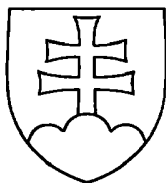


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 06.10.1998
(31) Číslo prioritnej prihlášky: RM97A000613
(32) Dátum priority: 10.10.1997
(33) Krajina priority: IT
(40) Dátum zverejnenia: 11.12.2000
(86) Číslo PCT: PCT/IT98/00266, 06.10.1998

(21) Číslo dokumentu:

499-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷ :

A 61K 31/495

(71) Prihlasovateľ: LABORATOIRE MEDIDOM S. A., Geneve, CH;

(72) Pôvodca vynálezu: Lisi Giuseppe, Milano, IT;

(74) Zástupca: Rott, Růžička, Guttman, v. o. s., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Použitie flunarizínu na topickú liečbu glaukómu**

(57) Anotácia:
Použitie flunarizínu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli na výrobu oftalmického liečiva na topické podanie na zníženie očnej hypertenzie. Vynález tiež zahŕňa antiglaukomatické prípravky obsahujúce kombináciu flunarizínu s beta-blokátormi, ako je timolol.

Použitie flunarizínu na topickú liečbu glaukómu

Oblasť techniky

Vynález sa týka použitia flunarizínu na topickú liečbu glaukómu. Špecifickejšie sa vynález týka použitia flunarizínu, známeho ako blokátora kalciového kanála a používaného ako cerebrálneho a periférneho vazodilatátora v novej indikácii ako antiglaukomatika určeného na topickú oftalmickú liečbu.

Doterajší stav techniky

Ako je známe, glaukóm je patologické očné ochorenie, ktorého príčiny nie sú doposiaľ dobre známe. Uvedený stav sa obvykle prejavuje progresívnym zvyšovaním vnútroočného tlaku, čo vedie k vážnemu poškodeniu štruktúr oka a predovšetkým vedie k poškodeniu terča zrakového nervu a k zúženiu zorného poľa a nakoniec k atrofii zrakového nervu. Táto choroba sa obvykle spája s nedostatočným výtokom komorovej vody z oka, ale tiež s ďalšími príčinami ako je napríklad tvorba komorovej vody a tlak v episklerálnych žilách, ktoré sú zahrnuté v regulácii vnútroočného tlaku.

Logický základ súčasne používanej farmakologickej terapie je preto zníženie vnútroočného tlaku. Liečivá obvykle používané na tento účel možno rozdeliť podľa mechanizmu ich účinku do tried, a zahrnujú beta-blokátory (ako je timolol, betaxolol, levobunolol), sympatomimetiká (ako je epinefrín a dipivefrín), parasympatomimetiká alebo miotiká (ako je pilokarpín a acetylcholín) a inhibítory karbonatanhydrázy (ako je acetazolamid a dichlórphenamid). Okrem predchádzajúcich liečiv už v terapii zavedených, výskum smerujúci k nájdeniu liečiv majúcich menej vedľajších účinkov a s dlhšie trvajúcim účinkom viedol v neskorších rokoch k hodnoteniu možnosti využitia ďalšej triedy liečiv, t.j. blokátorov kalciového kanála, pri liečbe glaukómu. Tieto prostriedky, známe tiež ako blokátory vstupu kalcia alebo antagonisty kalcia sa obvykle používajú ako vazodilatátory a pri liečbe srdcových chorôb. Na tieto indikácie patrí me-

dzi najrozšírenejšie antagonisty kalcia napríklad nifedipín, diltiazem a verapamil.

Úloha kalcia v dynamike komorovej vody a v riadení vnútroočného tlaku doposiaľ nebola úplne objasnená, aj keď je známe, že tvorba i výtok komorovej vody sú modulované tiež kalciom. Pokiaľ ide o tvorbu komorovej vody je potrebné najprv uviesť, že hydrostatická zložka, vyvolaná arteriálnym tlakom a tlakom ciev zásobujúcich riasnaté teliesko je kalcium-dependentná ako potvrdzuje známy systemický vaskulárny účinok antagonistov kalcia. Ďalej, osmotický tlak vyvolaný iónovou sekréciou na úrovni nepigmentovaného riasinkového epitelu je pravdepodobne modulovaný kalciom podľa hypotézy Abelsona a sp. (Abelson M.B., Gilbert C.M., Smith L.M., Sustained reduction of intraocular pressure in humans with calcium channel blocker verapamil, *Am.J.Ophthalmol.* 105; 155 (1988)).

Pokiaľ ide o výtok komorovej tekutiny, ióny kalcia majú priamu úlohu v modulácii tlaku v episklerálnych žilách a podľa niektorých štúdií kalcium ovplyvňuje výtokovú kapacitu udržovaním štrukturálnej integrity trabekulárnej a vonkajšej steny Schlemmovho kanálu.

Oproti predchádzajúcim záverom však existuje niekoľko experimentálnych prác ako na zvieratách, tak aj klinických, ktoré zahrnujú ako systemické tak topické podanie, a uvádzajú odporujúce si výsledky týkajúce sa aktivity blokátorov kalciového kanála v terapii glaukómu. Napríklad Monica a sp. (Monica M.L., Hesse R.J., Messerli F.H., The effect of calcium-channel blocking agent on intraocular pressure, *Am.J.Ophthalmol.* 96, 814 (1983)) uvádzajú, že orálne podanie nitrendipínu pacientom so strednou hypertenziou, ale s normálnym vnútroočným tlakom mierne znižuje vnútroočný tlak, zatiaľ čo Beatty a spol. (Beatty J.F., Krupin T., Nichols P.F., Elevation of intraocular pressure by calcium-channel blockers, *Arch.Ophthalmol.* 102; 1072 (1984) nezistili pri orálnom podaní verapamilu králikom žiadny účinok, a pri topickom podaní uvádzajú ešte zvýšenie vnútroočného tlaku. Z ešte novších prác napríklad Payene a spol. (Payene L.J., Slagle T.M., Cheeks L.T., Effect of calcium-channel blockers on intraocular pressure, *Ophthalmic Res.*, 22; 337 (1990)) došli k záveru, že pri systemickom podaní verapamilu alebo nifedipínu králikom zníženie

vnútroočného tlaku, ale nepozorovali žiadny významnejší účinok pri podaní rovnakých prostriedkov alebo diltiazemu topickým spôsobom.

Všeobecne však, aspoň pokiaľ sa jedná o verapamil, možno uviesť, že podanie tohto liečiva človeku obvykle vedie ku zníženiu vnútroočného tlaku. Viac konzistentná redukcia pri topickom podaní bola vysvetlená najmä v práci autorov Ettl a sp. (Ettl A., Daxer A., Hoffmann U., Calcium channel blockers in the management of low-tension and open-angle glaucoma, Am.J.Ophthalmol.116; 778, (1993)). Uvedení autori zistili v králičom oku oproti systemickému podaniu hladiny verapamilu 200krát vyššie.

Použitie verapamilu v liečbe očnej hypertenzie je predmetom medzinárodnej PCT prihlášky č. WO 92/07563 podanej Abelsonom (t.j. prvým autorom vyššie citovaným) a sp. Neskoršou publikáciou toho istého autora je medzinárodná prihláška č.WO 96/03986, ktorá sa týka liečby zvláštnej formy glaukómu, označovanej ako nízkotlakový glaukóm, ktorý je charakterizovaný takmer normálnym vnútroočným tlakom, pričom však zahrnuje všetky ostatné symptómy glaukómu. Táto prihláška uvedený návrh terapie genericky rozširuje na všetky antagonisty kalcia, a viac liečiv tejto skupiny je zahrnutých v úvodnom zozname. Predsa však jediný príklad účinnej zložky uvedený v dokumente a podložený pokusnými údajmi je verapamil.

Ďalší blokátor kalciového kanála v patentovej dokumentácii špecificky navrhnutý na liečbu vnútroočnej hypertenzie je diltiazem (Francúzsky patent č. 2593395, publikovaný v r.1987) a v medzinárodnej PCT prihláške č.WO 93/23082 je uvedený zoznam viac ako stovky antagonistov kalcia. Uvedená medzinárodná prihláška sa týka liečby glaukómu pomocou kombinácie zlúčeniny, ktorá znižuje vnútroočný tlak (t.j. obvyklého antiglaukomatického prostriedku) s blokátorom kalciového kanála. Táto prihláška neobsahuje žiadny špecifický príklad výhodnej kombinácie, ani žiadne podrobné experimentálne údaje o aktivite niektorej kombinácie.

Z niektorých pokusov s verapamilom možno tiež zistiť, že oftalmologické použitie uvedeného prostriedku spôsobuje nežiaduce zdurení rohovky (Green K., Cheeks L., Hull D.S., Effects of calcium channel blockers on rabbit

corneal endothelial function, Curr.Eye Res. 13; 401-408, (1994)). Tento jav sa potom javí zvlášť kritický pri liečbe chronického stavu, ako je v tomto prípade glaukóm.

