(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 933040 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 933040

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 9/14

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **01.07.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **01.07.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **02.01.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

01.07.1992 US 908125

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **NanoSystems L.L.C.,** 1250 South College Road, Collegeville, PA 19426, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Liversidge, Gary G.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Liversidge, Elaine,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Sarpotdar, Pramod P.,** Malvern, PA 19355, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Pinnasta modifioituja syöpälääkenanopartikkeleita
Ytmodifierade cancermedicinnanopartiklar

Pinnasta modifioituja syöpälääkenanopartikkeleita

Tämä keksintö liittyy partikkelien muodossa oleviin syöpälääkkeisiin, näitä partikkeleita sisältäviin syöpälääkekoostumuksiin ja menetelmiin, joissa näitä partikkeleita käytetään.

Terapeuttinen kerroin on suure, joka ilmaisee kuinka selektiivinen lääkeaine on saamaan aikaan ne vaikutukset, joita sen halutaan tekevän, ja tämä voidaan määritellä tappavan annoksen mediaanin suhteeksi tehokkaan annoksen mediaaniin, toisin sanoen suhteeksi (LD_{50}/ED_{50}) (tätä asiaa on käsitelty julkaisussa Goodman ja Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8. painos, s. 68 - 69). Käytännöllisesti katsoen kaikkien syöpälääkkeiden terapeuttinen kerroin on pieni, esimerkiksi alle noin 1,0. Terapeuttisen kertoimen kohottaminen esimerkiksi toksisuutta vähentämällä tai tehokkuutta parantamalla antaisi lääkäreille enemmän toimintavapautta heidän joutuessaan määräämään syöpälääkkeitä niitä tarvitseville potilaille. Tämän johdosta menetelmät, joilla tähdätään syöpälääkkeiden toksisuuden vähentämiseen ja/tai näiden tehokkuuden parantamiseen näiden lääkkeiden terapeuttisten kerrointen kohottamiseksi, olisivat arvokkaita syöpätautien hoidossa.

Lisäksi veteen niukkaliukoiset lääkeaineet, kuten veteen niukkaliukoiset syöpälääkkeet, eivät ole helposti injektoitavissa suonensisäisesti (IV) suurena kerta-annoksena. Niukkaliukoisten lääkeaineiden injektoitavien muotojen luominen on tavattoman suuri ongelma. Olisi erittäin haluttua kyetä saamaan käyttöön niukkaliukoisia lääkeaineita, kuten niukkaliukoisia syöpälääkkeitä, sellaisessa muodossa, jossa niitä voidaan antaa suurena IV-muodossa injektoitavana kerta-annoksena.

On tehty se löytö, että pinnasta modifioitujen nanopartikkelien muodossa olevia syöpälääkkeitä käsittävät syöpälääkekoostumukset ovat aikaisempiin koostumuksiin

verrattuna toksisuudeltaan pienempiä ja tehokkuudeltaan parempia.

Tarkemmin sanottuna tämän keksinnön mukaisesti saadaan käyttöön partikkeleita, jotka koostuvat olennaisesti kidemuodossa olevasta syöpälääkkeestä, jonka pintaan on adsorboitu sellainen määrä tämän pintaa modifioivaa ainetta, että sitä on riittävästi pitämään tehollisen keskimääräisen partikkelikoon alle noin 1 000 nm:n suuruisena.

Tästä keksinnöstä saadaan lisäksi käyttöön syöpälääkekoostumus, joka käsittää edellä kuvattuja partikkeleita.

Toisessa tämän keksinnön sovellutusmuodossa saadaan käyttöön edellä kuvattujen partikkelien tai näiden koostumuksen käyttömuoto syövän hoitoon tarkoitetun lääkkeen valmistamiseksi.

Tämän keksinnön erityisen edullinen piirre on se, että siitä saadaan käyttöön syöpälääkekoostumuksia, jotka ovat aikaisempiin koostumuksiin verrattuna toksisuudeltaan pienempiä ja tehokkuudeltaan parempia.

Vielä yksi tämän keksinnön edullinen piirre on se, että siitä saadaan käyttöön koostumuksia, jotka sisältävät niukkaliukoisia syöpälääkkeitä, joita voidaan annostella yhtenä suurena IV-injektioina ja jotka voivat viipyä pitkään kiertävässä veressä tällaisen injektoin jälkeen.

Tämä keksintö perustuu osaksi siihen löytöön, että pinnasta modifioidut syöpälääkenanopartikkelit ovat toksisuudeltaan pienempiä ja/tai tehokkuudeltaan parempia kuin aikaisemmat lääkemuodot. Vaikkakin tätä keksintöä on kuvattu käyttäen pääasiassa sen edullista lääkeaineryhmää, toisin sanoen syöpälääkkeitä, johon on katsottava kuuluvaksi myös immunosuppressiiviset aineet, se on myös käyttökelpoinen muista lääkeaineryhmistä peräisin olevien veteen niukkaliukoisten lääkeaineiden yhteydessä, mikä koskee erityisesti niitä aineita, joiden terapeuttiset kertoimet ovat pieniä.

Tämän keksinnön mukaiset partikkelit käsittävät syöpälääkkeen. Syöpälääke esiintyy yhdessä tai useammassa erillisessä kidefaasissa. Kidefaasi eroaa amorfisesta, toisin sanoen kidemuotoista ainetta sisältämättömästä faasista, joka on tuloksena tavanomaisista liuottimesta tehtävään saostukseen perustuvista menetelmistä, jotka on tarkoitettu mikrometriä pienemmässä kokoluokassa olevien partikkelien valmistamiseksi ja joita on kuvattu US-patenttijulkaisussa nro 4 826 689.

Tätä keksintöä voidaan soveltaa käyttäen laajaa valikoimaa erilaisia syöpälääkkeitä. Syöpälääkkeen on kuitenkin oltava niukkaliukoinen ja dispergoitavissa ainakin yhteen nestemäiseen väliaineeseen. Termi "niukkaliukoinen" tarkoittaa sitä, että lääkeaineen liukoisuus nestemäiseen dispergointimediumiin, esimerkiksi veteen, on käsittelylämpötilassa, esimerkiksi huoneenlämmössä, alle noin 10 mg/ml ja edullisesti alle 1 mg/ml. Edullinen nestemäinen dispergointimedium on vesi. Tätä keksintöä voidaan kuitenkin käyttää muidenkin nestemäisten väliaineiden yhteydessä, joihin syöpälääke on dispergoitavissa, ja joihin kuuluvat vesipitoiset suolaliuokset, safloriöljy, ja liuottimet, kuten etanoli, t-butanoli, heksaani ja glykoli. Vesipitoisten dispergointiväliaineiden pH voidaan säätää tällä alalla tunnetuilla menetelmillä.

Syöpälääke on edullisesti jokin alkyloiva aine, jokin antimetaboliitti, jokin luonnontuote, jokin hormoni tai jokin antagonisti tai jokin erityyppisistä aineista, kuten esimerkiksi jokin säteilylle herkistävistä aineista.

Esimerkkeihin alkyloivista aineista kuuluvat alkyloivat aineet, joissa on bis(2-kloorietyyli)amiiniryhmä, kuten esimerkiksi kloorimetiini, klorambusiili, melfalaani, uramustiini, mannomustiini, mekloretaminoksidi, syklofosfamidi, ifosfamidi ja trifosfamidi;

alkyloivat aineet, joissa on susbstituoitu atsiridiiniryhmä, kuten tretamiini, tiotepa, triatsikvoni ja mitomysiini;

alkyylisulfonaattityyppiset alkyloivat aineet, kuten busulfaani, piposulfaani ja piposulfaami;

alkyloivat N-alkyyli-N-nitrosoureajohdokset, kuten esimerkiksi karmustiini, lomustiini, semustiini tai streptotsotosiini; ja mitobronitoli-, dakarbatsiini- ja prokarbatsiinityyppiset alkyloivat aineet.

