

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

294 385

(13) Druh dokumentu:

B6

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-1229**
(22) Přihlášeno: **04.04.2001**
(30) Právo přednosti: **07.04.2000 CH 2000/0694**
(40) Zveřejněno: **14.11.2001**
(Věstník č. 11/2001)
(47) Uděleno: **14.10.04**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **15.12.2004**
(Věstník č. 12/2004)

(51) Int. Cl. :⁷

A 61 K 9/08
A 61 K 38/13
A 61 K 31/728
A 61 K 47/26
A 61 P 27/02

(73) Majitel patentu:

LABORATOIRE MEDIDOM S. A., Geneve, CH

(72) Původce:

Di Napoli Guido, Collonge-Bellerive, CH

(74) Zástupce:

JUDr. Jan Matějka, Národní 32, Praha, 11000

(54) Název vynálezu:

Oftalmologické prostředky

(57) Anotace:

Řešení popisuje oftalmologický prostředek ve formě vodného roztoku obsahující cyklosporin, kyselinu hyaluronovou nebo její sůl a polysorbát 80.

CZ 294385 B6

Oftalmologické prostředkyOblast techniky

5 Předkládaný vynález se týká lokálních oftalmologických prostředků obsahujících cyklosporin.

Dosavadní stav techniky

10 Cyklosporiny představují třídu nepolárních cyklických oligopeptidů majících různé farmakologické vlastnosti.

Jsou zejména známé pro své imunosupresivní a protizánětlivé účinky a také bylo popsáno, že jsou účinné v zesílení nebo obnovení sekrece slz slznou žlázou u pacientů trpících autoimunitní keratokonjunktivitou sicca.

15 Cyklosporiny přirozeného původu, které většinou zahrnují cyklosporin A méně často cyklosporiny B až I, mohou být získány z houby *Trichoderma polysporum*.

Velký počet jejich analogů a izomerů cyklosporinů může být získán synteticky.

20 Nejlépe prostudovaným a ve farmacii nejčastěji používaným cyklosporinem je cyklosporin A.

Aktivita cyklosporinu a zejména cyklosporinu A v zesílení nebo obnovení sekrece slz slznou žlázou může být zlepšena zlepšením absorpce cyklosporinu v slzné žláze.

25 Z důvodu velmi špatné rozpustnosti cyklosporinů ve vodě (20 až 30 µg/ml pro cyklosporin A) bylo velmi obtížné připravení oftalmologického prostředku obsahujícího cyklosporin rozpuštěný ve vodném médiu.

30 Z tohoto důvodu byly ty cyklosporiny, o kterých bylo známo, že jsou lipofilní, použity zejména v prostředcích na bázi oleje.

US 4 839 342 popisuje lokální oftalmologický prostředek obsahující cyklosporin, konkrétně cyklosporin A, a přísadu, pro zvýšení produkce slz u pacientů trpících nedostatkem slz v oku z důvodu dysfunkce slzných žláz. Konkrétními popsány přísadami jsou olivový olej, podzemnicový olej, ricinový olej, polyoxyethylovaný ricinový olej, anorganické oleje, vazeliny, dimethylsulfoxid, alkohol, liposomy, silikonové oleje nebo jejich směsi.

40 FR 2 638 089 popisuje lokální oftalmologický prostředek, který obsahuje cyklosporin jako aktivní substanci a rostlinný olej jako je olivový olej, podzemnicový olej, sezamový olej a kukuřičný klíčkový olej jako vehikulum, stejně jako vazelinu, pro léčbu onemocnění a imunologických nebo zánětlivých stavů postihujících oko, zejména keratokonjunktivitou sicca (KCS) nebo suché oči.

45 Nicméně, lokální oftalmologické prostředky na bázi oleje mají nevýhody jako jsou nepříjemné pocity při aplikaci do očí, nebo k rozmazanému vidění. Oleje mohou kromě toho zesílit příznaky suchých očí.

Lokální oftalmologické prostředky na bázi oleje obsahující cyklosporin jsou také fyzikálně nestabilní, protože cyklosporin má tendenci podléhat konformačním změnám a srážet se.

50 Tyto prostředky mají kromě toho špatnou biologickou dostupnost a jsou špatně tolerovány při aplikaci do oka, protože způsobují podráždění oka.

Za účelem minimalizace výše uvedených nevýhod, jako je dyskomfort při aplikaci, a pro zlepšení biologické dostupnosti a tolerovatelnosti prostředku bylo ve WO 95/31 211 navrženo snížení množství oleje a dispergování olejové fáze ve vodě tak, aby vznikla emulze, takže se získá lokální oftalmologický prostředek ve formě emulze na bázi vody a olej obsahující cyklosporin smísený s triglyceridem obsahujícím mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, jako je ricinový olej a polysorbát 80. Tento prostředek také dále obsahuje emulgační činidlo, jako je například Pemulen®.