Aj keď pri celej triede antagonistov kalcia sa už predpokladá potenciálne využitie pri liečbe glaukómu, pravdepodobne doposiaľ nebola zaznamenaná zvláštna aktivita špecifického prostriedku patriaceho do uvedenej skupiny, t.j. flunarizínu, voči uvedenému typu patológií. Autori vynálezu teraz zistili a opísali v predloženom vynáleze, že špecifický antagonista kalcia flunarizín po očnénom topickom podaní umožňuje znížiť vnútroočný tlak prekvapujúco výraznejšie ako ostatné antagonisty kalcia doposiaľ navrhované a testované na terapiu glaukómu.

V rámci štúdií súvisiacich s predloženým vynálezom bolo taktiež zistené, že určité známe receptory, označované ako σ receptory, sú lokalizované v oblasti oka, hlavne v oblasti riasnatého telesa a dúhovky, a že určité špecifické "ligandy", majúce σ -agonistickú aktivitu, výrazne znižujú očný tlak. Pretože bolo experimentálne zistené, že flunarizín vykazuje σ -agonistickú aktivitu, ktorá je oveľa vyššia ako je aktivita iných antagonistov kalcia, tak táto vlastnosť môže vysvetliť neočakávane väčšiu účinnosť flunarizínu pri znižovaní vnútroočného tlaku za predpokladu, že táto účinnosť je založená na mechanizmoch účinku, ktoré sú aspoň čiastočne odlišné od ďalších prostriedkov blokujúcich kalciový kanál.

Na identifikáciu prítomnosti σ -receptorových miest v oku bol použitý spôsob "väzby na receptor". Postup bol uskutočnený s bunkovými membránami získanými z irido-ciliárneho komplexu. Uvedený irido-ciliárny komplex bol explantovaný zo samcov albinotických králikov druhu New Zealand po ich usmrtení. Tkanivo bolo zhomogenizované v pufri a frakcia obohatená o proteíny bunkovej membrány bola izolovaná odstredením. Koncentrácia celkového obsahu proteínov bola stanovená spôsobom podľa Lowryho (Lowry J., J.Biol.Chem., 193; 265 (1951)). Alikvotné podiely uvedenej frakcie homogenizátu obsahujúce 300 μ g celkových proteínov boli inkubované so skalárnymi podielmi [3 H](+)-pentazocínu (ktorý sa používa iba na experimentálne účely ako

σ ligand). Reakcia sa nechala prebiehať 150 minút pri 37 °C a potom, po filtrácii sa zmerala rádioaktivita na filtri pomocou detektora s kvapalným scintilátorom. Bol stanovený celkový počet receptorov a zjavná disociačná konštanta (K_d) a bolo zistené, že [^3H](+)-pentazocín sa selektívne viaže na receptorové miesta prítomné v irido-ciliárnej oblasti kráľika. Na základe súčasných vedeckých poznatkov možno usudzovať, že uvedené receptory sú typu σ -1.

Ďalej bolo uskutočnené stanovenie "kompetitívnej väzby" s použitím konštantného množstva [^3H](+)-pentazocínu a skalárnych podielov (+)-N-alylnormetazocínu (NANM) (ktorý sa používa iba na experimentálne účely ako σ -ligand) a bolo zistené, že zlúčenina uvedená ako druhá vytesňuje rádioaktívne ligandy z receptorových miest. Analýzou Hill koeficienta bolo taktiež zistené, že NANM interaguje iba s jednou triedou σ receptorových miest.

V rámci rovnakého výzkumu bolo zistené, že prostriedky s σ -agonistickou aktivitou vykazujú antihypertenzívnu aktivitu v oku. Samcom albinotických králikov druhu New Zealand bol zmeraný vnútroočný tlak a do spojivkovej klenby pravého oka im bol podaný prípravok obsahujúci 1% NANM (50 μl). Po 60, 120, 180 a 240 minútach po nakvapkaní im bol opäť zmeraný vnútroočný tlak a bolo zistené, že v porovnaní s prípravkom obsahujúcim samotné vehikulum došlo 60 minút po nakvapkaní k významnému zníženiu ($p < 0,01$) vnútroočného tlaku.

Konečne, ako už bolo uvedené vyššie, štúdie väzby na receptor uskutočnené s flunarizínom (niektoré z nich sú uvedené nižšie) ukázali, že flunarizín má afinitu voči σ -1 receptorom, ktorá nie je rovnakým spôsobom porovnateľná s afinitou, ktorú vykazujú iné skúšané prostriedky blokujúce kalciový kanál.

Ďalší teraz zistený výhodný aspekt odlišujúci flunarizín od iných prostriedkov blokujúcich kalciový kanál, doposiaľ navrhnutých na topickú liečbu glaukómu je, že flunarizín nemá žiadny vedľajší účinok pokiaľ sa týka zdurenia rohovky.

Podstata vynálezu

Predložený vynález sa teda špecificky týka použitia flunarizínu, prípadne vo forme farmaceuticky prijateľnej soli, na topickú liečbu glaukómu, t.j. použitia flunarizínu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli pri výrobe oftalmického liečiva určeného na liečbu a/alebo na prevenciu glaukómu. Obvykle sa topické podávanie flunarizínu uskutočňuje aplikáciou prípravku vo forme vodného roztoku alebo suspenzie, alebo vo forme gélu, masti alebo krému s farmaceuticky prijateľným vehikulom alebo vo forme erodovateľnej očnej vložky alebo "zásobníkového" systému s polymérnou membránou určených na aplikáciu do spojivkového vaku.

Koncentrácia flunarizínu v oftalmicky prijateľnom vehikule sa môže pohybovať v rozmedzí od 10 $\mu\text{g/ml}$ do 5 mg/ml, tj. od 0,001 do 0,500 % hmotnostných. Optimálna koncentrácia sa najprv zvolí na základe dávky určenej na podávanie: v prípade aplikácie napríklad vo forme očných kvapiek by jedna kvapka mala obsahovať také dostatočné množstvo flunarizínu, aby práve tato jedna kvapka už bola účinná, alebo aby sa účinnosť docielila pri dvojitom nakvapkaní (t.j. dve kvapky). Ďalšie kritériá pre voľbu koncentrácie zahŕňujú očnú znášanlivosť (malo by sa vziať tiež do úvahy, že spojivkový vak, do ktorého sa oftalmický prípravok kvapká, má obmedzenú kapacitu) a stabilitu účinnej zložky. Výhodná koncentrácia pre prípravky vo forme vodných roztokov (očné kvapky) je 0,050 % hmotnostných, a výhodne je uvedený produkt obsiahnutý vo forme zodpovedajúcej hydrochloridovej soli (optimálna koncentrácia flunarizín-hydrochloridu : 0,052 %).

Podľa zvlášť výhodného uskutočnenia vynálezu je antiglaukómová účinnosť navrhovaného oftalmického prípravku ďalej zvýšená tým, že flunarizín je prítomný v kombinácii s účinným množstvom beta-blokátora. Táto trieda beta-blokátorov (alebo β -adrenergických blokátorov), opísaných vyššie, predstavuje v súčasnosti najrozšírenejšiu triedu protiglaukómových prostriedkov. Tieto prostriedky sa používajú v topickej liečbe chronického glaukómu s otvoreným uhlom a všeobecnejšie pri liečbe vnútroočnej hypertenzie. Mechanizmus ich účinku prevažne spočíva v redukcii tvorby komorovej vody a preto neočakávanú účinnosť navrhutej kombinácie flunarizínu (u ktorého bolo zistené, že podpo-

ruje zvýšenie výtoku komorovej vody) možno rozumne vysvetliť vzájomne sa dopĺňujúcimi uvedenými účinkami.

Výhodne je koncentrácia beta-blokátora v kombinácii podľa vynálezu od 0,1 do 2,5 % hmotnostných a najvýhodnejším beta-blokátorom je timolol alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.

Vehikulom, ktoré možno použiť na prípravu očných kvapiek podľa vynálezu je obyčajný fyziologický soľný roztok obsahujúci 0,9 % hmotnostných chloridu sodného. Tento roztok je izotonický so slzami a je preto v oku dobre znášaný. Predsa však je tiež možné použiť hypotonické roztoky alebo suspenzie, pretože je známe, že majú s očnými tkanivami dobrú znášanlivosť.

Ku kompozícii podľa vynálezu je možné pridať aj ďalšie prísady tak, aby sa upravila tónicita roztokov alebo suspenzií, aby sa stabilizovala účinná zložka (zložky) a aby sa zvýšila tolerancia na prípravok. Konkrétne, použité pufre by mali udržiavať pH v rozmedzí 4-8. Napríklad vyššie uvedený soľný roztok možno pufrovať akýmkoľvek z pufrov používaných vo farmácii pre oftalmické použitie ako je napríklad fosforečnanový pufer alebo Trizma pufer (t.j. [tris(hydroxymetyl)aminometán] tak, aby sa získala fyziologická hodnota pH v rozmedzí 7,0-7,4. Ďalej, taktiež osmolarita roztoku môže byť vo fyziologickom rozmedzí (295-305 mOsm/l). To umožní lepšiu očnú znášanlivosť. Okrem toho uvedený prípravok môže výhodne obsahovať antioxidačnú prísadu, ako sú napríklad galáty, kyselina askorbová, hyperoxid dismutázy (SOD), BHT, disiričitan sodný, tokoferoly, BHA, kyselina nordihydroguajaretová, estery kyseliny askorbovej, dimetyltiomočovina a podobne.