Esimerkkeihin antimetaboliiteista kuuluvat foolihappoanalogit, kuten esimerkiksi metotreksaatti;

pyrimidiinianalogit, kuten esimerkiksi fluoriurasiili, floksuridiini, tegafur, sytarabiini, idoksuridiini ja flusytosiini; ja

puriinijohdannaiset, kuten esimerkiksi merkaptopuriini, tioguaniini, atsatiopriini, tiamipriini, vidarabiini pentostatiini ja puromysiini.

Esimerkkeihin luonnontuotteista kuuluvat Vinca-alkaloidit, kuten esimerkiksi vinblastiini ja vinkristiini;

epipodofyllotoksiinit, kuten etoposidi ja teniposidi;

antibiootit, kuten esimerkiksi adriamysiini, daunomysiini, doktinomysiini, daunorubisiini, doksorubisiini, mitramysiini, bleomysiini ja mitomysiini;

entsyymit, kuten esimerkiksi L-asparaginaasi;

biologiset vastetta muuntavat aineet, kuten esimerkiksi α-interferoni;

kamptotesiini;

taksoli;

retinoidit, kuten retiinihappo.

Esimerkkeihin hormoneista ja antagonisteista kuuluvat adrenokortikosteroidit, kuten esimerkiksi prednisoni;

progestiinit, kuten esimerkiksi hydroksiprogesteronikaproaatti, medroksiprogesteroniasetaatti ja megestroliasetaatti;

estrogeenit, kuten esimerkiksi dietyylistilbestroli ja etinyyliestradioli;

antiestrogeenit, kuten esimerkiksi tamoksifeeni;

androgeenit, kuten esimerkiksi testosteronipropionaatti ja fluoksimesteroni;

antiandrogeenit, kuten esimerkiksi flutamidi;

ja gonadotropiinia vapauttavan hormonin analogit, kuten esimerkiksi leuprolidi.

Esimerkkeihin erityyppisistä aineista kuuluvat säteilylle herkistävät aineet, kuten esimerkiksi 1,2,4-bentsotriatsiini-3-amiini-1,4-dioksidi ja 1,2,4-bentsotriatsiini-7-amiini-1,4-dioksidi;

platinakoordinaatioyhdisteet, kuten esimerkiksi sisplatiini ja karboplatiini;

antraseenidionit, kuten esimerkiksi mitoksantroni;

substituoidut ureat, kuten esimerkiksi hydroksiurea;

lisämunuaisten toimintaa hillitsevät aineet, kuten esimerkiksi mitotaani ja aminoglutetimidi.

Syöpälääke voi lisäksi olla immunosuppressiivinen lääkeaine, kuten esimerkiksi syklosporiini, atsatiopriini, sulfasalatsiini, metoksaleeni ja talidomidi.

Tätä keksintöä käytettäessä käyttökelpoiset syöpälääkkeet ovat tunnettuja yhdisteitä ja/tai ne voidaan valmistaa tällä alalla tunnetuilla menetelmillä.

Syöpälääkettä voidaan käyttää yksinään tai yhdessä yhden tai useamman muun syöpälääkkeen kanssa.

Tämän keksinnön mukaiset partikkelit sisältävät edellä esitetyn kuvauksen mukaisen syöpälääkkeen, jonka pintaan on adsorboitu pintaa modifioiva aine. Käyttökelpoisiin pintaa modifioiviin aineisiin arvellaan kuuluvan aineita, jotka adhesoituvat fysikaalisesti syöpälääkkeen pintaan mutta jotka eivät sitoudu kemiallisesti syöpälääkkeeseen.

Sopivat pintaa modifioivat aineet voivat olla orgaanisia ja epäorgaanisia farmaseuttisia lisäaineita. Näihin lisäaineisiin kuuluvat useat erilaiset polymeerit, pienimoolimassaiset oligomeerit, luonnontuotteet ja pinta-

aktiiviset aineet. Edullisiin pintaa modifioiviin aineisiin kuuluvat ionittumattomat ja anioniset pinta-aktiiviset aineet. Edustaviin esimerkkeihin lisäaineista kuuluvat gelatiini, kaseiini, lesitiini (fosfatidit), arabikumi, kolesteroli, tragantti, steariinihappo, bentsalkoniumkloridi, kalsiumstearaatti, glyseryylimonostearaatti, setostearyylialkoholi, setomakrogoliemulgointivaha, sorbitaaniesterit, polyoksieteenialkyylieetterit, esimerkiksi makrogolieetterit, kuten setomakrogol 1 000, polyoksieteenin risiiniöljyjohdokset, polyeteenisorbitaanirasvahappoesterit, esimerkiksi kaupallisesti saatavilla olevat Tween™-tuotesarjan yhdisteet, polyeteeniglykolit, polyoksieteenistearaatit, kolloidinen piidioksidi, fosfaatit, natriumdodekyylisulfaatti, karboksimetyyliselluloosakalsium, karboksimetyyliselluloosanatrium, metyyliselluloosa, hydroksietyyliselluloosa, hydroksipropyyliselluloosa, hydroksipropyylimetyyliselluloosaftalaatti, ei-kiteinen selluloosa, magnesiumalumiinisilikaatti, trietanoliamiini, polyvinyylialkoholi (PVA) ja polyvinyylipyrrolidoni (PVP). Useimmat näistä lisäaineista on kuvattu yksityiskohtaisesti teoksessa Handbook of Pharmaceutical Excipients, jonka ovat julkaisseet yhdessä American Pharmaceutical Association ja The Pharmaceutical Society of Great Britain, Pharmaceutical Press, 1986. Pintaa modifioivia aineita on saatavilla kaupallisesti ja/tai niitä voidaan valmistaa tällä alalla tunnetuilla menetelmillä. Kahta tai useampaa pintaa modifioivaa ainetta voidaan käyttää yhdessä.

Erityisen edullisia pintaa modifioivia aineita ovat PVP, tyloksapoli, polaksomeerit, kuten Pluronic™ F68, F108, ja F127, jotka ovat eteenioksidin ja propeenioksidin lohkosekapolymeerejä ja joita on saatavilla BASF-yhtiöstä, ja poloksamiinit, kuten Tetronic™ 908 (T908), joka on tetrafunktionaalinen lohkosekapolymeeri, joka on peräisin eteenioksidin ja propeenioksidin vaiheittaisesta liittämisestä eteenidiamiiniin ja jota on saatavilla BASF-yhtiös-

tä, dekstraani, lesitiini, Aerosol OT™ (AOT), joka on natriumsulfosukkinaatin dioktyyliesteri ja joka on saatavilla American Cyanamid -yhtiöstä, Duponol™P, joka on natriumlauryylisulfaatti ja joka on saatavilla DuPont-yhtiöstä, Triton™ X-200, joka on alkyyliaryylipolyeetterisulfonaatti ja joka on saatavilla Rohm and Haas -yhtiöstä, Tween 20, 40, 60 ja 80, jotka ovat polyoksieteenisorbitaanirasvahappoestereitä ja jotka ovat saatavilla yhtiöstä ICI Speciality Chemicals, Span 20, 40, 60 ja 80, jotka ovat rasvahappojen sorbitaaniestereitä sekä Arlacel 20, 40, 60 ja 80, jotka ovat rasvahappojen sorbitaaniestereitä ja jotka ovat saatavilla Hercules Inc. -yhtiöstä, Carbowax™ 3550 ja 934, jotka ovat polyeteeniglykoleja, jotka ovat saatavilla Union Carbide -yhtiöstä. Crodesta™ F-110, joka on sakkaroosistearaatin ja sakkaroosidistearaatin seos ja saatavilla Croda Inc. -yhtiöstä, Crodesta SL-40, joka on saatavilla Croda Inc. -yhtiöstä, heksyylidekyylitrimetyyliammoniumkloridi (CTAC), naudan seerumin albumiini ja SA90HCO, joka on $C_{18}H_{37}CH_2(CON(CH_3)CH_2(CHOH)_4CH_2OH)_2$. Pintaa modifioiviin aineisiin, joiden on havaittu olevan erityisen käyttökelpoisia, kuuluvat PVP, Pluronic F-108, PVA ja arabikumi.