Za účelem eliminace problému srážení cyklosporinu, za zachování biologické dostupnosti a tolerovatelnosti prostředku, byl vodný lokální oftalmologický prostředek navržen v US 5 951 971, který neobsahuje olej a obsahuje cyklosporin v koncentraci od 0,01 do 0,075 % (hmotn./obj.), vodu a surfaktant v množství 0,1 až 3 % (hmotn./obj.), který slouží pro zlepšení rozpustnosti cyklosporinu ve vodě a je vybrán z esterů polyethoxylovaných mastných kyselin, polyethoxylovaných alkylfenyletherů, polyethoxylovaných alkyletherů a jejich směsí. Podle US 5 951 971 bylo zjištěno, že polysorbát 80, též známý jako Tween 80, je nevhodný jako surfaktant, protože nemá dostatečnou aktivitu pro rozpuštění cyklosporinu v požadované koncentraci ve vodě.

Cílem předkládaného vynálezu je eliminování výše uvedených nevýhod a zejména problémů fyzikální stability, a především zlepšení biologické dostupnosti prostředku ve spojivce, rohovce a slzné žláze, stejně jako zlepšení tolerance prostředku v oku, pomocí lokálního oftalmologického prostředku na bázi vody obsahujícího cyklosporin.

Tento cíl byl dosažen tehdy, když vynálezci zjistili, že přítomnost kyseliny hyaluronové a polysorbátu 80 ve vodného oftalmologickém prostředku obsahujícím cyklosporin překvapivě umožňuje rozpuštění cyklosporinu za zlepšení biologické dostupnosti prostředku ve spojivce, rohovce a slzné žláze, stejně jako za zlepšení tolerance prostředku v oku, když je tento prostředek podán lokálně do oka.

Kyselina hyaluronová je mukopolysacharid biologického původu, který je v přírodě hojný. Je přítomen zejména v různých živočišných tkáních, jako je chorda umbilicalis, synoviální kapalina, sklivec, kohoutí hřebínek a různé pojivové tkáně, jako je kůže a chrupavka.

Chemicky je kyselina hyaluronová glykosaminoglykan a je složena ze střídajících se opakujících se skupin kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, které tvoří lineární řetězec mající molekulovou hmotnost asi 13×10^6 .

Farmaceutické použití kyseliny hyaluronové nebo jedné z jejích solí, zejména hyaluronátu sodného, je popsáno v literatuře. Protože jsou kyselina hyaluronová nebo její soli neimunogenní substance a mají hydrofilní a viskoelastické vlastnosti, jsou používány mnoho let jako náhrada za kapalinu ve sklívci, nebo jako podpůrné médium při očních chirurgických zákrocích, jak je popsáno například v US 4 141 973.

Také byly popsány jiné aplikace kyseliny hyaluronové v oftalmologii.

EP 0 698 388 popisuje vodný oftalmologický prostředek obsahující sůl kyseliny hyaluronové v koncentraci 0,05 až 2 % jako činidlo pro zvýšení viskozity, který je používán jako umělé slzy.

WO 89/017 772 popisuje lokální oftalmologický prostředek na bázi oleje obsahující cyklosporin, který je určen pro zesílení nebo obnovení sekrece slz slznou žlázou. Kyselina hyaluronová je citována v seznamu činidel, které mohou být obsažena v prostředku jako aditiva nebo další aktivní činidla.

Podstata vynálezu

V prvním aspektu je předmětem předkládaného vynálezu lokální oftalmologický prostředek na bázi vody obsahující cyklosporin, kyselinu hyaluronovou nebo jednu z jejích solí a polysorbát 80.

V druhém aspektu je předmětem předkládaného vynálezu použití cyklosporin společně s kyselinou hyaluronovou nebo jednou z jejích solí a polysorbátem 80 pro přípravu lokálního oftalmologického prostředku na bázi vody určeného pro lokální oční aplikaci.

Předkládaný vynález tedy poskytuje oftalmologický prostředek ve formě vodného roztoku, ve kterém je cyklosporin solubilizován ve formě micel, kde prostředek je stabilní a má dobrou biologickou dostupnost ve spojivce, rohovce, slzné žláze a oční kapalině, stejně jako dobrou toleranci v oku, kde tyto charakteristiky jsou významně lepší než v prostředku, ve kterém je cyklosporin solubilizován v emulzi voda v oleji.

Další výhody předkládaného vynálezu budou zřejmé z následujícího popisu.

Termín „cyklosporin“, jak je zde použit, zahrnuje všechny jednotlivé členy třídy cyklosporinů a jejich směsi, pokud není specifikován určitý cyklosporin.

Je třeba uvést, že v předkládaném vynálezu termín „kyselina hyaluronová“ zahrnuje kyselinu hyaluronovou ve formě kyseliny nebo ve formě jedné z jejích solí.

Prostředky podle předkládaného vynálezu obsahují cyklosporin, kyselinu hyaluronovou nebo jednu z jejích solí a polysorbát 80.