Znášanlivosť možno ďalej zvýšiť pomocou ďalších prísad ako sú cyklo-dextríny, polysorbát 80 (alebo Tween 80), dextrán (napríklad dextrán 70), polyetylén glykol (napríklad PEG 400), poloxaméry a ďalšie podobné prostriedky. Uvedené prípravky môžu obsahovať prostriedky ovplyvňujúce viskozitu/zahusťovacie prostriedky ako je metylcelulóza, polyvinylalkohol, glukozaminové glukány, polyvinylpyrolidón a podobne, na zvýšenie očnej biologickej dostupnosti, stability a znášanlivosti účinnej zložky (zložiek).

Očnú biologickú dostupnosť flunarizínu možno ďalej zvýšiť prídavkom prostriedkov, ktoré zvyšujú priepustnosť liečiva rohovkou, ako je napríklad dimetylsulfoxid, taurocholáty, membránové fosfolipidy, benzalkóniumchlorid a ďalšie povrchovo aktívne prostriedky na oftalmické použitie (ako laurylsulfosukcinát sodný).

Záverom je potrebné uviesť, že prípravky obsahujúce viac dávok kompozície vo fľaštičke musia obsahovať konzervačný prostriedok, ktorý má antimikrobiálnu účinnosť na zabránenie kontaminácie produktu. Tento prostriedok možno zvoliť z konzervačných prostriedkov známych na použitie vo farmácii.

Prípravky určené na podanie vo forme suspenzií by mali obsahovať prostriedky vhodné na tento účel ako je karboxymetylcelulóza a podobne. V prípade, že prípravok má byť vo forme masti, gélu alebo krému na oftalmické použitie, tak flunarizín sa zmieša s nosičmi ako sú polyetylén glykoly, polyakryláty, polyetylén oxidy, masťné kyseliny a alkoholy alebo lanolín, parafín a ďalšie podobné produkty. Vhodné prísady pre tvorbu emulzií alebo mikroemulzií možno zvoliť zo skupiny zahrnujúcej: dietylén glykol-monobutyléter, di(etylén glykol)-butyléter, etylester kyseliny kaprylovej, etylester kyseliny olejovej, sójový olej, hexadekán, tributyrín, etylén glykol-monometyléter, 1-hexadekán, n-heptán, 1-heptén, Tween 80, PEG, poloxaméry, polyoxyetylén étery.

Dávka hlavnej účinnej zložky podľa vynálezu určená na topické podanie sa môže pohybovať od asi 20 μg do asi 200 μg na deň a pre každé oko. Predpísaná dávka oftalmických prípravkov obsahujúcich flunarizín bude závisieť od dennej dávky, ktorá je nutná na dosiahnutie terapeutického účinku, a samozrejme od špecifickej formy prípravku. Roztoky alebo suspenzie na oftalmické použitie je potrebné kvapkávať 1 až 4 krát denne; masti, gély a krémy je treba aplikovať 1 až 2 krát; pevné vložky s polymérnou maticou, buď degradovateľné alebo nedegradovateľné stačí aplikovať jeden raz denne.

Vynález sa ďalej týka kompozícií umožňujúcich oftalmické podávanie flunarizínu topickým spôsobom, a špecifických oftalmických kompozícií vhodných na liečbu a/alebo na prevenciu glaukómu, ktoré obsahujú ako účinnú

zložku terapeuticky účinné množstvo flunarizínu. Skupina výhodných kompozícií zahrnuje kompozície s nasledujúcim zložením (všetky uvedené percentá sú percentá hmotnostné):

flunarizín-hydrochlorid	0,059 %
(zodpovedá 0,05 % flunarizínu)	
chlorid sodný	0,10-0,80 %
trizma pufer	0,02-0,20 %
PEG 400	1,00-6,00 %
Tween 80	2,00-12,00 %
disiričitan sodný	0,01-0,20 %
propylgalát	0,01-0,50 %
EDTA	0,005-0,20 %
voda prečistená	q.s. do 100 %

prípadne s ďalšími farmaceuticky prijateľnými prísadami.

Vo zvlášť výhodnom uskutočnení vynálezu, kompozície na liečbu a/alebo prevenciu glaukómu ďalej obsahujú od 0,1 do 2,5 % hmotnostných beta-blokátora, kde týmto blokátorom je výhodne timolol alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ ako je timolol-maleát.

Iba na ďalšie objasnenie vynálezu sú nižšie uvedené niektoré jeho špecifické uskutočnenia súčasne s výsledkami experimentálnych štúdií uskutočnených s navrhovaným antiglaukomatikom, ktoré zahrnujú aj porovnávacie testy s inými prostriedkami blokujúcimi kalciový kanál.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Oftalmický roztok obsahujúci flunarizín

Kompozícia podľa vynálezu, ktorá sa ukázala byť zvlášť účinná (bolo uskutočnené experimentálne hodnotenie účinnosti ako je čiastočne ďalej opísané) má nasledujúce zloženie (uvedené percentá sú percentá hmotnostné):

flunarizín hydrochlorid	0,059 %
(zodpovedá 0,050 % flunarizínu)	
chlorid sodný	0,485 %
trizma pufer	0,100 %
PEG 400	2,500 %
Tween 80	5,000 %
disiričitan sodný	0,050 %
propylgalát	0,050 %
EDTA	0,010 %
voda prečistená	q.s. do 100 %

Vyššie uvedená kompozícia je vhodná na balenie do jednodávkových obalov, v prípade potreby viacdávkového balenia je nutné pridať konzervačný prostriedok (ako je napríklad benzalkóniumchlorid) aby bola zachovaná sterilita produktu počas celého používania.

Príklad 2

Oftalmická mikroemulzia obsahujúca flunarizín

Kompozícia vhodná na použitie vo forme oftalmickej masti sa pripraví s nasledujúcim zložením (hmotnostné percentá):

flunarizín hydrochlorid	0,059 %
(zodpovedá 0,050 % flunarizínu)	
trizma pufer (na pH 7,20)	0,100 %
PEG 400	10,000 %
Sójový olej	2,000 %
Tween 80	20,000 %
disiričitan sodný	0,050 %
sorbitol	2,057 %

propylgalát	0,050 %
voda prečistená	q.s. do 100 %

Ako prostriedok na úpravu tónicity možno použiť namiesto uvedeného množstva sorbitolu 455 mg chloridu sodného na 100 ml (t.j. 0,455 % hmotn.)

Príklad 3

Oftalmická emulzia obsahujúca flunarizín

Oftalmický produkt podobný produktu opísanému v predchádzajúcom príklade, ale majúci väčšiu veľkosť kvapôčok dispergovanej fázy sa pripraví vypustením sójového oleja zo zloženia a prípravou podľa nasledujúceho zloženia (hmotnostné percentá):

flunarizín hydrochlorid	0,059 %
(zodpovedá 0,050 % flunarizínu)	
trizma pufer (na pH 7,20)	0,100 %
PEG 400	2,000 %
Tween 80	7,000 %
disiričitan sodný	0,050 %
sorbitol	2,014 %
propylgalát	0,050 %
voda prečistená	q.s. do 100 %

Alternatívne môže prípravok obsahovať ako prostriedok na úpravu tónicity namiesto sorbitolu 433 mg chloridu sodného na 100 ml (t.j. 0,433 % hmotn.).

Príklad 4

Oftalmický roztok obsahujúci kombináciu flunarizínu a timololu

Zvlášť výhodná kompozícia podľa vynálezu sa pripraví tak, že ku kompozícii podľa príkladu 1 sa pridá dostatočné množstvo timolol-maleátu na do-

siahnutie obsahu 0,5 % hmotnostných timololu v celkovej zmesi (čo zodpovedá asi 0,68 % hmotnostným timolol-maleátu). Koncentrácie ostatných zložiek sa použijú rovnaké ako v príklade 1.

Podobne možno tiež modifikovať prídavkom vhodného množstva timolol-maleátu prípravky pripravené podľa príkladu 2 a 3. Taktiež v týchto prípadoch je vhodné, aby sa docielila koncentrácia timololu v celkovej zmesi 0,5 % hmotnostných.

