyklosporinu A.

Z těchto výsledků a úvah je zřejmé, že nové cyklosporinové přípravky poskytují vysokou biologickou dostupnost. Přes vysokou koncentraci cyklosporinu jsou stabilní při skladování za nízkých teplot v mrazničkách. Předkládané přípravky lze podávat ve formě kapslí, včetně tvrdých kapslí, poskytujících jednoduché skladování a používání.

Všechny publikace a patentové přihlášky citované v tomto popise jsou uvedeny v odkazech.

Ačkoliv byl kvůli jasnosti a pochopení předkládaný vynález podrobněji ilustrován na příkladech, je odborníkovi v oboru zřejmé, že v rámci uvedených poznatků lze provádět určité změny či modifikace, aniž by výsledek přesáhl ideu nebo rozsah patentových nároků.

Průmyslová využitelnost

Vynález přináší farmaceuticky využitelné perorální přípravky cyklosporinu a způsoby jejich použití v imunosupresivní terapii. Díky vhodným složkám se předkládané přípravky vyznačují vysokou stabilitou a biologickou dostupností cyklosporinu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Perorální cyklosporinový přípravek, vyznačující se tím, že obsahuje:

cyklosporin;

nejméně jedno C₂₋₃ alkanolové rozpouštědlo

nejméně jednu neiontovou povrchově aktivní látku volenou ze skupiny zahrnující polyoxyethylenové alkoholy a monoestery mastných kyselin s ethoxylovanými C₄₋₆ polyoly; a

nejméně jeden polyglykol o molekulové hmotnosti v rozmezí 800 až 10 000 h.j.

2. Přípravek podle nároku 1, vyznačující se tím, že polyglykol zahrnuje polyethylenglykol.

3. Přípravek podle nároku 2, vyznačující se tím, že alkanolové rozpouštědlo tvoří 5 až 75 % obj./obj. přípravku.

4. Přípravek podle nároku 2, vyznačující se tím, že alkanolové rozpouštědlo tvoří 10 až 25 % obj./obj. přípravku.

5. Přípravek podle nároku 4, vyznačující se tím, že alkanolové rozpouštědlo je absolutní ethanol.

6. Přípravek podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedená nejméně jedna neiontová polyoxyalkylenová povrchově aktivní látka tvoří 5 až 80 % hmotn./obj. přípravku.
7. Přípravek podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedená nejméně jedna neiontová polyoxyalkylenová povrchově aktivní látka tvoří 10 až 50 % hmotn./obj. přípravku.
8. Přípravek podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedená nejméně jedna neiontová polyoxyalkylenová povrchově aktivní látka tvoří 20 až 75 % obj./obj. přípravku.
9. Přípravek podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedená nejméně jedna neiontová polyoxyalkylenová povrchově aktivní látka je volená ze skupiny zahrnující polyoxyethylen (20) mono sorbitan mono oleát a polyoxyethylen (4) lauryl ether.
10. Přípravek podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedený nejméně jeden polyethylenglykol je tvořen polyethylenglykolem o molekulové hmotnosti v rozmezí 1000 až 8000 h.j..
11. Přípravek podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedený nejméně jeden polyethylenglykol je tvořen směsí dvou různých polyethylenglykolů o různých molekulových hmotnostech.
12. Přípravek podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedený nejméně jeden polyethylenglykol tvoří 20 až 80 % hmotn./obj. přípravku.
13. Přípravek podle nároku 1, vyznačující se tím, že koncentrace cyklosporinu je 100 mg/ml, absolutního ethanolu 12,5 % obj. a polyoxyethylen (20) mono sorbitan mono-oleátu 400 mg/ml.