Prostředky podle předkládaného vynálezu výhodně obsahují 0,02 až 2 % hmotnostní cyklosporinu, 0,01 až 2 % hmotnostní kyseliny hyaluronové nebo jedné z jejích solí a 0,5 až 40 % hmotnostních polysorbátu 80, vzhledem k celkové hmotnosti prostředku.

Cyklosporinu, které mohou být obsaženy v prostředku podle předkládaného vynálezu, mohou být přirozené nebo syntetické cyklosporiny.

Podle výhodného provedení je cyklosporinem obsaženým v prostředku cyklosporin A.

Jeden cyklosporin A, který může být použit pro přípravu prostředku podle předkládaného vynálezu, je komerční cyklosporin A vyráběný SIGMA ve Švýcarsku.

Kyselina hyaluronová obsažená v prostředku může být buď ve formě kyseliny nebo ve formě jedné z jejích solí, jako je sůl s alkalickým kovem nebo kovem alkalických zemin, jako je hyaluronát sodný, hyaluronát draselný, hyaluronát hořečnatý, hyaluronát vápenatý a jiné.

Kyselina hyaluronová nebo její sůl má výhodně průměrnou molekulovou hmotnost, která není nižší než 1 00 000, lépe má průměrnou molekulovou hmotnost v oblasti 1 300 000 až 3 000 000. Molekulová hmotnost je výhodně přibližně 1 700 000.

Výhodně je kyselina hyaluronová ve formě hyaluronátu sodného.

Polysorbát 80, též známý jako Tween 80, je polyethoxylovaný sorbitan monooleát používaný jako surfaktant.

Polysorbát 80, který může být použit pro přípravu prostředku podle předkládaného vynálezu, může být například komerční polysorbát 80 vyráběný například společností SIGMA.

V zejména výhodném provedení prostředek obsahuje 0,2 % hmotnostní cyklosporinu, 0,1 % hmotnostní kyseliny hyaluronové a 5 % hmotnostních polysorbátu 80, vzhledem k celkové hmotnosti prostředku.

- 5 Prostředek podle předkládaného vynálezu může kromě toho obsahovat další pomocná činidla, jako je sorbitol, který je použit jako činidlo upravující osmotický tlak. Sorbitol má tu výhodu, že má hydrodynamický objem vyšší než například NaCl. Dalšími možnými přísadami jsou mannitol, polyalkoholy a chlorid sodný a draselný.
- 10 Aby byl prostředek podle předkládaného vynálezu fyziologicky přijatelný, měl by mít pH v rozmezí od 6,5 do 7,5 a osmolalitu v rozmezí od 290 do 310 mosm/l, lépe 300 mosm/l.

Prostředek podle předkládaného vynálezu může být balen ve formě jednotlivých dávek.

- 15 Lokální prostředek podle předkládaného vynálezu je podán do oka ve formě kapek a je použitelný pro zesílení nebo obnovení sekrece slz slznou žlázou, a také pro stimulování nebo obnovení aktivity slzné žlázy, zejména u pacientů trpících keratokonjunktivitidou sicca, syndromu suchého oka, Sjögrenovým syndromem, chronickou jarní keratokonjunktivitidou a je použitelný jako pooperační profylaktické činidlo po keratoplastice.

- 20 Následující příklady jsou míněny jako dokreslení předkládaného vynálezu a jeho výhod. V žádném případě nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

- 25 Příklady prostředků podle předkládaného vynálezu jsou uvedeny v následující tabulce 1.

Prostředek Ref. 1 je referenční prostředek neobsahující cyklosporin.

Tabulka 1

Složka	Prostředek					
	1	2	3	4	5	Ref.
	1					
Cyklosporin A (%)	0,02	0,10	0,20	0,50	2,00	—
Hyaluronát sodný (%)	0,05	0,10	0,10	0,10	0,20	0,10
Tween 80 (%)	0,05	2,50	5,00	10,0	20,0	5,00
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O (%)	0,08	0,08	0,08	0,10	0,15	0,08
Sorbitol (%)	5,46	5,35	5,16	4,70	3,76	5,25
Přečištěná voda do	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
pH	7,0–7,4	7,0–7,4	7,0–7,4	7,0–7,4	7,0–7,4	7,0–7,4
mosm/l	295–305	295–305	295–305	295–305	295–305	295–305

- 30 Prostředky 1 až 5 a ref. 1 byly testovány pro hodnocení jejich tolerance v oku a prostředky 1 až 5 byly testovány v testu stability.

Tolerance prostředků 1 až 5 a Ref. 1

- 35 Hodnocení lokální tolerance prostředků 1 až 5 a ref 1 bylo provedeno na albinických králících New Zealand (šesti na každou skupinu, tři samci a tři samice), na kterých bylo testováno 12

instilací 0,1 ml každého testovaného prostředku, které byly podávány ve 30minutových intervalech do pravé konjunktivální arkády.