Experimentálne výsledky

V experimentálnej práci, ktorej výsledky sú uvedené nižšie, sa izotonický roztok pufrovaný podľa príkladu 1 a s upravenou viskozitou podľa príkladu 1, ale obsahujúci rôzne koncentrácie flunarizínu (pohybujúce sa v rozmedzí 0,01 % až 0,1 % hmotnostných) všeobecne označuje ako MEG 01. Táto práca sa tiež zaoberá kombináciami flunarizínu a beta-blokátorov ako sú znázornené pre timolol v príklade 4. Kombinácia flunarizínu a timololu je označovaná ako MEG 02. Niektoré z uvedených experimentálnych výsledkov sú taktiež znázornené na pripojených výkresoch.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obrázku 1 je znázornené zníženie vnútroočného tlaku v percentách po aplikácii kvapkaním do očí králikov s hypertenziou, v porovnaní so zodpovedajúcim znížením tlaku po nakvapkaní placebo alebo po nakvapkaní iných antagonistov kalcia;

na obrázku 2 je znázornené zníženie vnútroočného tlaku v percentách po nakvapkaní flunarizínu s rôznymi koncentraciami do očí králikov s očnou hypertenziou; a

na obrázku 3 je znázornené zníženie vnútroočného tlaku v percentách po nakvapkaní flunarizínu v kombinácii s rôznymi beta-blokátormi do očí králikov s očnou hypertenziou.

Farmakodynamické štúdie

a) Štúdie na králikoch s normálnym vnútroočným tlakom

Účinky prostriedku podľa vynálezu na vnútroočný tlak králikov majúcich vnútroočný tlak v normálnych medziach boli hodnotené v porovnaní s placebom a s rôznymi ďalšími prostriedkami blokujúcimi kalciový kanál. V pokuse boli použité samice pigmentovaných králikov druhu Vienna Blue (dodané firmou Charles River Italiana, Calco (CO)). Vek zvierat v čase zahájenia pokusu bol 9 týždňov a ich hmotnosť bola 2,0-2,5 kg.

Výber typu s pigmentovanou dúhovkou bol uskutočnený na základe skutočnosti, že tento typ predstavuje spoľahlivý model na hodnotenie možných modifikácií vnútroočného tlaku vyvolaných skúšanými produktami. Zvolený druh je geneticky definovaný, čo obmedzuje variabilitu biologických vlastností medzi jednotlivými zvieratami na minimum.

Zvieratá bola chované v miestnostiach s konštantnými a riadenými hodnotami teploty a vlhkosti, s umelým osvetlením počas 12 hodín denne a s kontinuálnou výmenou vzduchu. Potravou bola štandardná strava s konštantným a známym zložením, pričom ako potrava, tak aj voda boli dostupné ad libitum počas celého pokusu. Králiky boli ustajnené 21 dní pred pokusom tak, aby boli dostatočne aklimatizované a mohol byť zhodnotený ich zdravotný stav. Zvieratá bola náhodne rozmiestnené do pokusných skupín, kde každá skupina zahrnovala 4 zvieratá.

Jednotlivé skupiny zvierat obdržali aplikáciou do pravej spojivkovej klenby kvapkaním po 50 µl:

a) očných kvapiek MEG 01 obsahujúcich 0,050 % hmotnostných flunarizínu (0,052 % hmotn. flunarizín-hydrochloridu);

b) roztok placebo (t.j. vehikula pre MEG 01);

c) očných kvapiek obsahujúcich 0,056 % hmotnostných verapamilu vo vehikule pre MEG 01;

d) očných kvapiek obsahujúcich 0,051 % hmotnostných diltiazemu vo vehikule pre MEG 01;

e) očných kvapiek obsahujúcich 0,043 % hmotnostných nifedipínu vo vehikule pre MEG 0,01.

Hmotnostné koncentrácie uvedených rôznych prostriedkov zaradených do pokusu sú zvolené tak, aby zodpovedali rovnakej molárnej koncentrácii.

Tlak v ošetrovanom oku bol stanovovaný očným tónometrom (TonopenXL®, Mentor), a to 15 minút pred nakvapkaním očných kvapiek (čas 0) a potom 30, 60, 90, 120, 180 a 240 minút po nakvapkaní. 5 minút pred každým meraním bolo do oka aplikované kvapkaním 25 µl lokálneho anestetika, obchodne dostupného oftalmického roztoku obsahujúceho 0,4 % oxybuprokaín-hydrochloridu (Novesin®, Sandoz). Pri meraní boli králiky umiestnené do vhodne navrhutej klietky, ktorá im bránila v náhlom pohybe pri meraní.

Tlak bol meraný každému zvieraťu a v každej odčítacej dobe uvedenej vyššie, trikrát, a z týchto hodnôt bol vypočítaný priemer, pričom medzi jednotlivými meraniami bol interval 1 minúty. Hodnoty vnútroočného tlaku v rôznych časových intervaloch boli porovnané s hodnotami získanými, aj pred ošetrením pomocou Studentovho "t" testu. Porovnanie medzi rôznymi skupinami bolo uskutočnené spracovaním údajov analýzou štvorcov smerodajných odchýliek (ANOVA) a tam kde to bolo možné, Studentovým "t" testom na porovnanie dvoch rôznych experimentálnych skupín. Hodnoty $p < 0,05$ boli pokladané za štatisticky významné.

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené hodnoty vnútroočného tlaku u každého zvieraťa, a taktiež priemerné hodnoty zistené pre každú skupinu ($\pm$ štandardná odchýlka).

Tabuľka 1

Vnútroočný tlak králikov s normálnym tlakom po aplikácii skúšaných prostriedkov

	Vnútroočný tlak (mm Hg) v čase (minúty)							
králik č.	oko	0	30	60	90	120	180	240
Očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu (MEG 01)								
01	PO	17	15	14	15	15	15	17
02	PO	16	14	13	14	14	15	16
03	PO	14	13	12	12	14	14	16
04	PO	16	12	12	14	14	14	16
priemer ± SD		15,7±1,2	13,5±1,3	12,7±0,95	13,7±1,2	14,2±0,5	14,5±0,5	16,2±0,5
Placebo								
05	PO	15	16	16	15	15	16	16
06	PO	16	15	14	16	16	17	17
07	PO	17	15	16	16	16	17	17
08	PO	15	15	16	16	16	15	17
Priemer ± SD		15,7±0,9	15,2±0,5	15,5±1,0	15,7±0,5	15,7±0,5	16,2±0,9	16,7±0,5
Očné kvapky obsahujúce 0,056 % verapamilu								
09	PO	17	16	15	15	16	16	17
10	PO	15	14	14	13	13	16	15
11	PO	16	17	15	15	16	17	17
12	PO	16	15	15	15	16	16	17
Priemer ± SD		16,8±0,8	15±1,3	14,7±0,5	14±1,0	15,7±0,5	16,2±0,5	16,5±1,0
Očné kvapky obsahujúce 0,051 % diltiazemu								
13	PO	15	14	14	14	15	15	16
14	PO	16	15	14	14	15	16	16
15	PO	18	17	17	16	16	17	17
16	PO	18	15	13	15	16	17	17
Priemer ± SD		16,7±1,5	15,2±1,2	14,7±0,9	14,7±0,9	15 ±0,5	16,2±0,95	16±0,6
Očné kvapky obsahujúce 0,043 % nifedipínu								
17	PO	16	15	14	16	16	17	17
18	PO	15	15	13	15	16	15	17
19	PO	14	13	13	15	16	15	14
20	PO	18	16	15	16	16	17	18
Priemer ± SD		15,7±1,7	14,7±1,2	13,7±0,9	15,5±0,6	16,0±1,5	16,5±1,7	16,5±1,0

Ako vyplýva z vyššie uvedenej tabuľky, očné kvapky MEG 01 (obsahujúce 0,050 % flunarizínu) poskytujú za jednu hodinu po podaní významné zníženie vnútroočného tlaku, zatiaľ čo produkt obsahujúci zodpovedajúce vehikulum bez flunarizínu nevyvoláva žiadnu významnejšiu zmenu vnútroočného tlaku. V uvedenom druhom prípade nie je tlak meraný po podaní očných kvapiek štatisticky odlišný od hodnôt získaných pred nakvapkaním (čas 0: 15 minút pred podaním).

Ďalej, ani prípravky obsahujúce verapamil a ani diltiazem, obsahujúce rovnaké vehikulum ako MEG 01 nevyvolávajú žiadne zníženie vnútroočného tlaku vzhľadom k placebo. Určité menšie zníženia boli zaznamenané pri podaní nifedipínu, ale tento účinok sa zdá byť zanedbateľný v porovnaní s odozvou získanou s použitím MEG 01 obsahujúcim 0,050 % hmotnostných flunarizínu.

Ďalšia séria skúšok bola uskutočnená s králikmi s normálnymi hladinami vnútroočného tlaku s cieľom porovnať účinnosť flunarizínu s účinnosťou kombinácie flunarizínu s beta-blokátormi a účinnosťou beta-blokátorov samotných.