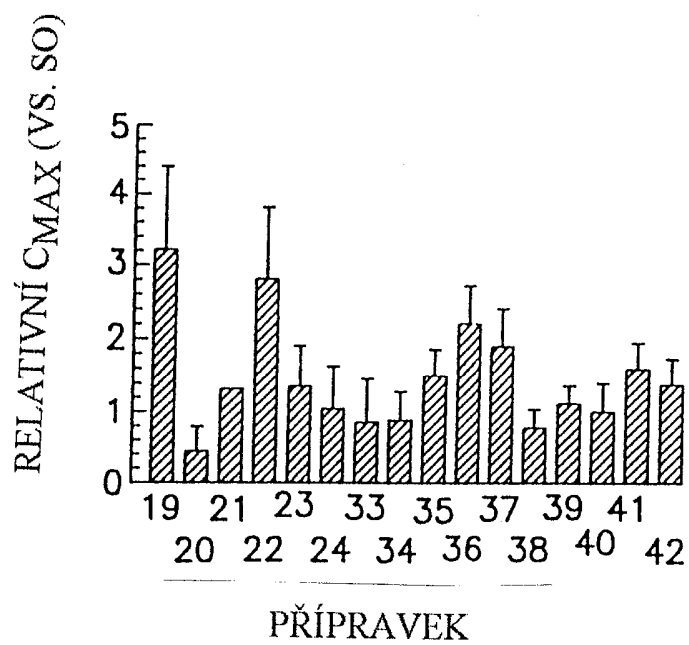
25.08.99

- 27 -

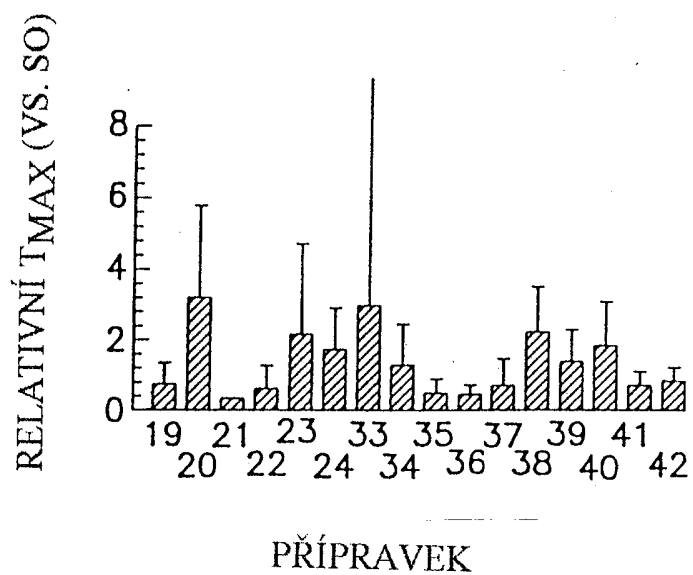
14. Přípravek podle nároku 1, vyznačující se tím, že je adjustován ve tvrdých kapslích.

15. Perorální cyklosporinový přípravek obsahující cyklosporin a farmaceuticky přijatelný nosič, vyznačující se tím, že je v podstatě bezvodý.

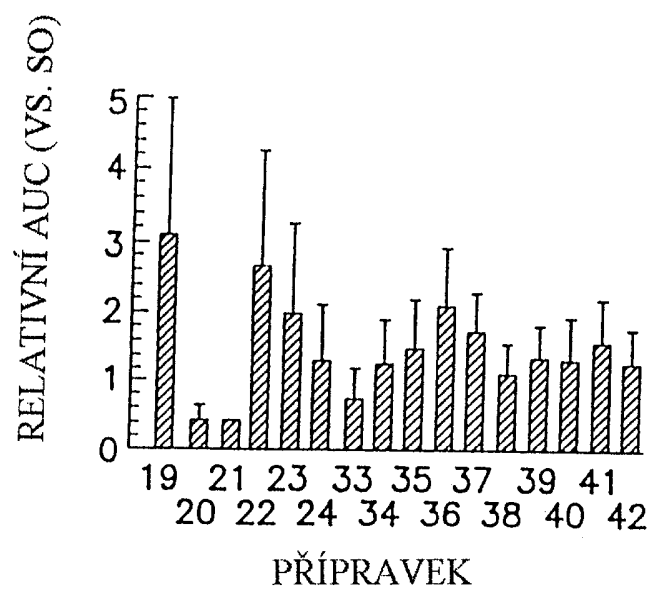
16. Použití perorálního cyklosporinového přípravku podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15.



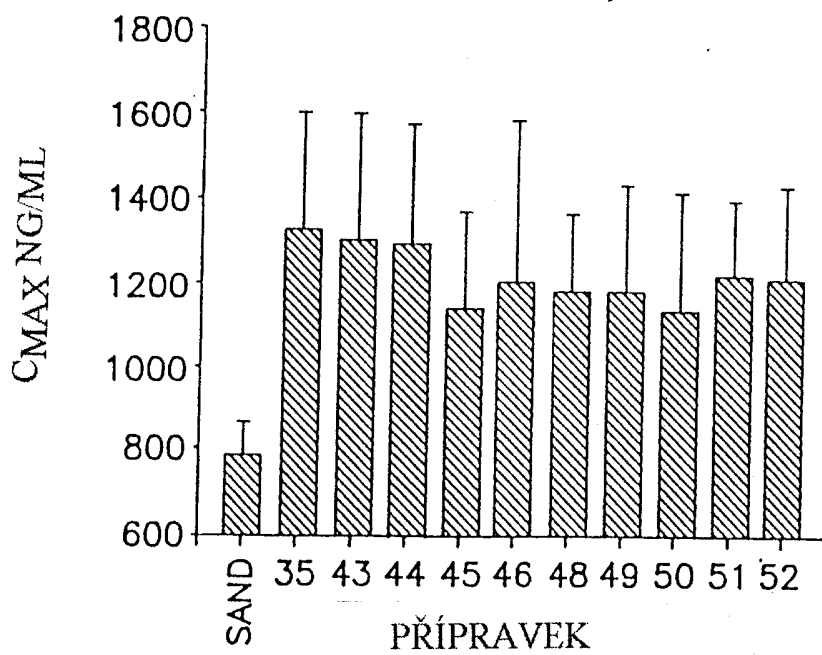
OBR. 1



OBR. 2



OBR. 3



OBR. 4