5 Stav tkání oka byl hodnocen podle Draizeho testu (S. C. Gad a C. P. Chengelis, „Ocular Irritation test“, v Acute Toxicology Testing, Telford Press, Caldwell, NJ, USA, str. 51–80). Test byl proveden 30 minut po poslední instilaci. Hodnocení bylo prováděno dvěma pracovníky, kteří neznaly nic o podané léčbě a kteří hodnotily stav spojivek (na víčku a na bulbu), rohovky a duhovky.

10 Ošetřené oko bylo také hodnoceno testem s fluoresceinem následujícím způsobem. 40 minut po poslední instilaci testovaného prostředku a o Draizeho testu byl do ošetřeného oka instilován roztok obsahující 2% fluorescein ve fyziologickém roztoku a nadbytek fluoresceinu byl odstraněn výplachem oka sterilním fyziologickým roztokem. Tkáně oka byly potom pozorně hodnoceny na kvantitu fluoresceinu, který se absorboval. Pomocí tohoto testu, který byl proveden za použití šterbinové lampy, bylo prokázáno, že všechny prostředky, tj. prostředky 1 až 5 obsahující 15 cyklosporin A a prostředek Ref. 1 neobsahující cyklosporin A, mají dobrou tolerovatelnost.

20 V Draizeho testu měly rohovka a duhovka normální vzhled. Spojivka byla normální bez otoku nebo sekrece, s výjimkou tří skupin králíků léčených prostředky 3, 4 a 5 obsahujícími 0,20, 0,5 a 2% cyklosporinu A, v příslušném pořadí, z nichž dvě ze šesti ošetřených očí vykazovaly hyperemii cév v centrálním regionu, což podle testu odpovídá lepší tolerovatelnosti.

V testu s fluoresceinem nebyl pozorován rozdíl mezi různými prostředky; žádné z ošetřených očí neabsorbovalo fluorescein.

25 Stabilita prostředků 1–5 podle předkládaného vynálezu

Bylo zjištěno, že všechny prostředky jsou stabilní při teplotě okolí a srážení cyklosporinu A se nevyskytlo v žádném z prostředků 1–5 během 12 měsíců po přípravě prostředků.

30 Prostředek 3 podle předkládaného vynálezu byl potom srovnáván s emulzí olej ve vodě z hlediska biologické dostupnosti cyklosporinu A v tkáních oka a z hlediska tolerovatelnosti v oku.

Srovnání prostředku 3 podle předkládaného vynálezu a emulze olej ve vodě

35 Prostředek 3 podle předkládaného vynálezu byl srovnáván s emulzí olej ve vodě (CYCLOIL) z hlediska biologické dostupnosti cyklosporinu A v tkáních oka a z hlediska tolerovatelnosti v oku.

Složení těchto dvou prostředků je uvedeno v následující tabulce 2.

Tabulka 2

Složka	Prostředek 3	CYCLOIL
cyklosporin A (%)	0,20	0,20
Hyaluronát sodný (%)	0,10	—
Ricinový olej (%)	—	1,25
Tween 80 (%)	5,00	1,00
Glycerol (%)	—	2,00
Pemulen [®] TR-2 (%)	—	0,05
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (%)	0,08	—
Sorbitol (%)	5,16	—
Přečištěná voda do	100 ml	100 ml
pH	7,0–7,4	7,0–7,4
mosm/l	295–305	290–310

40

Biologická dostupnost ve tkáních oka

V tomto pokusu byly koncentrace cyklosporinu A stanoveny ve spojivce, rohovce, komorové vodě a slzné žláze po lokální aplikaci dvou prostředků, prostředku č. 3 podle předkládaného vynálezu a CYCLOIL.

5

Testy byly provedeny se samci albinických králíků New Zealand. Králíci byli rozděleni do dvou skupin po 15 králících a do obou očí bylo aplikováno 50 μ l dvou testovaných prostředků. Vzorky ze spojivky, rohovky, komorové vody a slzné žlázy byly odebírány 1, 3, 6, 12 a 24 hodin po instilaci, pokaždé od tří králíků z obou skupin, po utrácení zvířat. Oči byly enukleovány a promyty fyziologickým roztokem před odběrem komorové vody (přibližně 400 μ l), rohovky (přibližně 120 mg), spojivky (přibližně 120 mg) a slzné žlázy (přibližně 800 mg).

10

Kvantitativní stanovení cyklosporinu A bylo provedeno na HPLC koloně s inverzní fází s izokratickou elucí a pomocí UV-spektroskopické detekce. Chromatograf byl Varian a chromatografické podmínky byly následující:

15

- kolona: C18,60 x 4,6 mm, 3 μ m (Alltech)
- mobilní fáze: acetonitril/izopropanol/H₂O (66/2/32)
- průtok: 0,7 ml/min
- teplota kolony: 72 °C
- detekce: UV 205 nm (0,1–0,002 AUFS)
- injekční objem: 20–50 μ l
- retenční čas: 9,1 min

20

Vzorky, které byly určeny pro chromatografii, byly připraveny následujícím způsobem:

25

Komorová voda

Do 300 μ l komorové vody se přidalo 150 μ l acetonitrilu a takto získaný roztok se mísil vířením po dobu přibližně 1 minuty a potom se odstředil během 3 minut při 3000 x g. Supernatant se přenesl do zkumavky, zpracoval se 15 mg ZnSO₄ a 15 mg CdSO₄, mísil se vířením po dobu přibližně 1 minuty a potom se odstředil během 2 minut při 2000 x g. Organická fáze se přefiltrovala přes 0,45 μ m filtr a 50 až 75 μ l se injikovalo do kolony.