Do hodnotenia boli zahrnuté známe beta-blokátory: timolol (neselektívny beta-blokátor, aktívny ako na β_1 tak na β_2 adrenergných receptoroch), betaxolol (kardioselektívny beta-blokátor, aktívny iba na β_1 adrenergných receptoroch) a karteolol (neselektívny blokátor, ale majúci vlastnú sympatomimetickú aktivitu). Skúšky boli uskutočnené rovnakým spôsobom aký je opísaný vyššie, a zvieratá boli ošetrené v jednotlivých skupinách nasledujúcimi kompozíciami:

f) očnými kvapkami MEG 02 obsahujúcimi 0,50 % hmotnostných flunarizínu (0,052 % flunarizín-hydrochloridu) v kombinácii s 0,5 % hmotnostnými timololu (0,68 % timolol-maleátu);

g) očnými kvapkami obsahujúcimi 0,050 % hmotnostných flunarizínu a 0,5 % hmotnostných betaxololu vo vehikule pre MEG 02;

h) očnými kvapkami obsahujúcimi 0,050 % hmotnostných flunarizínu a 2,0 % hmotnostných karteololu vo vehikule pre MEG 02.

Výsledky tejto série stanovení, získané a spracované rovnakým spôsobom ako výsledky uvedené v tabuľke 1, sú uvedené v nasledujúcej tabuľke. Z dôvodov ľahšieho porovnania sú výsledky získané s flunarizínom samotným a s placebom, t.j. so skupinou zvierat a) a b) predchádzajúceho pokusu opäť uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 2

Vnútroočný tlak králikov s normálnym tlakom po aplikácii skúšaných prostriedkov

	Vnútroočný tlak (mm Hg) v čase (minúty)							
Králik č.	Oko	0	30	60	90	120	180	240
Očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu (MEG 01)								
01	PO	17	15	14	15	15	15	17
02	PO	16	14	13	14	14	15	16
03	PO	14	13	12	12	14	14	16
04	PO	16	12	12	14	14	14	16
priemer ± SD		15,7±1,2	13,5±1,3	12,7±0,95	13,7±1,2	14,2±0,5	14,5±0,5	16,2±0,5
Placebo								
05	PO	15	16	16	15	15	16	16
06	PO	16	15	14	16	16	17	17
07	PO	17	15	16	16	16	17	17
08	PO	15	15	16	16	16	15	17
priemer ± SD		15,7±0,9	15,2±0,5	15,5±1,0	15,7±0,5	15,7±0,5	16,2±0,9	16,7±0,5
Očné kvapky obsahujúce 0,5 % timololu								
101	PO	16	15	14	14	15	16	16
102	PO	16	14	13	14	15	16	17
103	PO	16	15	13	15	16	17	16
104	PO	15	15	14	15	16	15	15
priemer ± SD		15,7±0,5	14,7±0,5	13,5±0,6	14,5±0,6	15,5±0,6	16,0±0,8	16,0±0,8
Očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu a 0,5 % timololu (MEG 02)								
105	PO	16	14	13	14	15	16	16
106	PO	17	13	14	14	14	15	17
107	PO	16	14	12	14	15	16	16
108	PO	16	14	12	13	14	15	15
priemer ± SD		16,2±0,5	13,7±0,5	12,7±1,0	13,7±0,5	14,5±0,6	15,5±0,6	16,2±0,5

Tabuľka 2 (pokračovanie)

	Vnútroočný tlak (mm Hg) v čase (minúty)							
Králik č.	Oko	0	30	60	90	120	180	240
Očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu a 0,5 % betaxololu								
109	PO	15	14	14	14	15	16	15
110	PO	16	14	14	14	16	16	17
111	PO	17	15	15	16	16	16	17
112	PO	17	16	15	15	16	16	16
Priemer ± SD		16,2±1,0	14,7±1,0	14,5±0,6	14,7±1,0	15,7±0,5	16,0±0	16,2±1,0
Očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu a 2,0 % karteololu								
113	PO	17	16	14	15	16	17	16
114	PO	16	15	15	15	16	16	16
115	PO	16	13	14	15	16	16	17
116	PO	15	12	14	15	15	16	16
Priemer ± SD		16,0±0,8	14,0±1,8	14,2±0,5	15,0±0,0	15,7±0,5	16,2±0,5	16,2±0,5

Z experimentálnych výsledkov uvedených v predchádzajúcej tabuľke na jednej strane vyplýva, že za podmienok skúšky má flunarizín samotný lepšiu účinnosť pri znižovaní vnútroočného tlaku než samotný timolol. Na druhej strane z týchto údajov vyplýva, že účinnosť flunarizínu sa ďalej zvýši prídavkom timololu do prípravku a účinnosť tejto kombinácie je lepšia než účinnosť flunarizínu samotného.

b) Štúdie na králikoch s očnou hypertenziou

V nasledujúcich testoch boli použité králiky rovnakého typu ako v predchádzajúcej štúdii. Králiky boli vopred ošetrované rovnakým spôsobom a za rovnakých podmienok ustajnenia.

Experimentálne zvýšenie vnútroočného tlaku bolo indukované podaním α -chymotrypsínu. Injekčné podanie tohto enzýmu do zadnej komory oka králikov vyvolalo po jednom mesiaci po podaní očnú hypertenziu. Tento pokusný model sa značne využíva, a často sa používa na hodnotenie účinnosti rôznych antiglaukomatik.

Na konci karantény boli králiky anestetizované intramuskulárnym podaním ketamín-hydrochloridu a xylazín-hydrochloridu (RBI). Po nakvapkaní 25 μ l Novesinu® očných kvapiek, obsahujúcich anestetikum oxybuprokáin bolo pravé oko jemne povytiahnuté von; potom bol do zadnej komory pravého oka pomocou sterilnej ihly 30G injekčne aplikovaný sterilný roztok α -chymotrypsínu (SIGMA, Milano; 150 jednotiek v 100 μ l fyziologického sterilného roztoku). Po podaní enzýmu bolo oko dôkladne vyplachované sterilným fyziologickým roztokom, aby sa odstránili akékoľvek stopy α -chymotrypsínu, ktorý by mohol poškodiť očné tkanivo. Potom boli vkvapkané 2 kvapky obchodne dostupného oftalmického antibiotika vo forme roztoku (Colbiocin®, DIFI S.p.A, obsahuje chloramfenikol, rolitetracyklín, kolistín-metánsulfonát). Toto ošetrenie sa potom uskutočňovalo trikrát denne (o 8.00 a 12.00 dopoludnia a o 6.00 popoludní) počas jedného týždňa po podaní α -chymotrypsínu. Králiky boli zaradené do pokusu jeden mesiac po indukcii očnej hypertenzie pomocou enzýmu.

Tiež v tomto prípade boli králiky rozdelené do skupín po 4 zvieratách a ošetrené s 50 μ l skúšaného produktu, ktorý bol nakvapkaný do pravej spojivkovej klenby. V prvom pokuse boli použité rovnaké prostriedky ako v prvom predchádzajúcom pokuse (MEG 01 očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu, placebo, očné kvapky obsahujúce 0,056 % verapamilu, a ďalej kvapky obsahujúce 0,051 % diltiazemu a 0,043 % nifedipínu).

Vnútroočný tlak v ošetrovanom oku bol meraný rovnakým postupom ako v predchádzajúcich pokusoch, 15 minút pred nakvapkaním očných kvapiek a 30, 60, 90, 120, 180 a 240 minút po nakvapkaní. Získané hodnoty boli štatisticky spracované podľa kritérií opísaných vyššie.

V nasledujúcej tabuľke sú v každej testovanej skupine uvedené odozvové hodnoty vnútroočného tlaku a ich priemerné hodnoty ($\pm$ štandardné odchýlky). Priemerné hodnoty zníženia vnútroočného tlaku vyjadrené v percentách sú tiež graficky znázornené na obrázku 1.