Pintaa modifioivan aineen annetaan adsorboitua syöpälääkkeen pintaan sellainen määrä, että tämä on riittävä pitämään tehollisen keskimääräisen partikkelikoon alle noin 1 000 nm:n suuruisena. Pintaa modifioiva aine ei reagoi kemiallisesti itse syöpälääkkeen kanssa. Pintaa modifioivan aineen yksittäisillä adsorboituneilla molekyyleillä ei ole olennaisesti lainkaan keskinäisiä siltoja.

Tässä keksinnössä tarkoittaa partikkelikoko lukukeskimääräistä partikkelikokoa määritettynä alan ammattimiesten tuntemilla tavanomaisilla partikkelikoon määritysmenetelmillä, kuten sedimentaatiovirtausfraktioinnilla, fotonikorrelaatiospektroskopialla tai kiekkosentrifugoinnilla. Termi "alle noin 1 000 nm:n suuruinen tehollinen

keskimääräinen partikkelikoko" tarkoittaa sitä, että ainakin 90 %:lla partikkeleista on sellainen lukukeskimääräinen partikkelikoko, joka on edellä mainituilla menetelmillä määritettynä alle noin 1 000 nm. Tämän keksinnön erityisen edullisissa sovellutusmuodoissa tehollinen keskimääräinen partikkelikoko on alle noin 400 nm. Joissakin tämän keksinnön sovellutusmuodoissa tehollinen keskimääräinen partikkelikoko on alle noin 300 nm. Tehollista keskimääräistä partikkelikokoa tarkasteltaessa on edullista, että partikkelikoko ainakin 95 %:ssa ja edullisemmin ainakin 99 %:ssa partikkeleista on pienempi kuin tehollinen keskiarvo, esimerkiksi 1 000 nm. Erityisen edullisissa sovellutusmuodoissa olennaisesti kaikkien partikkelien koko on alle 1 000 nm.

US-patenttijulkaisussa 4 540 602 ovat Motoyama et al. kuvanneet, että kiinteä lääkeaine voidaan jauhattaa suurimoolimassaisen aineen vesipitoisessa liuoksessa ja että tällaisesta märkäjauhatuksesta saadaan tulokseksi lääkeaine, joka on saatettu sellaisten hienojakoisten partikkelien muotoon, joiden halkaisija on 0,5 µm:stä tai tätäkin pienemmästä arvosta 5 µm:iin. Tekijät eivät ole ehdottaneet, että menetelmällä voitaisiin saada partikkeleita, joiden tehollinen keskimääräinen partikkelikoko olisi alle noin 1 µm. Yrityksistä toistaa Motoyama et al.:n kuvaamia märkäjauhatusmenetelmiä saatiin partikkeleita, joiden keskimääräinen partikkelikoko oli paljon suurempi kuin 1 µm.

Tämän keksinnön mukaisia partikkeleita voidaan valmistaa menetelmällä, joka käsittää vaiheet, joissa syöpälääke dispergoidaan vesipitoiseen dispergointimediumiin ja käytetään mekaanisia keinoja jauhatusväliaineiden läsnä ollessa syöpälääkkeen partikkelikoon pienentämiseen sellaiseksi, että sen tehollinen keskimääräinen partikkelikoko on alle noin 1 000 nm. Partikkelien koko voidaan pienentää pintaa modifioivan aineen läsnä ollessa. Vaihtoeh-

toisesti voidaan partikkelit tuoda kosketukseen pintaa modifioivan aineen kanssa jauhatuksen jälkeen.

Seuraavassa on esitetty yleinen menetelmä tämän keksinnön mukaisten partikkelien valmistamiseksi. Valittu syöpälääke on saatu käyttöön kaupallisesti ja/tai se on valmistettu tällä alalla tunnetuilla menetelmillä tavanomaiseen karkeajakoiseen muotoon. On edullista, mutta ei välttämätöntä, että valitun karkeajakoisen syöpälääkkeen partikkelikoko on alle noin 100 µm seula-analyysillä määritettynä. Jos syöpälääkkeen karkeajakoisten partikkelien koko on suurempi kuin noin 100 µm, on edullista, että syöpälääkkeen partikkelien kokoa pienennetään alle 100 µm:n suuruiseksi tavanomaisilla jauhatusmenetelmillä, kuten ilmasuihku- tai fragmentointijauhatuksella.

Valittu karkeajakoinen syöpälääke voidaan sitten lisätä esiseoksen valmistamiseksi nestemäiseen mediumiin, johon se on olennaisesti liukenematon. Syöpälääkkeen konsentraatio nestemäisessä mediumissa voi vaihdella alueella noin 0,1 - 60 % ja konsentraatio on edullisesti alueella 5 - 30 % (w/w). On edullista, mutta ei välttämätöntä, että esiseoksessa on pintaa modifioivaa ainetta. Pintaa modifioivan aineen konsentraatio voi vaihdella alueella noin 0,1 - noin 90 paino-%, ja se on edullisesti 1 - 75 paino-% ja edullisemmin 20 - 60 paino-% lääkeaineen ja pintaa modifioivan aineen yhteisen kokonaispainon perusteella ilmoitettuna. Esiseossuspension näennäinen viskositeetti on edullisesti alle noin 1 Pa·s.

Esiseosta voidaan käyttää suoraan käsittelemällä sitä mekaanisesti dispersiossa olevan keskimääräisen partikkelikoon pienentämiseksi alle 1 000 nm:n suuruiseksi. On edullista, että esiseosta käytetään sellaisenaan silloin, kun jauhatukseen käytetään kuulamyllyä. Vaihtoehtoisesti voidaan syöpälääke ja valinnaisesti käytettävä pintaa modifioiva aine dispergoida nestemäiseen väliaineeseen käyttäen sopivaa ravistelua, esimerkiksi jyrämyllyä tai

Cowles-tyyppistä sekoitinta, kunnes havaitaan muodostuneen homogeenisen dispersion, jossa ei ole paljain silmin havaittavia suuria kokkareita. On edullista, että esiseos käsitellään tällaista esijauhatusdispergointivaihetta käyttäen, kun jauhatus suoritetaan laitteessa, jossa väliaine palautetaan uudelleen jauhatukseen.

Syöpälääkkeen partikkelikoon pienentämiseen käytettynä asiaankuuluvana mekaanisena keinona voi olla dispergointimylly. Sopiviin dispergointimyllyihin kuuluvat kuulamylly, kiekkomylly, tärymylly, kiertomylly ja myllyt, joissa käytetään jauhatusväliainetta, kuten kollerimylly ja helmimylly. Edullinen mylly on jauhatusväliainemylly, koska aiottu lopputulos, toisin sanoen partikkelikoon halutunlainen pienentyminen, saavutetaan tällöin suhteellisen lyhyttä jauhatusaikaa käyttämällä. Jauhatusväliainejauhatukseen soveltuva esiseoksen näennäinen viskositeetti on edullisesti noin 0,1 - noin 1 Pa·s. Kuulajauhatukseen soveltuva esiseoksen näennäinen viskositeetti on edullisesti noin 0,001 - noin 0,1 Pa·s. Näillä alueilla saadaan yleensä optimaalinen tasapaino partikkelien tehokkaan fragmentoitumisen ja jauhatusväliaineiden kulumisen välillä.