30

Rohovka, spojivka a slzná žláza

Tkáně se přesně odvážíly, homogenizovaly se v chladném methanolu (přibližně 1 ml), odstředily se při 3000 x g během 15 minut, supernatant se odebral v methanolu (přibližně 1 ml) a sušil se ve vakuu při přibližně 40 °C, zbytek se odebral v acetonitrilu (150 μ l, zpracoval se bezvodým (NH₄)₂SO₄, mísil se vířením po dobu 1 minuty a odstředil se během 2 minut při 2000 x g. Organická fáze se přefiltrovala přes 0,45 μ m filtr a 50 až 75 μ l se injikovalo do kolony.

35

40 Analytická metoda

Koncentrace cyklosporinu A ve spojivce, rohovce, slzné žláze a komorové vodě králíků jsou uvedeny v tabulkách 3 až 6.

Koncentrace cyklosporinu A ve spojivce

45

Tabulka 3 ukazuje koncentrace (ng/g) cyklosporinu A ve spojivce králíků ošetřených prostředkem 3 podle předkládaného vynálezu a CYCLOIL, 1, 3, 6, 12 a 24 hodin po instilaci 50 μ l prostředků do spojivkového vaku obou očí.

Tabulka 3

	Prostředek 3	CYCLOIL
Koncentrace 1 hodinu po instilaci (ng/g)	1170 ± 170	820 ± 155
Koncentrace 3 hodiny po instilaci (ng/g)	900 ± 215	713 ± 187
Koncentrace 6 hodin po instilaci (ng/g)	616 ± 102	370 ± 78
Koncentrace 12 hodin po instilaci (ng/g)	502 ± 95	250 ± 70
Koncentrace 24 hodin po instilaci (ng/g)	198 ± 40	75 ± 25
AUC ₀₋₂₄ (ng·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	12 483 ± 234	7378 ± 1891
C _{max} (ng/g)	1170 ± 170	820 ± 155
T _{max} (hod.)	1	1

5 Jak je vidět z tabulky 3, zajišťuje prostředek 3 podle předkládaného vynálezu lepší biologickou dostupnost cyklosporinu ve spojivce ve všech testovaných časech odběru vzorků ve srovnání s přípravkem CYCLOIL.

10 Maximální koncentrace byla zjištěna po první hodině, ačkoliv lze předpokládat, že nejvyšší absolutní koncentrace cyklosporinu budou přítomny bezprostředně po instilaci.

10 Vodný prostředek 3 podle předkládaného vynálezu způsobuje dosažení koncentrací cyklosporinu A, které jsou ve všech vzorcích vyšší než koncentrace emulze olej ve vodě CYCLOIL.

15 AUC (plochy pod křivkou) jsou 12 483 ± 234 ng g⁻¹ h⁻¹ pro prostředek 3 podle předkládaného vynálezu a 7378 ± 1891 ng g⁻¹ h⁻¹ pro emulzi olej ve vodě CYCLOIL.

Stejně výsledky byly získány pro rohovku.

Koncentrace cyklosporinu A v rohovce

20 Tabulka 4 ukazuje koncentrace (ng/g) cyklosporinu A v rohovce králíků ošetřených prostředkem 3 podle předkládaného vynálezu a prostředkem CYCLOIL na bázi oleje, 1, 3, 6, 12 a 24 hodin po instilaci 50 µl prostředků do spojivkového vaku obou očí.

Tabulka 4

	Prostředek 3	CYCLOIL
Koncentrace 1 hodinu po instilaci (ng/g)	2995 ± 750	2070 ± 1115
Koncentrace 3 hodiny po instilaci (ng/g)	3350 ± 920	1991 ± 630
Koncentrace 6 hodin po instilaci (ng/g)	2520 ± 870	2420 ± 870
Koncentrace 12 hodin po instilaci (ng/g)	2228 ± 490	1825 ± 690
Koncentrace 24 hodin po instilaci (ng/g)	1590 ± 220	450 ± 190
AUC ₀₋₂₄ (ng·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	53800 ± 13070	38097 ± 1397
C _{max} (ng/g)	3350 ± 920	2420 ± 870
T _{max} (hod.)	3	6

25

Jak je vidět z tabulky 4, maximální koncentrace léku byla zjištěna po třech hodinách pro prostředek 3 podle předkládaného vynálezu (3350 ± 920 ng/g) a po šesti hodinách pro prostředek CYCLOIL (2420 ± 870 ng/g).