Tabuľka 3

Vnútroočný tlak králikov s očnou hypertenziou po aplikácii skúšaných prostriedkov

	Vnútroočný tlak (mm Hg) v čase (minúty)							
králik č.	Oko	0	30	60	90	120	180	240
Očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu (MEG 01)								
21	PO	57	47	45	50	51	56	56
22	PO	46	38	37	38	39	44	45
23	PO	36	30	28	32	34	37	37
24	PO	52	43	41	43	45	51	51
Priemer ± SD		47,7±9,03	39,5±7,32	37,75±7,25	40,7±7,63	42,2±7,36	47,0±8,28	47,25±8,18
Placebo								
25	PO	57	56	57	58	56	57	57
26	PO	47	48	46	47	48	48	47
27	PO	41	42	43	42	41	42	43
28	PO	52	50	51	51	50	53	52
Priemer ± SD		49,25±6,84	49,0±5,77	49,25±6,13	49,5±6,75	48,75±6,18	50,0±6,48	49,75±6,07
Očné kvapky obsahujúce 0,056 % verapamilu								
29	PO	56	55	56	55	55	57	56
30	PO	47	48	49	46	47	46	48
31	PO	42	40	43	41	41	42	43
32	PO	51	52	52	50	51	50	51
priemer ± SD		49,0±5,94	48,7±6,5	50,0±5,47	48,0±5,94	48,5±5,97	48,75±6,39	49,5±5,44
Očné kvapky obsahujúce 0,051 % diltiazemu								
33	PO	55	55	53	54	56	56	55
34	PO	52	53	51	52	52	51	52
35	PO	47	48	46	46	47	46	47
36	PO	42	42	40	41	43	43	41
Priemer ± SD		49,0±5,71	49,5±5,80	47,5±5,80	48,2±5,90	49,5±5,68	49,0±5,71	48,7±6,13
očné kvapky obsahujúce 0,043 % nifedipínu								
37	PO	54	55	53	52	53	54	54
38	PO	50	52	50	50	49	48	49
39	PO	47	45	45	46	46	45	47
40	PO	41	39	39	38	40	41	42
Priemer ± SD		48,0±5,47	47,75±7,18	46,75±6,13	46,5±6,19	47,0±5,47	48,00±4,96	48,00±4,96

Z tabuľky 3 je zrejmé, že podanie samotného vehikula nemá za následok nijakú významnejšiu zmenu vnútroočného tlaku, zatiaľ čo MEG 01 (obsahujúci

0,050 % flunarizínu) vyvolá zníženie vnútroočného tlaku významne vyššie ako možno získať podaním ďalších testovaných antagonistov kalcia. Ako je z tabuľky zrejmé, hodnoty vnútroočného tlaku po ošetroaní oftalmickými roztokmi obsahujúcimi ekvivalentné množstvo verapamilu, diltiazemu alebo nifedipínu v rovnakom vehikule ako MEG 01 nie sú nijako výraznejšie znížené.

V druhej sérii pokusov boli s použitím rovnakých postupov hodnotené oftalmické roztoky podľa vynálezu obsahujúce rôzne koncentrácie flunarizínu, t.j. 0,1 % a 0,01 %. Cieľom bolo porovnať takto získané odozvy s odozvou zistenou s MEG 01 očnými kvapkami obsahujúcimi 0,05 % hmotnostných flunarizínu. Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke a sú tiež znázornené graficky na obrázku 2 (vo forme priemerného zisteného percentuálneho zníženia vnútroočného tlaku).

Tabuľka 4
Vnútroočný tlak králikov s očnou hypertenziou ošetrovaných flunarizínom

	Vnútroočný tlak (mm Hg) v čase (minúty)							
králik č.	Oko	0	30	60	90	120	180	240
očné kvapky obsahujúce 0,010 % flunarizínu								
41	PO	60	58	55	53	58	60	61
42	PO	65	61	59	60	62	64	65
43	PO	53	51	49	48	52	52	52
44	PO	52	50	48	49	51	50	52
Priemer ± SD		57,5±6,13	55,0±5,35	52,7±5,18	52,5±5,44	55,7±5,18	56,5±6,60	57,5±6,55
očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu								
21	PO	57	47	45	50	51	56	56
22	PO	46	38	37	38	39	44	45
23	PO	36	30	28	32	34	37	37
24	PO	52	43	41	43	45	51	51
Priemer ± SD		47,7±9,03	39,5±7,32	37,7±7,27	40,7±7,63	42,2±7,36	47,0±8,28	47,2±8,18
očné kvapky obsahujúce 0,100 % flunarizínu								
45	PO	58	48	45	49	51	56	57
46	PO	48	40	38	41	43	47	49
47	PO	42	36	34	36	38	41	43
48	PO	51	45	40	46	48	50	50
Priemer ± SD		49,7±6,6	42,2±5,31	39,2±4,57	43,0±5,71	45,0±5,71	48,5±6,24	49,7±5,73

Z predchádzajúcej tabuľky možno zistiť, že najvyššie percento zníženia vnútroočného tlaku bolo dosiahnuté pomocou prípravku MEG 01 obsahujúceho 0,05 % flunarizínu, pričom prípravok s najvyššou koncentráciou (0,1 %) preukázal aktivitu porovnateľnú s aktivitou prípravku s koncentráciou 0,05 %. Táto skutočnosť je zreteľnejšia z grafu na obrázku 2.

V ďalšej sérii pokusov boli hodnotené účinnosti kombinácií flunarizínu s beta-blokátorom na hypertenzných králikoch. Pokusné podmienky boli presne rovnaké ako vo vyššie uvedenom prípade. Tri skupiny zvierat boli ošetrované kompozíciami uvedenými pod bodmi f), g) a h) uvedenými v prvej sekcii a výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke. Pre lepšie porovnanie sú tiež v tomto prípade znovu uvedené výsledky pre flunarizín samotný a pre placebo.

Tabuľka 5

Vnútroočný tlak králikov s očnou hypertenziou po aplikácii skúšaných prostriedkov

	Vnútroočný tlak (mm Hg) v čase (minúty)							
Králik č.	Oko	0	30	60	90	120	180	240
očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu (MEG 01)								
21	PO	57	47	45	50	51	56	56
22	PO	46	38	37	38	39	44	45
23	PO	36	30	28	32	34	37	37
24	PO	52	43	41	43	45	51	51
priemer ± SD		47,7±9,0	39,5±7,3	37,7±7,2	40,7±7,6	42,2±7,4	47,0±8,3	47,2±8,2
Placebo								
25	PO	57	56	57	58	56	57	57
26	PO	47	48	46	47	48	48	47
27	PO	41	42	43	42	41	42	43
28	PO	52	50	51	51	50	53	52
priemer ± SD		49,2±6,8	49,0±5,8	49,2±6,1	49,5±6,7	48,7±6,2	50,0±6,5	49,7±6,1
Očné kvapky obsahujúce 0,5 % timololu								
117	PO	53	43	42	42	46	52	53
118	PO	54	45	42	42	45	48	51
119	PO	46	39	39	38	39	42	45
120	PO	43	40	36	37	40	42	44
priemer ± SD		49,0±5,3	41,7±2,7	39,7±2,9	39,7±2,6	42,5±3,5	46,0±4,9	48,2±4,4

Tabuľka 5 (pokračovanie)

	Vnútroočný tlak (mm Hg) v čase (minúty)							
Králik č.	Oko	0	30	60	90	120	180	240
očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu a 0,5 % timololu (MEG 02)								
121	PO	52	35	33	33	36	38	41
122	PO	58	39	36	37	41	46	48
123	PO	47	31	29	32	35	37	38
124	PO	45	32	26	30	36	36	35
priemer ± SD		50,5±5,8	34,2±3,6	31,0±4,4	33,0±2,9	37,0±2,7	39,2±4,6	40,5±5,6
očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu a 0,5 % betaxololu								
125	PO	49	39	36	38	42	42	43
126	PO	45	35	37	37	39	40	41
127	PO	56	44	42	46	47	49	49
128	PO	55	45	41	43	47	46	51
Priemer ± SD		51,2±5,2	40,7±4,6	39,0±2,9	41,0±4,2	43,7±3,9	44,2±4,0	46,0±4,8
Očné kvapky obsahujúce 0,050 % flunarizínu a 2,0 % karteololu								
129	PO	57	53	40	42	50	54	56
130	PO	52	46	44	45	48	49	49
131	PO	47	37	39	40	44	43	43
132	PO	46	36	37	39	40	41	43
priemer ± SD		50,5±5,1	43,0±8,0	40,0±2,9	41,5±2,6	45,5±4,4	46,7±5,9	47,7±6,2

Z údajov uvedených v tabuľke 5 a ešte zreteľnejšie z diagramu na obrázku 3 vyplýva pozoruhodná účinnosť kombinácie flunarizínu s timololom a všeobecne dobrá účinnosť kombinácií flunarizínu s beta-blokátormi. Tiež v tomto prípade samotný flunarizín vykazuje v porovnaní so samotným timololom lepšiu účinnosť.

Hodnotenie toxicity

a) Hodnotenie zdurenia rohovky

Hodnotenie hrúbky rohovky bolo uskutočnené echograficky pomocou prístroja UBM System 840 (Humphrey Instruments, San Leandro, CA, USA). Toto zariadenie obsahuje 50 MHz sondu a umožňuje zobrazenie na obrazovke s rozlíšením asi 504 pri veľkosti zobrazovaného pola 5x5 mm. Programové vy-

bavenie umožňuje meniť hĺbku zamerania ultrazvukového zväzku a zobrazovať záznam pri rôznych zosilneniach.

Zvieratá zaradené do pokusu boli rovnakého druhu ako zvieratá opísané v predchádzajúcich pokusoch a boli ošetrované rovnakým spôsobom. Pokus bol zahájený anestéziou zvierat (ketamín-hydrochloridom a xylazín-hydrochloridom) uskutočnenou tak, že zvieratám boli aplikované očné poháriky naplnené kontaktnými prostriedkami (ultrazvukový gél). Králikom potom bola do pravého oka aplikovaná jedným nakvapnutím dávka (50 μ l) rovnakých prostriedkov aké boli použité vo farmakodynamických štúdiách: a) očné kvapky MEG 01 obsahujúce 0,050 % flunarizínu; c) očné kvapky obsahujúce 0,056 % hmotnostných verapamilu; d) očné kvapky obsahujúce 0,051 % hmotnostných diltiazemu; e) očné kvapky obsahujúce 0,043 % nifedipínu. Do ľavého oka králikov bolo nakvapkaním aplikované rovnaké množstvo placebo (vehikula pre MEG 01 bez akejkoľvek účinnej zložky).