Partikkelikoon pienennysvaiheeseen soveltuvat jauhatusväliaineet voivat olla kiinteitä väliaineita, jotka ovat muodoltaan edullisesti pallomaisia tai partikkelimaisia ja joiden keskimääräinen partikkelikoko on alle noin 3 mm ja edullisesti alle noin 1 mm. Näillä väliaineilla voidaan saada aikaan halutulla tavalla tämän keksinnön mukaisia partikkeleita melko lyhyillä käsittelyajoilla ja ne aiheuttavat melko pientä jauhatuslaitteiston kulumista. Jauhatusväliainemateriaaliksi valitun materiaalin ei arvella olevan ratkaisevan. Kuitenkin zirkoniumoksidia, kuten magnesiumoksidilla stabiloitua 95-%:ista ZrO:ta, zirkoniumsilikaattia ja lasista valmistettuja jauhatusväliaineita, käyttäen saadaan partikkeleita, joiden kontaminoi-

vien aineiden pitoisuuksien arvellaan olevan hyväksyttäviä farmaseuttisten koostumusten valmistamiseksi. Lisäksi muiden väliaineiden, kuten ruostumattoman teräksen, titaanin, alumiinioksidin ja yttriumilla stabiloidun 95-%:isen ZrO:n, odotetaan olevan käyttökelpoisia. Edullisten väliaineiden tiheys ylittää arvon noin 2,5 g/cm^3.

Jauhatusaika voi vaihdella laajoissa rajoissa ja tämä on tietyn nimenomaisen mekaanisen keinon ja valittujen käsittelyolosuhteiden mukainen. Kuulamyllyjen ollessa kyseessä voidaan tarvita jopa 5 päivän pituisia tai tätäkin pidempiä käsittelyaikoja. Suurella leikkausvoimalla vaikuttavia väliaineita sisältävissä myllyissä on toisaalta päästy haluttuihin tuloksiin käsittelyajoilla, jotka ovat alle yhden päivän pituisia (viipymäajat yhdestä minuutista useisiin tunteihin).

Partikkelien koko on pienennettävä sellaisessa lämpötilassa, joka ei heikennä merkittävästi syöpälääkkeen ominaisuuksia. Edullisia käsittelylämpötiloja ovat tavallisesti noin 30 - 40 °C:ta matalammat lämpötilat. Käsittelyvälineet voidaan haluttaessa jäähdyttää tavanomaisilla jäähdytyslaitteilla. Menetelmää käytetään asiaankuuluvalla tavalla olosuhteissa, jotka ovat vallitseva ympäristön lämpötila ja sellaiset käyttöpaineet, jotka ovat turvallisia ja tehokkaita jauhatuksen suorittamiseksi. Ympäristön painetta vastaava käyttöpaine on esimerkiksi tyypillistä kuulamyllyille, kiekkomyllyille ja tärymyllyille. Käyttöpaineet, jotka ovat jopa noin 1,4 kg/cm^2, ovat tyypillisiä jauhatusväliainemyllyille.

Mikäli pintaa modifioivaa ainetta ei käytetty esiseoksessa, sitä on jauhatuksen jälkeen lisättävä dispersioon esiseosta koskevassa kuvauksessa esitetty määrä. Tämän jälkeen dispersio voidaan sekoittaa esimerkiksi ravistelemalla voimakkaasti. Dispersiolle voidaan suorittaa vaihtoehtoisesti ultraäänikäsittely esimerkiksi käyttämällä ultraääniteholähdettä. Dispersioon voidaan esimerkiksi

kohdistaa ultraäänienergiaa, jonka frekvenssi on 20 - 80 kHz, noin 1 - 120 sekuntia.

Syöpälääkkeen ja pintaa modifioivan aineen suhteellinen määrä voi vaihdella laajoissa rajoissa ja pintaa modifioivan aineen optimimäärä voi olla riippuvainen esimerkiksi tietystä nimenomaisesta syöpälääkkeestä, valitusta pintaa modifioivasta aineesta, pintaa modifioivan aineen kriittisestä misellikonsentraatiosta, mikäli tämä muodostaa misellejä, syöpälääkkeen pinta-alasta jne. Pintaa modifioivaa ainetta on edullisesti määrä, joka on noin 0,1 - 10 mg syöpälääkkeen pinta-alan yhtä neliömetriä kohti. Pintaa modifioivaa ainetta voi olla määrä, joka on 0,1 - 90 paino-%, edullisesti 0,5 - 80 paino-% ja edullisemmin 1 - 60 paino-% kuivan partikkelin kokonaispainon perusteella ilmoitettuna.

Tässä keksinnössä on kehitetty yksinkertainen seulontamenetelmä, jolla voidaan valita sellaiset keskenään yhteensopivat pintaa modifioivat aineet ja syöpälääkkeet, joista saadaan haluttujen partikkelien pysyviä dispersioita. Syöpälääkkeen karkeajakoiset partikkelit dispergoidaan ensin nesteeseen, johon syöpälääke on olennaisesti liukenematon, esimerkiksi veteen, 2-%:iseen (w/v) konsentraatioon ja tätä jauhatetaan 120 tuntia valssimyllyssä seuraavissa jauhatusolosuhteissa:

jauhatusastia: 250 ml lasiastia
jauhatusastian käyttötilavuus: 250 ml
jauhatusväliaineen tilavuus: 120 ml
jauhatusväliainetyyppi: esipuhdistetut 1,0 mm zirkoniumoksidihelmet (yhtiön Zircoa Inc. kaupan pitämä tuote)
jauhatusaika: 120 tuntia
lietteen tilavuus: 60 ml
kierrosluku minuutissa: 92
huoneenlämpö.

Liete erotetaan jauhatusväliaineesta tavanomaisin menetelmin, esimerkiksi kaatamalla liete astiasta tai käyttäen pipettiä. Erotettu liete jaetaan sitten eriin ja näihin lisätään pintaa modifioivia aineita konsentraatioissa, jotka ovat alueella 2 - 50 paino-% syöpälääkkeen ja pintaa modifioivan aineen yhdistetyn kokonaispainon perusteella ilmoitettuna. Dispersioita käsitellään tämän jälkeen ultraäänellä (1 minuutti, 20 kHz) tai pyörresekoittimella käyttäen monikoeputkista laitetta yhden minuutin ajan kokkareiden dispergoimiseksi ja niiden partikkelikoko tutkitaan esimerkiksi fotonikorrelaatiospektroskopialla (PCS) ja/tai optisella mikroskoopilla (1 000-kertaisella suurennuksella). Mikäli stabiilin dispersion on havaittu muodostuneen, niin menetelmä tämän nimenomaisen syöpälääkkeen ja pintaa modifioivan aineen yhdistelmän valmistamiseksi voidaan optimoida edellä olevien ohjeiden mukaisesti. Termi pysyvä tarkoittaa sitä, että dispersiossa ei esiinny flokkulaatiota tai partikkelien yhteenkeräytymiä vähintään 15 minuutin ja edullisesti vähintään kahden päivän tai tätä pidemmän ajan kuluttua valmistamisesta paljain silmin ja edullisesti optisella mikroskoopilla 1 000-kertaisella suurennuksella tarkasteltuna. Edullisissa partikkeleissa ei esiinny flokkuloitumista eikä kokkaroitumista 0,1 N HCl:ään ja/tai fosfaatilla puskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen, jonka pH on 7,4, (PBS) tai rotan plasmaan dispergoituna.

Saatu dispersio on pysyvä ja se koostuu nestemäisestä dispergointimediumista ja edellä kuvatuista partikkeleista. Pinnasta modifioidun syöpälääkkeen nanopartikkelidispersio voidaan sumutuspäällystää sokeripallosten pinnalle tai farmaseuttisen lisäaineen pinnalle leijukerrossumutuspäällystyslaitteessa tällä alalla tunnetuilla menetelmillä.

Tämän keksinnön mukaisiin farmaseuttisiin syöpälääkekoostumuksiin kuuluvat edellä kuvatut ja niille soveltu-

va farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja-aine. Sopivat farmaseuttisesti hyväksyttävät kantaja-aineet ovat alan ammattimiesten tuntemia aineita. Näihin kuuluvat ei-toksiset fysiologisesti hyväksyttävät kantaja-aineet, adjuvantit tai laimentimet, jotka on tarkoitettu annettavaksi suun kautta kiinteässä tai nestemäisessä muodossa, rektaalisesti, nasaalisesti, lihaksensisäisesti, ihonalaisesti ja muilla näitä vastaavilla tavoilla.