- 5 Vodný prostředek 3 podle předkládaného vynálezu způsobuje dosažení koncentrací cyklosporinu A, které jsou ve všech vzorcích vyšší než koncentrace emulze olej ve vodě CYCLOIL.

Koncentrace cyklosporinu A v slzné žláze

- 10 Tabulka 5 ukazuje koncentrace (ng/g) cyklosporinu A v slzné žláze králíků ošetřených prostředkem 3 podle předkládaného vynálezu a CYCLOIL, 1, 3, 6, 12 a 24 hodin po instilaci 50 μ l prostředků do spojivkového vaku obou očí.

Tabulka 5

	Prostředek 3	CYCLOIL
Koncentrace 1 hodinu po instilaci (ng/g)	88 ± 29	22 ± 10
Koncentrace 3 hodiny po instilaci (ng/g)	149 ± 45	42 ± 16
Koncentrace 6 hodin po instilaci (ng/g)	135 ± 33	53 ± 18
Koncentrace 12 hodin po instilaci (ng/g)	54 ± 22	21 ± 10
Koncentrace 24 hodin po instilaci (ng/g)	38 ± 19	17 ± 10
AUC_{0-24} (ng·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	1826 ± 616	668 ± 286
C_{max} (ng/g)	149 ± 45	53 ± 18
T_{max} (hod.)	3	6

- 15 Vodný prostředek 3 podle předkládaného vynálezu vykazuje maximální koncentraci cyklosporinu A po třetí hodině (149 ± 45 ng/g), zatímco CYCLOIL vykazuje maximální koncentrace cyklosporinu A 53 ± 16 ng/g po šesti hodinách.

- 20 Jak se předpokládalo, jsou koncentrace cyklosporinu A v slzné žláze, které jsou uvedeny v tabulce 5, nižší než koncentrace získané ve spojivce a rohovce, ale jsou stále ještě vyšší než jsou limity citlivosti metody.

- 25 Z výše uvedených dat je zřejmé, že biologická dostupnost prostředku 3 podle předkládaného vynálezu je mnohem vyšší než biologická dostupnost prostředku CYCLOIL a že cyklosporin A je stále ještě přítomen 24 hodin po instilaci, sice v nižších koncentracích, ale stále ještě měřitelně. Poměr $AUC_{AN-023}/AUC_{cycloil}$, který představuje poměr biologických dostupností, má hodnotu přibližně 3.

Koncentrace cyklosporinu A v komorové vodě

- 30 Tabulka 6 ukazuje koncentrace (ng/g) cyklosporinu A v komorové vodě králíků ošetřených prostředkem 3 podle předkládaného vynálezu a CYCLOIL, 1, 3, 6, 12 a 24 hodin po instilaci 50 μ l prostředků do spojivkového vaku obou očí.

Tabulka 6

	Prostředek 3	CYCLOIL
Koncentrace 1 hodinu po instilaci (ng/g)	40 ± 12	12 ± 13
Koncentrace 3 hodiny po instilaci (ng/g)	41 ± 14	18 ± 7
Koncentrace 6 hodin po instilaci (ng/g)	31 ± 8	22 ± 11
Koncentrace 12 hodin po instilaci (ng/g)	27 ± 9	16 ± 4
Koncentrace 24 hodin po instilaci (ng/g)	16 ± 5	14 ± 2
AUC ₀₋₂₄ (ng·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	641 ± 14	390 ± 119
C _{max} (ng/g)	41 ± 14	22 ± 11
T _{max} (hod.)	3	6

5 Maximální koncentrace cyklosporinu instilovaného ve vodném prostředí (prostředek 3 podle předkládaného vynálezu) byla zjištěna po třech hodinách (44 ± 14 ng/ml), zatímco pro olejovou emulzi CYCLOIL byla maximální koncentrace (22 ± 11 ng/ml) zjištěna po šesti hodinách.

10 Koncentrace cyklosporinu A v komorové vodě králíků léčených instilací 50 µl obou testovaných prostředků byly relativně nízké ve srovnání se dvěma tkáněmi na povrchu oka (rohovkou a spojivkou). Pro komorovou vodu, podobně jako pro jiné tkáně oka, byla biologická dostupnost cyklosporinu podaného ve vodném prostředí vyšší než při podání v emulzi olej ve vodě.

Hodnocení tolerovatelnosti

15 Tolerovatelnost prostředku 3 podle předkládaného vynálezu a CYCLOIL byla hodnocena Draizeho testem modifikovaným způsobem popsáným výše.

Dvě skupiny po šesti zvířatech, které se skládaly vždy ze tří samců a tří samic albinických králíků z Nového Zélandu se ošetřilo 12 instilacemi 0,1 ml dvou testovaných prostředků do oka, během 6 hodin s 30 minutovými intervaly.

20 Draizeho test pro hodnocení tolerovatelnosti byl proveden 30 minut po poslední instilaci. Po tomto testu, 40 minut po poslední instilaci, byl proveden test s fluoresceinem. Výsledky těchto dvou testů jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8.