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené hrúbky rohovky zistené u rôznych skupín zahrnujúcich vždy 4 králiky a to pred nakvapkaním a v rovnakých časových intervaloch po nakvapkaní.

Tabuľka 6

Hrúbka rohovky králikov po topickom ošetrovaní antagonistami kalcia

		Hrúbka rohovky (mm) v čase (min)			
Králik č.	oko	Zákl.hodnota	1 hodina	2 hodiny	3 hodiny
PO: MEG 01 obsahujúce 0,050 % flunarizínu – LO: placebo					
49	PO	0,394	0,394	0,394	0,394
49	LO	0,394	0,394	0,394	0,394
50	PO	0,347	0,347	0,347	0,347
50	LO	0,347	0,347	0,347	0,347
51	PO	0,386	0,386	0,386	0,386
51	LO	0,386	0,386	0,386	0,386
52	PO	0,363	0,363	0,363	0,363
52	LO	0,363	0,363	0,363	0,363
PO: očné kvapky obsahujúce 0,056 % verapamilu – LO: placebo					
53	PO	0,356	0,376	0,385	0,383
53	LO	0,356	0,358	0,360	0,367
54	PO	0,384	0,398	0,406	0,402
54	LO	0,384	0,382	0,388	0,380
55	PO	0,372	0,387	0,400	0,402
55	LO	0,372	0,374	0,368	0,372
56	PO	0,392	0,401	0,494	0,410
56	LO	0,392	0,390	0,396	0,388
PO: očné kvapky obsahujúce 0,051 % diltiazemu – LO: placebo					
57	PO	0,377	0,380	0,382	0,384
57	LO	0,377	0,380	0,380	0,377
58	PO	0,389	0,392	0,394	0,396
58	LO	0,389	0,389	0,325	0,387
59	PO	0,396	0,400	0,400	0,400
59	LO	0,396	0,396	0,394	0,398
60	PO	0,358	0,362	0,364	0,364
60	LO	0,358	0,358	0,360	0,360
PO: očné kvapky obsahujúce 0,043 % nifedipínu – LO: placebo					
61	PO	0,375	0,380	0,380	0,380
61	LO	0,375	0,375	0,376	0,375
62	PO	0,372	0,380	0,378	0,378
62	LO	0,372	0,374	0,372	0,372
63	PO	0,396	0,398	0,400	0,400
63	LO	0,396	0,396	0,396	0,396
64	PO	0,384	0,388	0,389	0,390
64	LO	0,384	0,382	0,984	0,382

Ako je z predchádzajúcich údajov zrejmé, neboli pri použití produktu podľa vynálezu zistené počas celého pokusu žiadne zmeny v hrúbke rohovky. Oproti tomu použitie oftalmického roztoku obsahujúceho 0,056 % verapamilu vyvolalo zdurení rohovky zodpovedajúce hrúbke asi 15-20 μm /hodina. Žiadny výraznejší účinok nebol zistený pri aplikácii očných kvapiek obsahujúcich diltiazem (len mierne zdurení) alebo nifedipín.

b) Akútna znášateľnosť

Na hodnotenie znášateľnosti blokátora kalciového kanála podľa vynálezu pri topickej aplikácii do oka boli králiky (rovnakého druhu ako v predchádzajúcich pokusoch) po počiatočnej adaptácii ošetrované nasledujúcim spôsobom. Prvý deň bolo nakvapkané do pravej spojivkovej klenby 12 dávok MEG 01 (0,05 %), každá s objemom 0,05 ml, s intervalom medzi jednotlivými dávkami 30 minút. Druhé oko bolo ošetrované placebom a použité ako kontrolný pokus.

Stav očných tkanív bol pozorovaný modifikovaným testom podľa Draiza (Spampinato S., Marino A., Bucolo C., Canossa M., Bachetti T., Mangiafico S., Effect of sodium naproxen eye drops on rabbit ocular inflammation induced by sodium arachidonate, J.Ocular Pharm., 7(2); 125-133, (1991)). Odčítanie bolo uskutočňované každú hodinu od prvého podania až do 7 hodiny, a potom po 24, 48 a 72 hodine po poslednom podaní formou pridelenia skóre hodnotiaceho rôzne aspekty týkajúce sa palpebrálnej a bulbárnej spojovky, dúhovky a rohovky.

Na spojivke žiadneho oka, ako očí ošetrovaných MEG 01 očnými kvapkami (0,05 % hmotn. Flunarizínu), tak aj očí ošetrovaných placebom, nebolo zistené počas celého testu žiadne výraznejšie začervenanie. V žiadnom z hodnotených očí nebol zistený žiadny opuch. Okrem toho na žiadnej rohovke ošetrovaných očí nebola zistená žiadna zmena a množstvo výtoku bolo na obvyklej úrovni. Nebolo zistené ani žiadne poškodenie tkanív rohovky; u dvoch očí sa prejavila mierna deepitelizácia.

Zo získaných výsledkov vyplýva, že oftalmický roztok MEG 01 obsahujúci 0,05 % flunarizínu je po opakovanom podaní kvapkaním do spojivkovej klenby oka králiku veľmi dobre znášaný.

Štúdie väzby

Štúdia väzby na receptor bola uskutočnená s bunkovými membránami získanými z irido-ciliárneho komplexu explantovaného samcom albinotických králikov druhu New Zealand po ich usmrtení (Charles River Italiana, of Calco (CO)). Tkanivo bolo zhomogenizované v pufri a bola oddelená frakcia P_2 obohatená o bunkové proteíny. Uvedená frakcia bola získaná odstredením spôsobom opísaným v literatúre (Mach R.H., Smith C.R., Childers S.R., Ibogaine possesses a selective affinity for sigma 2 receptors, Life Sci., 57(4); 57-62). La celková koncentrácia proteínu bola stanovená spôsobom podľa Lowryho.

Alikvotné podiely P_2 frakcie homogenizátu každá obsahujúca 300 μg celkových proteínov boli inkubované v polypropylénových skúmavkách obsahujúcich skalárne podiely antagonistov kalcia zaradených do pokusu (t.j. flunarizínu, verapamilu, nifedipínu a nimodipínu) a známe množstvo $^3\text{H}(+)\text{-N-allyl-normetazocínu (SKF)}$ (prostriedku pokusne používaného ako σ ligand). Nešpecifická väzba bola stanovená v prítomnosti haloperidolu.

Všetky stanovenia boli uskutočnené duplicitne. Reakčná zmes sa udržiavala pri 37 °C počas 150 minút, a potom sa filtrovala cez filtre Whatmann GF/B. Rádioaktivita na filtroch sa merala spektrometriou s tekutými scintilátormi. Bola zistená hodnota IC_{50} a zistené hodnoty sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 7

Účinky rôznych antagonistov kalcia na inhibíciu väzby s $^3\text{H}(+)\text{-N-allyl-normetazocínom}$

Zlúčenina	IC ₅₀ (nM)
flunarizín	23,9
verapamil	>10 000
nifedipín	>10 000
nimodipín	>10 000
diltiazem	>10 000

Predchádzajúce údaje potvrdzujú zistenia prieskumu, ktorý viedol k predloženému vynálezu a ktorý bol diskutovaný v úvode. Predovšetkým z týchto údajov vyplýva, že flunarizín má afinitu k σ -1 receptorom, na rozdiel od známejších a preštudovanejších prostriedkov blokujúcich kalciový kanál ako je verapamil, nifedipín a diltiazem. Z týchto zistení vyplýva, že σ -1 receptory sú zahrnuté v mechanizme zodpovednom za zníženie vnútroočného tlaku vyvolanom flunarizínom a že tento zvláštny jav je príčinou prekvapujúco vysokej účinnosti flunarizínu ako antiglaukomatika na topické podanie.