Menetelmä nisäkkään hoitamiseksi tässä keksinnössä kuvatulla koostumuksella käsittää vaiheen, jossa hoitoa tarvitsevalle nisäkkäälle annetaan tehokas määrä edellä kuvattua syöpälääkekoostumusta. Hoitoon tarkoitetulla valitulla syöpälääkkeen annoksella on se vaikutus, että tietyllä nimenomaisella koostumuksella ja menetelmällä, jolla tätä annetaan, saadaan haluttu terapeuttinen vaste. Alan ammattimies voi vaivatta määrittää käytettäväksi tulevan annoksen, joka on tietyn nimenomaisen syöpälääkkeen, halutun terapeuttisen vaikutuksen, annostelutien, halutun hoitoajan ja muiden tekijöiden mukainen.

Erityisen edullinen piirre on se, että tämän keksinnön mukaisten syöpälääkekoostumusten toksisuus on aikaisempia pienempi ja tehokkuus parempi kuin aikaisempien koostumusten ollessa kyseessä, mikä käy selvästi ilmi seuraavaksi esitettävistä esimerkeistä. Lisäksi tämän keksinnön mukaiset partikkelit pysyvät melko pitkään kiertävässä veressä.

Lisäksi sellaisia syöpälääkkeitä, joita ei ole tähän saakka kyetty annostelemaan injektoimalla, voidaan antaa tehokkaasti injektoimalla esimerkiksi yhtenä suurena IV-injektiona, kun ne on valmistettu nanopartikkeleiksi ja formuloitu tämän keksinnön mukaisiksi syöpälääkekoostumuksiksi.

Tätä keksintöä kuvaavat lisäksi vielä seuraavat esimerkit, joiden ei kuitenkaan ole katsottava olevan tätä keksintöä rajoittavia.

Esimerkit 1 - 4 Nanopartikkelimuotoinen piposulfaani

Esimerkki 1

Piposulfaania (saatu Eastman Kodak -yhtiöstä) jauhatettiin seoksessa, joka sisälsi 0,33 % polyoksieteenisorbitaanimono-oleaattia, Tween 80:tä (ICI Americas Inc., Wilmington, DE), ja 0,67 % sorbitaanimono-oleaattia Span 80 (ICI), käyttäen 1 mm:n zirkoniumoksidihelmiä, noin 96 tuntia halkaisijaltaan noin 240 nm olevien partikkelien muodostamiseksi. Suspensiossa oleva lopullinen piposulfaanikonsentraatio oli 10 mg/ml. Partikkelit olivat stabiileja flokkuloitumisen/aggregoitumisen suhteen rotan plasmassa.

Jauhatusolosuhteet: Valmistettiin karkeajakoinen piposulfaanisuspensio lisäämällä 300 mg lääkeainetta 120 ml:n ruskeaan pulloon, johon oli etukäteen lisätty 60 ml esipuhdistettuja 1 mm:n zirkoniumoksidihelmiä (Zircoa Inc., Solon, OH), ja 30 ml 1-%:ista Tween 80/Span 80 -liuosta (seossuhde 1 : 2). Pinta-aktiivisten aineiden liuos valmistettiin punnitsemalla mittapulloon tarkasti 333 mg Tween 80 ja 667 mg Span 80 ja lisäämällä sitten steriiliä injektiovettä pinta-aktiivisten aineiden liuottamiseksi/dispergoimiseksi. Pulloon lisättiin sellainen riittävä määrä vettä, että lopulliseksi tilavuudeksi tuli 100 ml. Zirkoniumoksidihelmet puhdistettiin huuhtelemalla ne ensin 1 N rikkihapossa, jonka jälkeen ne huuhdottiin useaan kertaan deionisoidulla vedellä. Jauhatusväliaine kuivattiin tyhjiökaapissa noin 100 °C:ssa yön yli.

Suljettu primaariastia asetettiin sekundaariseen alumiinisäiliöön, joka oli vuorattu tiivistysmateriaalilla hyvän sovitustiukkuuden varmistamiseksi. Tämä jauhatettiin valssimyllyssä (US Stoneware, Mawah, NJ) kierrosluvulla 144 kierrosta minuutissa noin 96 tunnin ajan. Jauhatuksen päätyttyä liete erotettiin jauhatusväliaineesta ja partikkelikoko määritettiin käyttäen PCS-laitetta. Näiden par-

tikkelien pysyvyys rotan plasman yhteydessä arvioitiin optisella mikroskoopilla 1 000-kertaisella suurennuksella. Formulaation lopullinen pH oli 6.

Kontrolli A (jauhattamaton) Karkeajakeinen suspensio, joka sisälsi 40 mg irtotavarana olevaa piposulfaania, dispergoitiin veteen siten, että seoksessa oli läsnä 3 % etanolia ja 1 % Tween 80:tä. Tätä suspensiota ei voitu injektoida IV-injektiona.

Esimerkistä 1 arvioitiin sen tehokkuus sellaisissa naaraspuolisissa hiirissä tehdyissä tutkimuksissa (paino keskimäärin 22 g), joihin oli istutettu varhaisessa vaiheessa oleva rintarauhasadenokarsinooma nro 16C päivänä 0. Formulaatiota injektoitiin päivästä 1 lähtien useiden päivien ajan. Antitumoraalinen aktiivisuus arvioitiin tarkkailemalla tuumorin painoa ja vertaamalla sitä kontrollieläimiin. Tulokset olivat seuraavat:

Käsittely	Annostelutie	Kokonaisannos (mg/kg)	Painohäviö (%)	T/C %	Soluja tappavan vaikutuksen log 10
Kontrolli	---	---	+5,5	---	---
Esimerkki 1	IV	356	-5,5	0	2,75
(243 nm)	IV	220	-5,5	2	2,75
	IV	137	-1,8	2	2,75
	IV	85	0	18	1,0
Kontrolli A	SC	800	-10,8	0	2,1

* Antotapa IV = suonensisäinen: SC = ihonalainen

Esimerkki 1 voitiin injektoida suoraan suspensiona, jonka konsentraatio oli 10 mg/ml. Yhden sellaisen injektion jälkeen, jossa injektoitiin 78 mg/kg yhtenä annoksena, ei havaittu akuuttia toksisuutta.

$$T/C = \frac{\text{Tuumorin paino käsitellyissä eläimissä}}{\text{Tuumorin paino kontrollieläimissä}} \text{ \%-yksiköissä}$$

Pienempi arvo tarkoittaa parempaa tehokkuutta, 0 % viittaa parantumisiin, <10 % on katsottava erittäin aktiiviseksi, 10 - 42 % on verrattain aktiivinen formulaatio ja yli 42 % on katsottava inaktiiviseksi.

Tappavan vaikutuksen log 10 = (T/C)/3,32 (Td), jossa T on niiden päivien lukumäärä, jossa tuumorin massan mediaani saavuttaa arvon 1 000 mg käsitellyissä eläimissä,

C on niiden päivien lukumäärä, jossa tuumorin massan mediaani saavuttaa arvon 1 000 mg kontrollieläimissä, ja

Td on tuumorin tilavuuden kahdentumisaika päivinä. Parantumiset (tuumorittomat eläimet) on suljettu pois (T-C)-laskutoimituksista.

Esimerkki 1 osoittaa sen, että tämän keksinnön mukaisella koostumuksella oli pienentynyt toksisuus ja parantunut tehokkuus verrattuna tekniikan tason mukaiseen koostumukseen ja sitä kyettiin antamaan yhtenä suurena IV-injektiona.

Esimerkit 2 - 4

Toistettiin esimerkissä 1 kuvattu jauhatuksen suoritus sitä lukuun ottamatta, että Tween 20:n ja Span 80:n välinen suhde oli 2 : 1. Tulokseksi saatu keskimääräinen partikkelikoko oli 297 nm.

Toistettiin esimerkissä 1 kuvattu jauhatuksen suoritus sitä lukuun ottamatta, että Tween 20:n ja Span 80:n välinen suhde oli 1 : 1. Tulokseksi saatu keskimääräinen partikkelikoko oli 380 nm.