25 V následující tabulce 7 jsou stupně zarudnutí spojivky u králíků ošetřených prostředkem 3 podle předkládaného vynálezu a CYCLOIL instilací do pravého oka popsány podle Draizeho testu. Zarudnutí bylo hodnoceno podle arbitrážní škály. Ošetření bylo provedeno 12krát se 30 minutovými intervaly. Hodnocení bylo provedeno 30 minut po poslední instilaci.

Tabulka 7

Králík č.	Pohlaví	Prostředek	Stupeň zarudnutí spojivky
1	m	3	0
2	m	3	1
3	m	3	1
4	f	3	0
5	f	3	0
6	f	3	0
Průměr		0,33 ± 0,52	
Frekvence		2/6	

Tabulka 7 pokračování

Králík č.	Pohlaví	Prostředek	Stupeň zarudnutí spojivky
7	m	CYCLOIL	1
8	m	CYCLOIL	1
9	m	CYCLOIL	2
10	f	CYCLOIL	1
11	f	CYCLOIL	1
12	f	CYCLOIL	0
Průměr		1,00 ± 0,63	
Frekvence		5/6	

5 Je patrné, že prostředek 3 podle předkládaného vynálezu způsobil zarudnutí pouze ve dvou ze šesti případů, s určitou hyperemií v centrálním regionu, zatímco přípravek CYCLOIL na bázi oleje způsobil zarudnutí u pěti ze šesti králíků. U čtyřech králíků bylo po aplikaci přípravku CYCLOIL zarudnutí slabé, ale jednu hodinu po instilaci byla u jednoho králíka pozorována difúzní hyperemie karmínové barvy a bylo obtížné odlišení jednotlivých cév.

10 Žádný z králíků nevykazoval edém nebo vyšší než normální sekreci spojivky.

Následující tabulka 8 popisuje stupeň hyperemie duhovky u králíků ošetřených prostředkem 3 podle předkládaného vynálezu a prostředkem CYCLOIL, instilací do pravého oka. Zarudnutí bylo hodnoceno podle arbitrážní škály. Ošetření bylo provedeno 12krát se 30 minutovými intervaly. Hodnocení bylo provedeno 30 minut po poslední instilaci.

15 Tabulka 8

Králík č.	Pohlaví	Prostředek	Stupeň hyperemie spojivky
1	m	3	0
2	m	3	0
3	m	3	1
4	f	3	0
5	f	3	0
6	f	3	0
Průměr		0,17 ± 0,41	
Frekvence		1/6	
7	m	CYCLOIL	0
8	m	CYCLOIL	1
9	m	CYCLOIL	1
10	f	CYCLOIL	0
11	f	CYCLOIL	1
12	f	CYCLOIL	0
Průměr		0,50 ± 0,55	
Frekvence		3/6	

20 Pouze jeden králík ve skupině ošetřené prostředkem 3 podle předkládaného vynálezu vykazoval velmi mírnou hyperemii sekundárních cév duhovky a nikoliv terciárních cév.

Frekvence tohoto velmi mírného typu hyperemie byla tři ze šesti králíků ve skupině léčené přípravkem CYCLOIL.

25 Následující tabulka 9 popisuje stupeň zakalení rohovky u králíků ošetřených prostředkem 3 podle předkládaného vynálezu a prostředkem CYCLOIL, instilovaných do pravého oka. Opacita byla

hodnocena podle arbitrážní škály. Ošetření bylo provedeno 12krát se 30 minutovými intervaly. Hodnocení bylo provedeno 30 minut po poslední instilaci.

Tabulka 9

Králík č.	Pohlaví	Prostředek	Stupeň zakalení spojivky
1	m	3	0
2	m	3	0
3	m	3	0
4	f	3	0
5	f	3	0
6	f	3	0
Průměr		0	
Frekvence		0/6	
7	m	CYCLOIL	0
8	m	CYCLOIL	0
9	m	CYCLOIL	1
10	f	CYCLOIL	0
11	f	CYCLOIL	0
12	f	CYCLOIL	0
Průměr		0,17 ± 0,41	
Frekvence		1/6	

5

Pouze jeden králík ve skupině ošetřené prostředkem CYCLOIL vykazoval oblast zakalení rohovky, kde toto zakalení bylo takového stupně, že byla stále ještě viditelná duhovka.

10

Následující tabulka 10 popisuje stupeň absorpce fluoresceinu u králíků ošetřených prostředkem 3 podle předkládaného vynálezu a prostředkem CYCLOIL, instilovaných do pravého oka. Absorpce byla hodnocena podle arbitrážní škály. Ošetření bylo provedeno 12krát se 30 minutovými intervaly. Hodnocení bylo provedeno 40 minut po poslední instilaci.