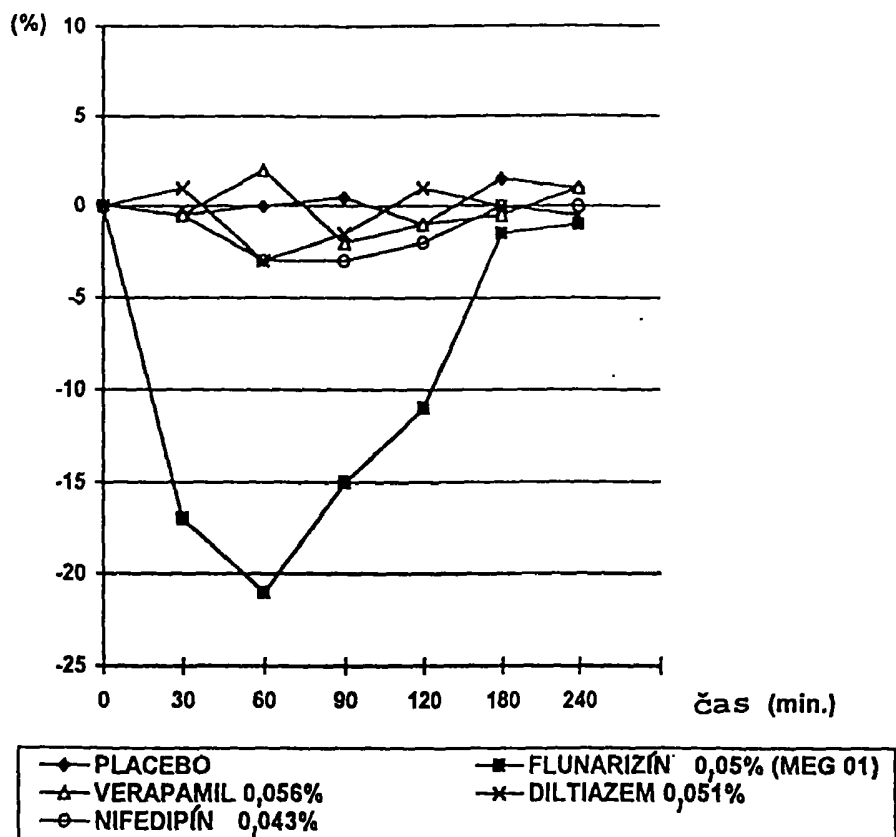
Predložený vynález bol opísaný pomocou niektorých jeho špecifických uskutočnení, ale tento opis je potrebné chápať tak, že pracovníci v odbore sú schopní tieto uskutočnenia modifikovať a meniť, bez toho, aby sa odchýlili od rozsahu vynálezu definovaného v pripojených patentových nárokoch.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

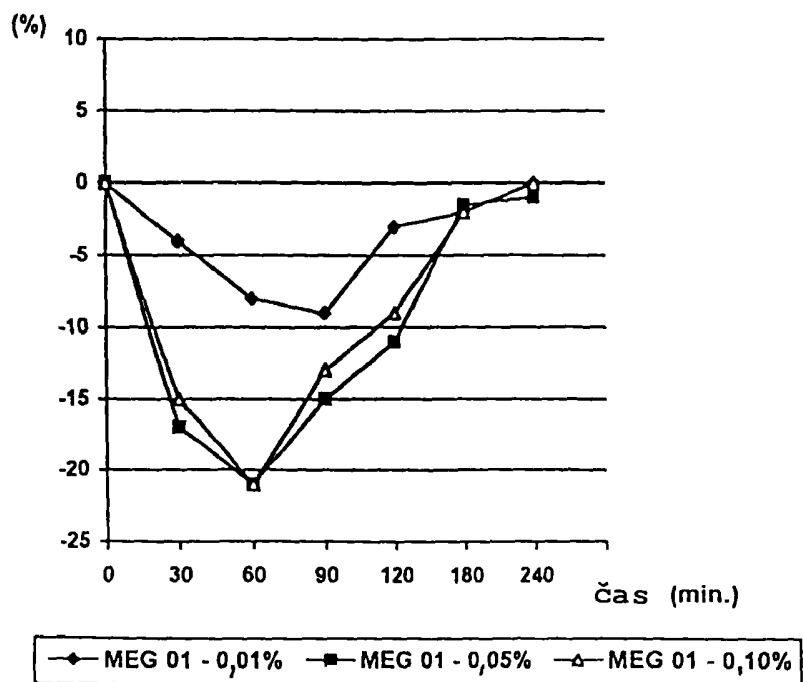
1. Použitie flunarizínu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli na výrobu oftalmického liečiva na topické podanie na zníženie očnej hypertenzie.
2. Použitie podľa nároku 1, pri ktorom je uvedené oftalmické liečivo na topické podanie vo forme vodného roztoku alebo suspenzie, alebo vo forme gélu, krému alebo masti, vo farmaceuticky prijateľnom vehikule, alebo vo forme erodovateľnej očnej vložky, alebo "zásobníkového" systému s polymérnou membránou, určené na aplikáciu do spojivkového vaku.
3. Použitie podľa nároku 1 alebo 2, pri ktorom je koncentrácia flunarizínu v uvedenom oftalmickom liečive od 0,001 do 0,500 % hmotnostných.
4. Použitie podľa nároku 3, pri ktorom je koncentrácia flunarizínu 0,050 % hmotnostných.
5. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, pri ktorom je flunarizín v uvedenom oftalmickom liečive obsiahnutý vo forme svojej hydrochloridovej soli.
6. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, pri ktorom uvedené oftalmické liečivo na topické podanie ďalej obsahuje beta-blokátor.

7. Použitie podľa nároku 6, pri ktorom je koncentrácia beta-blokátora v uvedenom oftalmickom liečive od 0,1 do 2,5 % hmotnostných.
8. Použitie podľa nároku 6 alebo 7, pri ktorom je uvedeným beta-blokátorom timolol alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.
9. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, pri ktorom je uvedené oftalmické liečivo na topické podanie vo forme vodného roztoku a ďalej obsahuje jeden alebo viac prostriedkov na úpravu tónicity, jeden alebo viac pufrov a jeden alebo viac antioxidantných prostriedkov.
10. Použitie podľa nároku 9, pri ktorom uvedené oftalmické liečivo na topické podanie ďalej obsahuje jeden alebo viac prostriedkov na zlepšenie očnej znášateľnosti, ktoré sú zvolené zo skupiny zahrnujúcej cyklodextríny, polysorbát 80 (alebo Tween 80), dextrán, polyetylén glykol a poloxaméry.
11. Použitie podľa nároku 10 alebo 11, pri ktorom uvedené oftalmické liečivo na topické podanie ďalej obsahuje jeden alebo viac konzervačných prostriedkov alebo antimikrobiálnych prostriedkov.

1/2

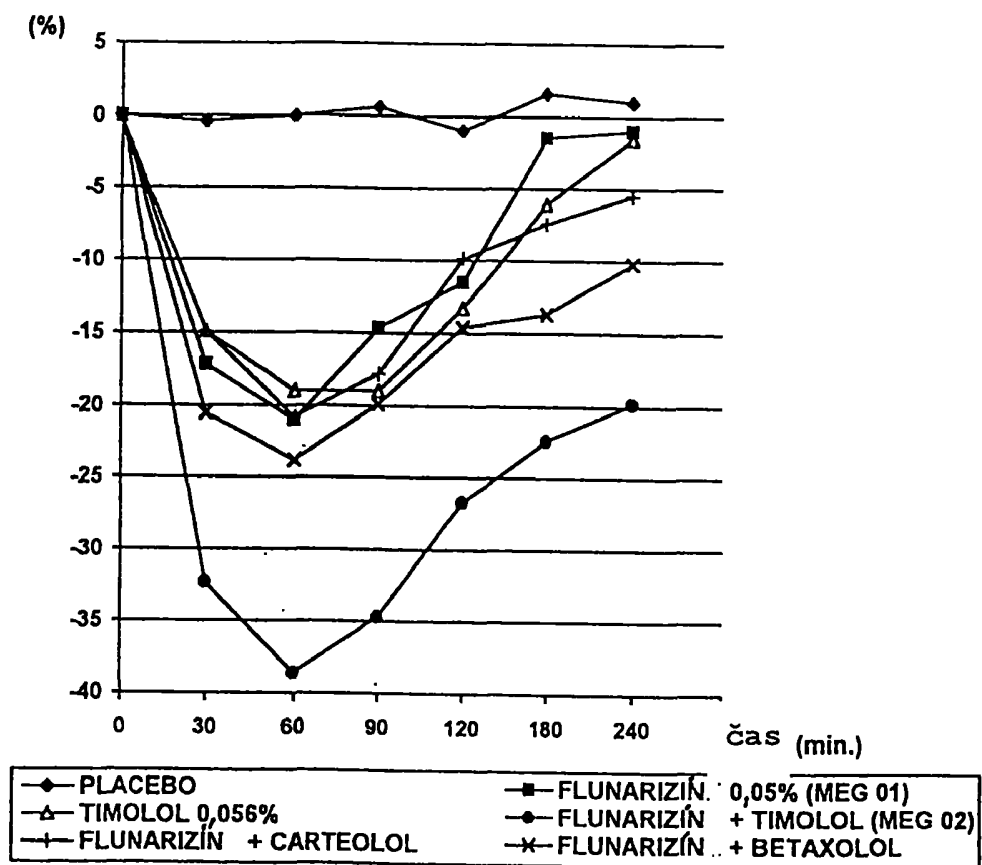


Obr. 1



Obr. 2

2/2



Obr . 3