Toistettiin esimerkissä 1 kuvattu jauhatuksen suoritus sitä lukuun ottamatta, että pintaa modifioiva aine oli Tween 60:n ja Span 60:n suhteessa 1 : 1 valmistettu seos. Tulokseksi saatu keskimääräinen partikkelikoko oli 301 nm.

Valmistettiin myös pysyviä piposulfaaninanopartikkeleita käyttäen pintaa modifioivana aineena naudan seerumin albumiinia.

Esimerkit 5 - 7 Nanopartikkelimuotoinen kamptotesiini

Esimerkki 5

Noin 60 ml etukäteen puhdistettuja zirkoniumhelmiä (1 mm) lisättiin 120 ml:n vetoiseen laajasuiseen pyöreään ruskeaan pulloon. Tähän lisättiin 0,35 g Tetronic 908:aa (BASF), jonka jälkeen lisättiin 0,35 g kamptotesiiniä (Sigma Chemicals, 95-%:isesti puhdasta). Tähän seokseen lisättiin 35 ml injektiovettä. Pullo suljettiin ja se asetettiin valssimyllyyn. Jauhatus suoritettiin pyörittämällä pulloa nopeudella 100 kierrosta minuutissa 7 päivän ajan.

Jauhatuksen päätyttyä tarkastettiin otetusta näytteestä (100 µl) partikkelikoko Malvern Zetasizer -laitetta käyttäen. Määrityksen mukaan partikkelien keskimääräinen koko oli 240 nm.

Esimerkki 6

Toistettiin esimerkki 5 lukuun ottamatta sitä, että Tetronic 908:n tilalla käytettiin PVA:ta (moolimassa 30 - 70 K). Lopullinen partikkelikoko oli 256 nm.

Esimerkki 7

Toistettiin esimerkki 5 lukuun ottamatta sitä, että Tetronic 908:n tilalla käytettiin arabikumia. Lopullinen partikkelikoko oli 298 nm.

Nanokamptotesiiniformulaatioista arvioitiin tehokkuus kahdessa muriinituumorimallissa, toisin sanoen rintarauhasadenokarsinooma nro 16C:ssä ja haimatiehytadenokarsinooma nro 03:ssa. Antitumoraalinen aktiivisuus arvioitiin tarkkailemalla tuumorin painoa koe- ja kontrollieläimissä.

1. Tehokkuustutkimukset haimatiehytadenokarsinooma nro 03:ssa

Esimerkki	Annos-telu-tie	Annos mg/kg	Paino-häviö (%)	Lääke-aine-kuolemat	T/C %
Kontrolli B	SC	60	-24,1	6/6	-
	SC	40,2	-21,8	5/5	-
	SC	26,7	-18,2	5/5	-
	SC	18	-10,9	1/5	62
6	IV	83,1	-16,7	1/4	14
	IV	78,2	-14,6	1/4	55
	IV	48,6	-8,3	0/4	0
	IV	24,3	-4,2	0/4	18
PVA-kontrolli	IV	----	+6,3	0/4	100
7	IV	93,5	-16,7	1/4	7
	IV	46,8	-14,6	0/4	17
	IV	23,4	-8,3	0/4	11
Arabikumi-kontrolli	IV	----	0,0	0/4	60

Kontrolli B -formulaation koostumus sisälsi 1 %:n karkeajakeista kamptotesiiniä 3-%:isessa etanolissa ja 1 %:n Tween 20:tä. Kontrolli B voitiin antaa vain ihonalaisesti ja se oli inaktiivista vieläpä pienimmällä SC-annoksella (18 mg/kg). Kontrolli B oli toksista 1/5 tutkituista eläimistä. Sitä vastoin tämän keksinnön mukaisten kamptotesiiniformulaatioiden annoksia, jotka olivat alueella 24 - 93 mg/kg, annettiin IV-injektioina ja niiden osoitettiin olevan turvallisia ja tehokkaita.

2. Tehokkuustutkimukset rintarauhasadenokarsinooma nro 16C -muriinituumorimallissa

Esimerkki	Annos-telu-tie	Annos mg/kg	Paino-häviö (%)	Lääkeaine-kuolemat	T/C %
Kontrolli B	SS	60	-23,5	5/5	-
	SC	30	-20,9	5/5	-
	SC	15	-18,3	3/5	14**
5	IV	65	-17,4	0/5	23
	IV	33	-18,7	1/5	33
	IV	16	-2,2	0/5	63
T908-kont-rolli	IV	--	+4,3	0/2	100
6	IV	65	-21,7	5/5	-
	IV	33	-15,7	0/5	100
PVA-kont-rolli	IV	--	+4,3	0/2	100

T908- ja PVA-kontrollit koostuivat vastaavien pintaa modifioivien aineiden 1-%:isista vesipitoisista liuoksista. Kontrolli B injektoitiin ihonalaisesti ja se oli toksinen kaikilla tutkituilla annoksilla. Tämän keksinnön mukaisia nanokamptotesiiniformulaatioannoksia annosteltiin suonensisäisesti.

** T/C % kontrollieläimien osalta määritettiin niiden eläinten lukumäärästä, jotka jäivät eloon tällä näytteellä. Tässä nimenomaisessa tapauksessa N oli 2.

3. Poistuminen verestä ja tuumorien häviäminen

Sen määrittämiseksi, liittyikö lisääntynyt tehokkuus farmakokineettisten ominaisuuksien muutoksiin, tut-

kittiin lääkeaineen poistuminen verestä ja tuumorien jakauma rintarauhasadenokarsinooma nro 16C -muriinituumorimallissa.

Tuumoreja saaneisiin hiiriin injektoitiin häntälaskimon kautta esimerkeissä 5 ja 6 kuvatulla tavalla formuloitua kamptotesiiniä konsentraationa 10 mg/ml, ja kontrollia, joka oli 0,1 N NaOH:ta lisäämällä solubilisoitua kamptotesiiniä, jonka konsentraatio oli 5 mg/ml. Eläimet eutanisoitiin eri aikoina injektion jälkeen, toisin sanoen ajankohdilla 5 min, 30 min, 60 min, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h ja 48 h, verinäyte otettiin talteen ja tuumori irrotettiin. Lääkeainenäytteiden konsentraatiot kvantitoitiin HPLC:tä käyttäen. Tulokset osoittavat, että tämän keksinnön mukaiset koostumukset vaikuttavat lääkeaineen poistumiseen kiertävästä verestä ja tuumorista.

T1/2 veressä ja tuumorissa

Formulaatio	Veri	Tuumori
Esimerkki 6	18 h	>48 h
Esimerkki 5	13 h	>48 h
Kontrolli	1,6 h	13,5 h

Kamptotesiinin poistumisen puoliintumisaika ja sen viipymäaika tuumorissa pidentyivät merkittävästi, kun formulointi oli suoritettu tämän keksinnön mukaisesti. Tästä tehtiin se johtopäätös, että kamptotesiinin nanopartikkelimuotoisen formulaation farmakokineettiset parametrit liittyvät suoraan lääkeaineen tehokkuuden paranemiseen.

Esimerkit 8 - 10 Nanopartikkelimuotoinen etoposidi

Esimerkki 8

Toistettiin esimerkki 5 sellaisin poikkeuksin, että 1,7 g etoposidia yhdistettiin 1,7 g:aan PVA:ta ja jauhatusaika oli 14 päivää. Lopullinen partikkelikoko oli 310 nm. Partikkelit olivat pysyviä hapossa ja plasmassa.

Esimerkki 9

Toistettiin esimerkki 8 lukuun ottamatta sitä, että PVA:n tilalla käytettiin Pluronic F-108:aa (BASF). Lopullinen partikkelikoko oli 312 nm. Partikkelit olivat pysyviä hapossa ja plasmassa.