Tabulka 10

Králík č.	Pohlaví	Prostředek	Stupeň absorpce fluoresceinu
1	m	3	0
2	m	3	1
3	m	3	0
4	f	3	0
5	f	3	1
6	f	3	0
Průměr		0,33 ± 0,52	
Frekvence		2/6	
7	m	CYCLOIL	0
8	m	CYCLOIL	1
9	m	CYCLOIL	2
10	f	CYCLOIL	1
11	f	CYCLOIL	0
12	f	CYCLOIL	0
Průměr		0,67 ± 0,82	
Frekvence		3/6	

15

Z dat uvedených výše je zřejmé, že prostředek 3 podle předkládaného vynálezu byl lépe tolerován ve fluoresceinovém testu. Tři rohovky ve skupině léčené prostředkem CYCLOIL adsorbující fluorescein a u jednoho králíka (č. 9) byly patrně akcentované fluorescentní skvrny, ačkoliv struktury různých tkání mohly být stále ještě rozlišeny, se ztrátou podrobností, pokud bylo použito správné osvětlení.

Pouze dva ze šesti králíků ošetřených prostředkem 3 podle předkládaného vynálezu vykazovaly nečetné, malé fluorescentní skvrny, ale žádné zabarvení nebylo patrné okolo zevní hrany pupily.

Výsledky uvedené výše jasně demonstrují, že vodný prostředek podle předkládaného vynálezu je nejen lépe tolerován, ale také má lepší biologickou dostupnost, než emulze olej ve vodě na bázi ricinového oleje, Tween 80 (polysorbátu 80), glycerolu a Pemulenu[®]TR-2 (CYCLOIL).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Lokální oftalmologický prostředek ve formě vodného roztoku **vyznačující se tím**, že obsahuje cyklosporin, kyselinu hyaluronovou nebo jednu z jejích solí a polysorbát 80.

2. Prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje 0,02 až 2 % hmotnostní cyklosporinu, 0,01 až 2 % hmotnostní kyseliny hyaluronové nebo jedné z jejích solí a 0,5 až 40 % hmotnostních polysorbátu 80, vzhledem k celkové hmotnosti prostředku.

3. Prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že cyklosporinem je cyklosporin A.

4. Prostředek podle jakéhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová nebo její sůl má průměrnou molekulovou hmotnost vyšší než 1 300 000.

5. Prostředek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová nebo její sůl má průměrnou molekulovou hmotnost v rozmezí od 1 300 000 do 3 000 000.

6. Prostředek podle jakéhokoliv z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová je přítomna jako hyaluronát alkalického kovu nebo kovu alkalických zemin.

7. Prostředek podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová je přítomna jako hyaluronát sodný.

8. Prostředek podle jakéhokoliv z nároků 2 až 7, **vyznačující se tím**, že obsahuje 0,2 % hmotnostní cyklosporinu, 0,1 % hmotnostní kyseliny hyaluronové nebo jedné z jejích solí a 5 % hmotnostních polysorbátu 80, vzhledem k celkové hmotnosti prostředku.

9. Prostředek podle jakéhokoliv z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje pomocná činidla.

10. Použití cyklosporinu společně s kyselinou hyaluronovou nebo jednou z jejích solí a polysorbátem 80 pro přípravu prostředku ve formě vodného roztoku určeného pro lokální oftalmologické použití.

11. Použití podle nároku 10, kde prostředek obsahuje 0,02 až 2 % hmotnostní cyklosporinu, 0,01 až 2 % hmotnostní kyseliny hyaluronové nebo jedné z jejích solí a 0,5 až 40 % hmotnostních polysorbátu 80, vzhledem k celkové hmotnosti prostředku.

12. Použití podle nároku 10 nebo 11, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že cyklosporinem je cyklosporin A.
- 5 13. Použití podle jakéhokoliv z nároků 10 až 12, kde kyselina hyaluronová nebo její sůl má průměrnou molekulovou hmotnost vyšší než 1 300 000.
14. Použití podle nároku 13, kde kyselina hyaluronová nebo její sůl má průměrnou molekulovou hmotnost v rozmezí od 1 300 000 do 3 000 000.
- 10 15. Použití podle jakéhokoliv z nároků 10 až 14, kde kyselina hyaluronová je přítomna jako hyaluronát alkalického kovu nebo kovu alkalických zemin.
16. Použití podle nároku 15, kde kyselina hyaluronová je přítomna jako hyaluronát sodný.
- 15 17. Použití podle jakéhokoliv z nároků 1 až 16, kde prostředek je určen pro léčbu keratokonjunktivitidy sicca.
18. Použití podle jakéhokoliv z nároků 1 až 16, kde prostředek je určen pro léčbu Sjögrenova syndromu.
- 20 19. Použití podle jakéhokoliv z nároků 1 až 16, kde prostředek je určen pro léčbu syndromu suchého oka.
- 25 20. Použití podle jakéhokoliv z nároků 1 až 16, kde prostředek je určen pro léčbu chronické jarní keratokonjunktivitidy.
- 30 21. Použití podle jakéhokoliv z nároků 1 až 16, kde prostředek je profylaktický pooperační prostředek po keratoplastice.

35

Konec dokumentu