Esimerkki 10

Etoposidia (2 %) jauhatettiin steriilissä vedessä seitsemän päivää. Jauhatetusta lietteestä valmistettiin seos 2-%:isen Pluronic F127 -liuoksen kanssa suhteessa 1 : 1. Seosta pyörresekoitettiin ennen partikkelikoon määritystä. Lopullinen koko oli 277 nm. Liete oli pysyvä simuloidussa mahanesteessä, PBS:ssä (pH 7,4) ja rotan plasmassa.

Tehokkuustutkimukset

Nanoetoposidiformulaatioiden tehokkuus arvioitiin kahdessa erillisessä tehokkuustutkimuksessa haimatiehyt-adenokarsinooma nro 03:ssa (PANC nro 03). Kontrolli C oli 2-%:inen vedetön etoposidiliuos, joka oli valmistettu käyttäen valmistusohjetta, joka on kuvattu sivuilla 741 - 743 teoksen Physicians' Desk Reference 46. painoksessa. Antitumoraalinen aktiivisuus määritettiin edellä kuvatulla tavalla tarkastelemalla koe- ja kontrollieläimistä peräisin olevien tuumorien painoa. Nämä tutkimukset osoittavat, että tämän keksinnön mukaiset etoposidikoostumukset tarjoavat käyttöön keinon suurten lääkeainekoostumusten annostelemiseksi, ilman että esiintyy todisteita vakavasta toksisesta reaktiosta.

1. Nanoetoposidin tehokkuustutkimukset PANC nro 03 -muriinituumorimallissa

Esimerkki	Annos-telu-tie	Annos mg/kg	Paino-häviö (%)	Lääkeaine-kuolemat	T/C %
Kontrolli C	IV	120	-24,0	0/5	4,0
	IV	75	-4,0	0/5	20,0
7	IV	160	-12,0	0/5	18,0
	IV	100	0,0	0/5	32,0
	IV	62	2,0	0/5	42,0
8	IV	160	-12,0	0/5	26,0
	IV	100	+2,0	0/5	35,0
	IV	62	+4,0	0/5	35,0
9	IV	170	-18,5	1/5	16
	IV	85	-2,0	0/5	35
	IV	43	+2,5	0/5	41

Esimerkit 11 - 16 Nanopartikkelimuotoinen taksoli

Esimerkki 11

Noin 18 ml etukäteen puhdistettua zirkoniumoksidi-jauhatusväliainetta (1 mm) lisättiin ruskeasta lasista valmistettuun 30 ml:n vetoiseen purkkiin. Siihen lisättiin 240 mg taksolia (Sigma Chemicals) ja 180 mg Tween 20:tä. Purkkiin lisättiin lopuksi 12 ml injektiovettä, se suljettiin ja kiinnitettiin valssimyllyyn 11 päiväksi. Lopullinen partikkelikoko oli 327 nm. Formulaatio oli pysyvä, kun sitä käsiteltiin PBS:llä (pH 7,4) ja rotan plasmalla.

Esimerkki 12

Toistettiin esimerkki 11 lukuun ottamatta sitä, että Tween 20:n tilalla käytettiin PVA:ta (moolimassa 30 - 70 k). Lopullinen partikkelikoko oli 365 nm.

Edellä olevien näytteiden tehokkuus määritettiin sellaisilla hiirillä suoritetuissa tutkimuksissa, joissa oli varhaisessa vaiheessa olevia rintarauhasadenokarsinoomia nro 16C. Antitumoraalinen aktiivisuus määritettiin vertaamalla taksolilla käsiteltyjen eläinten tuumorien painoja käsittelemättömien hiirten tuumorien painoihin. Toksisuus arvioitiin annoksen aluetta vaihtelemalla suoritettujen tutkimusten avulla käyttäen päätepisteenä kuolemaa ja painohäviötä. Kaikki näytteet injektoitiin IV-injektiona.

Esimerkki	Annos mg/kg	Painohäviö (%)	Kuolemat	Tuumorin mediaani päivänä 11	T/C %
Kontrolli D	----	+6,1	----	1539	--
Esimerkki 11	108,5	-1,5	0/5	1528	13
Esimerkki 12	108,5	-3,0	0/5	201	99

Taksolin kontrollinäytettä (NCI) ei ollut käytettävissä. Kuitenkin yksi taksoliannos formuloituna Cremophore EL:ään aiheuttaa välittömästi kuolemia 25 mg/kg suuruisena annoksena. Tämän keksinnön mukaisiin koostumuksiin formuloitu taksoli voitiin kuitenkin injektoida 88 mg/kg:n suuruisena annoksena ilman näkyviä haitallisia vaikutuksia.

Taksolisuspensiota, joka oli valmistettu esimerkin 11 mukaisella tavalla, käsiteltiin erikseen useilla pintaa modifioivilla aineilla. Uuden pintaa modifioivan aineen lisäyksen jälkeen seosta sekoitettiin pyörresekoittajalla ja siitä arvioitiin partikkelikoko ja pysyvyys nesteessä. Kaikki suspensiot sisälsivät 1 % taksolia ja 0,75 % Tween 20tä. Tulokset olivat seuraavat.

Esimerkki/ Pintaa modifioiva aine	Konsentraatio %	Koko (nm)	Pysyvyys nesteessä	
			PBS	Rotan plasma
13 CTAC	0,25	364	OK	Flokkuloituminen
14 AOT	0,25	322	VA*	VA
15 F68	0,5	297	VA/OK	VA/OK
16 T908	0,5	313	VA/OK	VA/OK

VA = vähäistä aggregoitumista

Esimerkit 17 - 18 Nanopartikkelimuotoinen 1,2,4-bentsotriatsiini-7-amiini-1,4-dioksidi

Noin 60 ml etukäteen puhdistettua zirkoniumdioksidi-jauhatusväliainetta (1 mm) lisättiin ruskeaan 120 ml:n vetoiseen purkkiin. Tähän lisättiin sitten 1,5 g 1,2,4-bentsotriatsiini-7-amiini-1,4-dioksidia ja 28,5 ml injektiovettä. Purkit suljettiin, asetettiin valssimyllyyn ja ravisteltiin nopeudella 95 kierrosta minuutissa 48 tuntia. Partikkelikoon määritettiin PCS-tutkimuksella olevan 322 nm, mutta se antoi viitteitä suurempien partikkelien esiintymisestä. Jauhatusta jatkettiin vielä 5 päivää.

Tutkimukset suoritettiin sekoittamalla edellisessä vaiheessa valmistettua 0,5 ml bentsotriatsiiniamiinidioksidilietettä 0,5 ml:aan pintaa modifioivien aineiden 6-%:isia liuoksia. Lääkeaineen lopullinen konsentraatio oli 2,5 % ja pintaa modifioivien aineiden konsentraatio 3 %. Pintaa modifioivilla aineilla stabiloituja bentsotriatsiiniamiinidioksidin nanosuspensioita käsiteltiin sitten joko PBS:llä (pH 7,0) tai 0,1 N HCl:llä (pH 1). Nestestabiilisuuden määrittämiseksi suoritettiin tutkimuksia tekemällä havaintoja optisella mikroskoopilla. Tulokset olivat seuraavat.

Esimerkki	Pintaa modifioiva aine	Pysyvyys		Humaaniplasma
		pH 1	pH 7	
17	PVP (12 K) (BASF)	Hieno	Hieno	Hieno
18	Arabikumi (Aldrich)	----	VA/OK	VA/OK

Tuloksista tehtiin se johtopäätös, että voitiin valmistaa 1,2,4-bentsotriatsiini-7-amiini-1,4-dioksidin pysyviä nanopartikkeleita.

Esimerkit 19 - 22 Nanopartikkelimuotoinen 1,2,4-bentsotriatsiini-3-amiini-1,4-dioksidi

7,5 ml edeltäkäsin puhdistettua zirkoniumoksidijauhatusväliainetta (1 mm) lisättiin 15 ml vetoiseen ruskeaan purkkiin, jonka lisäksi tähän tuotiin 18,75 mg 1,2,4-bentsotriatsiini-3-amiini-1,4-dioksidia ja 3,75 ml vettä. 11 päivän pituisen jauhatuksen jälkeen nanosuspensio erotettiin jauhatusväliaineesta. Kuhunkin 100 µl:n suuruiseen erään suspensiota lisättiin 100 µl pinta-aktiivisen aineen liuosta (2 %), mistä lääkeaineen lopulliseksi pitoisuudeksi saatiin 0,25 % ja pinta-aktivisen aineen pitoisuudeksi 1 %. Seosta käsiteltiin pyörresekoittajalla ja siitä tutkittiin partikkelikoko. Pysyvyys nesteessä määritettiin mikroskooppisesti sekoittamalla 10 µl suspensiota 90 µl:aan rotan plasmaa. Tulokset olivat seuraavat.

Esimerkki	Pintaa modifioiva aine	Partikkelikoko (nm)	Pysyvyys nesteessä Rotan plasma
19	PVP (12K)	134	Hieno
20	Arabikumi	344	VA/OK
21	Tween 80	128	Hieno
22	T908	130	Aggregoituu

Esimerkki 23 Nanopartikkelimuotoinen retiinihappo

30 ml edeltäkäsin puhdistettua zirkoniumoksidijauhatusväliainetta lisättiin 60 ml:n vetoiseen ruskeaan purkkiin. Tähän lisättiin 1 g transretiinihappoa (Sigma), 470 mg tyloksapolia ja 15 ml vettä. Seosta jauhatettiin valssimyllyssä 15 päivää. Lopullinen partikkelikoko oli 140 ml. Nanosuspensio oli pysyvä, kun sitä käsiteltiin joko rotan plasmalla tai simuloidulla mahanesteellä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä koostumuksen saamiseksi, t u n n e t t u siitä, että koostumus käsittää nanopartikkeleja, jotka koostuvat olennaisesti

(a) kidemuodossa olevasti syöpälääkkeestä, joka on valittu ryhmästä kloorimetiini, klorambusiili, uramustiini, mannomustiini, mekloret-aminoksidi, syklofosfamidi, ifosfamidi, trifosfamidi, tretamiini, tiotepa, triatsikvoni, mitomysiini, busalfaani, karmustiini, lomustiini, semustiini, streptotsotosiini, mitobronitoli-, dakarbatsiini- ja prokarbatsiinityyppiset alkyloivat aineet, fluorourasiili, floksuridiini, tegafur, sytarabiini, idoksuridiini, flusytosiini, merkaptopuriini, atsatiopriini, tiamipriini, vidarabiini, pentostatiini, puromysiini, vinblastiini, vinkristiini, teniposidi, adriamysiini, daunomysiini, doktinomysiini, mitramysiini, bleomysiini, mitomysiini, L-asparaginaasi, alfa-interferoni, taksoli, retiinihappo, prednisoni, hydroksiprogesteronikaproaatti, medroksiprogesteroniasetaatti, megestroliasetaatti, dietyylistilbestroli, testosteronipropionaatti, fluoksimesteroni, flutamidi, leuprolidi, 1,2,4-bentsotriatsin-3-amiini-1,4-dioksidi, 1,2,4-bentsotriatsiini-7-amiini-1,4-dioksidi, sisplatiini, karboplatiini, hydroksiurea, mitotaani, aminoglutetimidi, syklosporiini, atsatiopriini, sulfasalatsiini, metoksaleeni ja talidomidi; ja

(b) silloittamattomasta pintaa modifioivasta aineesta, joka on adsorboitunut syöpälääkkeen pinnalle määränä, joka on riittävä ylläpitämään keskimääräisen partikkelikoon alle noin 1000 nm:n suuruisena.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pintaa modifioivaa ainetta on 0,1 - 90 paino-% partikkelista.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nanopartikkelien keskimääräinen partikkelikoko on alle 400 nm.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nanopartikkelien keskimääräinen partikkelikoko on alle 300 nm.

5. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pintaa modifioiva aine on polyvinyylialkoholi, polyvinyylipyrrolidoni, tyloksapoli, tetrafunktionaalinen lohkosekapolymeeri, joka on peräisin eteenioksidin ja propeenioksidin vaiheittaisesta liittämisestä eteenidiamiiniin, arabikumi, eteenioksidin ja propeenioksidin lohkosekapolymeeri, polyoksieteenisorbitaanirasvahappoesteri, rasvahapon sorbitaaniesteri, heksyylidekyylitrimetyyliammoniumkloridi ja meripihkahapon natriumsuolan dioktyyliesteri.

6. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pintaa modifioiva aine esiintyy yhdessä yhden tai useamman pintaa modifioivan aineen kanssa.

7. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke esiintyy yhdessä yhden tai useamman muun syöpälääkkeen kanssa.

8. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on taksoli.

9. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on taksoli ja pintaa modifioiva aine on polyvinyylialkoholi.

10. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on taksoli ja pintaa modifioiva aine on polyoksieteenisorbitaanirasvahappoesteri.

11. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on taksoli ja pintaa modifioiva aine käsittää polyoksieteenisorbitaanirasvahappoesterin yhdessä pintaa modifioivan aineen kanssa, joka on jokin aine ryhmästä, johon

kuuluvat heksyylidekyylitrimetyyliammoniumkloridi, meripihkahapon natriumsuolan dioktyyliesteri, eteenioksidin ja propeenioksidin lohkosekapolymeeri ja tetrafunktionaalinen lohkosekapolymeeri, joka on peräisin eteenioksidin ja propeenioksidin vaiheittaisesta liittämisestä eteenidiamiiniin.

12. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on 1,2,4-bentsotriatsiini-3-amiini-1,4-dioksidi, 1,2,4-bentsotriatsiini-7-amiini-1,4-dioksidi tai retiinihappo.

13. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on 1,2,4-bentsotriatsiini-3-amiini-1,4-dioksidi ja pintaa modifioiva aine on polyvinyylipyrrolidoni.

14. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on 1,2,4-bentsotriatsiini-7-amiini-1,4-dioksidi ja pintaa modifioiva aine on arabikumi.

15. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on 1,2,4-bentsotriatsiini-7-amiini-1,4-dioksidi ja pintaa modifioiva aine on polyvinyylipyrrolidoni.

16. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on 1,2,4-bentsotriatsiini-7-amiini-1,4-dioksidi ja pintaa modifioiva aine on tetrafunktionaalinen lohkosekapolymeeri, joka on peräisin eteenioksidin ja propeenioksidin vaiheittaisesta liittämisestä eteenidiamiiniin.

17. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on 1,2,4-bentsotriatsiini-3-amiini-1,4-dioksidi ja pintaa modifioiva aine on arabikumi.

18. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke

on 1,2,4-bentsotriatsiini-3-amiini-1,4-dioksidi ja pintaa modifioiva aine on polyoksieteenisorbitaanirasvahappoesteri.

19. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on 1,2,4-bentsotriatsiini-3-amiini-1,4-dioksidi ja pintaa modifioiva aine on tetrafunktionaalinen lohkosekapolymeeri, joka on peräisin eteenioksidin ja propeenioksidin vaiheittaisesta liittämisestä eteeniamiiniin.

20. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että syöpälääke on retiinihappo ja pintaa modifioiva aine on tyloksapoli.

21. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että koostumus on injektoitavissa.

22. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että koostumus sisältää sille sopivaa farmaseuttista kantajaa.

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS **TUTKIMUSRAPORTTI**
Patentti- ja innovaatiolinja

HAKEMUSNUMERO	LUOKITUS
933040	A 61 K 9/14
	☐ jatkuu kääntöpuolella

TUTKITTU AINEISTO
Patenttivirastojen julkaisut FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US:
☐ jatkuu kääntöpuolella
Muu aineisto
☐ jatkuu kääntöpuolella

VIITEJULKAISUT

Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
	FI 920321 (A 61 K 9/51)	

☐ jatkuu kääntöpuolella

*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna
Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu
A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este

Päiväys	Tutkija
31.3.2003	Ritva Aalto